

5. Técnicas analíticas luminiscentes y de separación aplicadas a la identificación y cuantificación de biomarcadores

ANA I. OLIVES, BENITO DEL CASTILLO*,
M. ANTONIA MARTÍN

Laboratorio de Técnicas Instrumentales, S. D. Química Analítica. Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid (España)

RESUMEN

Hoy en día existe un interés creciente en la búsqueda de biomarcadores, éstos son moléculas, proteínas o enzimas que pueden medirse objetivamente con fines del diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico y sirven como indicadores de un proceso biológico normal o patológico y de la exposición a determinados agentes tóxicos. En el presente trabajo se efectúa una revisión bibliográfica de los métodos analíticos que permiten la determinación de los biomarcadores utilizados en la detección de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, tumorales y de otras patologías derivadas de la exposición a determinados agentes tóxicos. Entre las distintas técnicas y metodologías analíticas disponibles a tal fin, hemos centrado nuestro trabajo en el análisis de los biomarcado-

* **Información de contacto:**

Profesor Doctor Benito del Castillo García.
Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
28040 Madrid, España.
Tel.: 34-91 394 17 56. Fax: 34-91 394 17 54.
e-mail: benitodelcastillo@farm.ucm.es

res por técnicas de luminiscencia (fluorescencia, quimioluminiscencia, inmunofluorescencia) así como por técnicas de separación (cromatografía y electroforesis) asociadas a detección luminiscente. Se puede apreciar la tendencia creciente a la búsqueda de biomarcadores para la detección precoz de las enfermedades neurodegenerativas, dado que este tipo de patologías crece vertiginosamente en las sociedades de Europa occidental, sin dejar en el olvido la investigación de biomarcadores para enfermedades cardiovasculares y tumorales.

Palabras clave: Indicadores biológicos. Fluorescencia. Quimioluminiscencia. Microscopía de fluorescencia. Fluoroanálisis.

ABSTRACT

Determination of biomarkers employing luminescent and separation analytical techniques

Nowadays there is a growing interest in the search for new biomarkers. These can be defined as small molecules, proteins or enzymes that can be measured and employed for diagnostic and/or therapeutic purposes and serve as an indicator of a physiological or pathological process, or of the exposure to certain toxic agents. This chapter is devoted to a review of the literature on analytical methods for the detection of cardiovascular, neurological and neoplastic diseases arising from exposure to toxic agents. Among the available analytical techniques, we have focused on the detection of biomarkers by luminescence (fluorescence, chemiluminescence, immunofluorescence) and by separation techniques (chromatography, electrophoresis) with luminescent detection. An increasing interest in the search for biomarkers for the early detection of neurological diseases is observed due to their impact in the developed societies. Biomarkers for cardiovascular disease and cancer are other rapidly growing fields.

Keywords: Biological sensors. Fluorescence. Chemiluminescence. Fluorescence microscopy. Fluoroimmunoassay.

1. INTRODUCCIÓN

Un marcador biológico o biomarcador es una característica o un cambio fisiológico, bioquímico o morfológico medible objetivamente a nivel molecular, bioquímico o celular, y que actúa como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica.

Los biomarcadores pueden clasificarse en biomarcadores de riesgo, biomarcadores clínicos o diagnósticos de la enfermedad y biomarcadores pronósticos, si son capaces de predecir la progresión de la misma. El biomarcador ideal es el que proporciona información diagnóstica, pronóstica y terapéutica adicional a la que se obtiene a partir de los datos clínicos del paciente. En el caso de las enfermedades neoplásicas los *biomarcadores de pronóstico* suelen ser proteínas cuya aparición o incremento de sus niveles plasmáticos está ligado a la proliferación de células tumorales (CEA y PSA). Los *biomarcadores de riesgo*, informan sobre la posible predisposición a desarrollar un proceso canceroso sin que sus niveles se vean afectados por la mediación de fármacos. En el caso de los *biomarcadores predictivos*, se pueden determinar en muestras de saliva, sangre u orina e informan de los efectos de la aplicación de fármacos e intervenciones quirúrgicas sobre la evolución de una determinada patología (1).

La finalidad principal del empleo de los biomarcadores se centra en:

- detección de la presencia de una exposición y determinar las consecuencias biológicas de la misma;
- detección de los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico;
- identificación de los individuos sensibles de una población.

Para poder alcanzar estos fines se ha de realizar una búsqueda adecuada y un diseño de los biomarcadores y de los medios biológicos a estudiar. El diseño del muestreo biológico consiste en seleccionar el medio biológico que se va a muestrear, la especie química que se debe analizar y el tiempo al que se debe tomar la muestra, todo ello con la finalidad de recoger los datos apropiados y para poder hacer, además, un seguimiento de los pacientes. Las características químicas y analíticas que deben poseer los biomarcadores se resumen en:

- especificidad y sensibilidad;
- facilidad del muestreo (evitar, cuando sea posible, el empleo de técnicas invasivas) y representatividad;
- cinética de formación bien conocida y establecida;
- estabilidad.

Es necesario que las condiciones de muestreo proporcionen observaciones de valores representativos del biomarcador en el organismo. La selección del medio más adecuado para la toma de muestra dependerá, en cada caso, del balance entre ventajas e inconvenientes.

Los tipos de muestras más comúnmente analizadas son la orina, la sangre y el cabello. En la Figura 1 se resumen las características idóneas que deben presentar los biomarcadores.

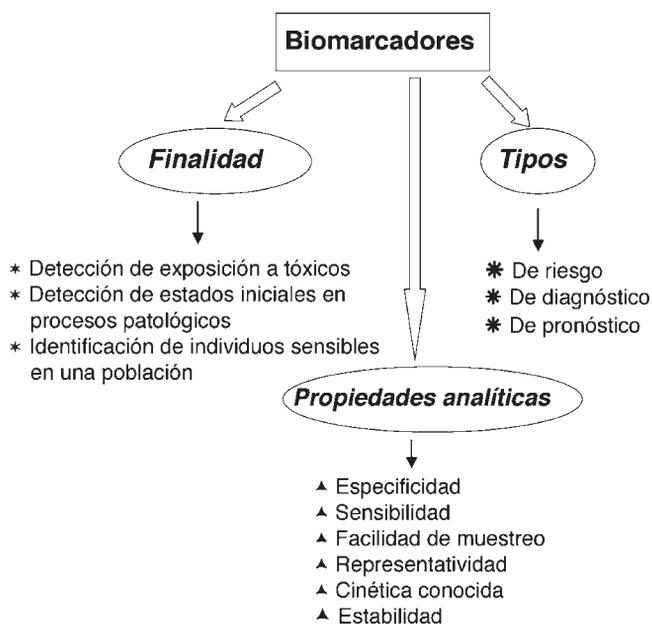


FIGURA 1. Esquema de las características de un biomarcador ideal.

El estudio de las patologías que originan mayor número de muertes al año en países desarrollados establece una serie de parámetros biológicos que se ven alterados como consecuencia de ellas y que ayudan y

sirven de base para el diagnóstico, el pronóstico y la terapéutica de las mismas; estos parámetros biológicos indicativos de las diversas patologías son los biomarcadores. En la Figura 2 se muestra de manera esquemática los biomarcadores para la detección de algunas de las patologías con mayor afectación en la población, de lo que viene a denominarse el mundo desarrollado, este es el caso de las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, tumorales y patologías derivadas de la exposición a determinados agentes tóxicos.

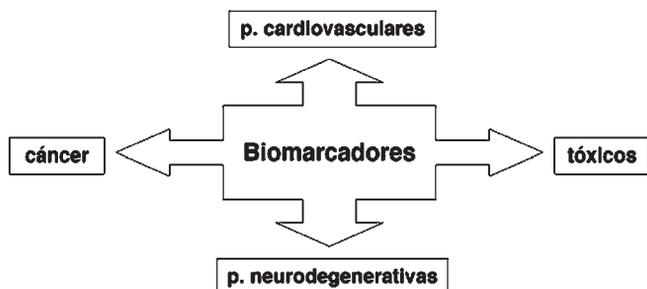


FIGURA 2. Esquema de las enfermedades y patologías para las que se conocen biomarcadores.

Debido a los hábitos de vida, la exposición a agentes tóxicos perjudiciales para la salud, las mutaciones, la herencia genética y el avance de la farmacología, hoy en día se diagnostican nuevas patologías antes desconocidas o con poca prevalencia. Así, por ejemplo, se sabe que el daño celular que producen las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ser de elevada magnitud, por otra parte la aparición de patologías asociadas a las ROS puede ser muy variada (problemas cardiovasculares, neurodegenerativos, tumorales...); este hecho tiene como consecuencia la búsqueda de nuevos biomarcadores y, además, el desarrollo y utilización de técnicas analíticas más sensibles, selectivas y que proporcionen resultados fiables y robustos. En este escenario sujeto a continuas modificaciones hay que considerar que los parámetros anormales de algunas patologías pueden cambiar y que los métodos para su detección también lo hacen con el fin de conseguir la determinación de bajas concentraciones y unos valores representativos del valor exacto del marcador.

Si se comparan el número de trabajos científicos centrados en la determinación de biomarcadores para las patologías más frecuentes recogidas en la Figura 3, en el periodo de 2003 a 2008, se puede apreciar

que, en valor absoluto, ha aumentado el número de trabajos que describen la determinación de biomarcadores para las distintas patologías. Por otra parte, si se considera el porcentaje relativo de los biomarcadores para las patologías con mayor índice de mortalidad, se puede apreciar en la Figura 3 que los marcadores del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares siguen siendo los más estudiados y que debido al aumento de la esperanza de vida de la población ha aumentado la investigación de enfermedades que tienden a aparecer en edades tardías, como son las neurodegenerativas, descubriendo nuevos biomarcadores para ellas.

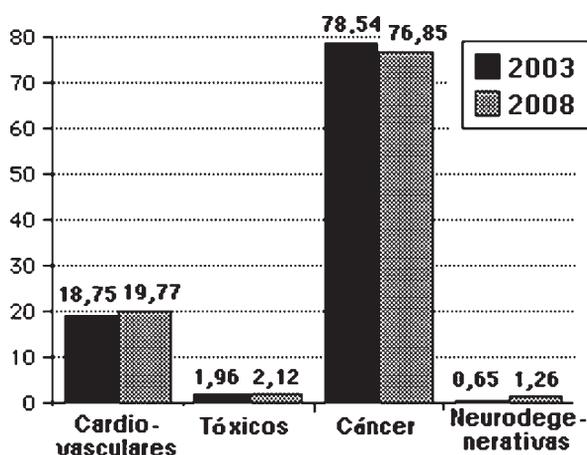


FIGURA 3. *Evolución en el periodo 2003-2008 de los biomarcadores descritos para diferentes patologías. Valores establecidos en término de porcentaje según los resultados de la revisión bibliográfica de varias bases de datos.*

2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

Del elevado número trabajos que describen el empleo de biomarcadores, las técnicas de luminiscencia sobresalen por su extraordinaria sensibilidad, por lo que su empleo resulta muy adecuado para la determinación de biomarcadores en concentraciones muy bajas. Por otra parte, las reacciones inmunoanalíticas conllevan una gran especificidad, propia de la reacción enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo. El empleo de este tipo de reacciones, utilizando detección luminiscente o quimioluminiscente, satisface los requerimientos de selectividad y sensibilidad que

deben poseer los métodos analíticos que se empleen en el análisis de biomarcadores.

En general, puede afirmarse que las determinaciones analíticas más comunes para detectar biomarcadores en muestras biológicas se agrupan en tres tipos generales de ensayos: biológicos, fisicoquímicos e inmunoanalíticos.

Las *técnicas inmunoanalíticas*, como se ha mencionado anteriormente, poseen una gran sensibilidad y selectividad. La selectividad es una característica imprescindible para estas determinaciones, ya que de esta manera se evitan resultados erróneos (falsos positivos y falsos negativos). Por otra parte, la sensibilidad para la detección de biomarcadores en muy bajas concentraciones permitirá la detección de patologías en sus primeras fases contribuyendo a la detección precoz de enfermedades.

Las técnicas inmunoanalíticas se basan en reacciones antígeno-anticuerpo y/o enzima-sustrato, que permiten estudiar una gran cantidad de moléculas. Según la propiedad fisicoquímica que se evalúe (absorción o emisión de radiaciones electromagnéticas (REM), o medida de las radiaciones ionizantes emitidas por isótopos radiactivos) se clasificarán las diferentes metodologías inmunoanalíticas.

Las técnicas más habituales y populares en las que se mide la absorción de REM por parte del complejo coloreado desarrollado en la reacción inmunoanalítica, son: ELISA, EIA, MEIA, siendo el *enzimoinmunoanálisis* (ELISA) la más utilizada y mejorada con el paso del tiempo. En estas reacciones se presentan tres elementos constantes (analito, conjugado y sustrato) que, en función de cómo se combinen, generan los distintos tipos de ensayos. En la mayoría de los casos se utilizan enzimas como marcadores inmunoquímicos, sobre todo: peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y β -galactoxidasa. Se adiciona a la muestra un conjugado de enzimas unidas covalentemente a anticuerpos específicos para esos antígenos. Se adiciona después un sustrato, que es un anti-anticuerpo dirigido contra el anticuerpo de la especie analizada. La reacción de la enzima marcadora del conjugado con el sustrato produce compuestos coloreados que absorben luz. La cantidad de REM absorbida y, por tanto, de complejo formado estará en función de la cantidad de antígeno presente en la muestra. Estas metodologías son rápidas, con buena sensibilidad y especificidad y una muy buena respuesta cuan-

titativa. Sin embargo, a pesar de estar comercializadas para muchos análisis, no es posible cuantificar un elevado número de biomarcadores debido a la falta de enzimas específicas.

Las *técnicas radioinmunoanalíticas* utilizan isótopos radioactivos. Cada vez tiene más importancia el estudio de los radioisótopos presentes en el medio ambiente (contaminación radioactiva), ya que niveles elevados de éstos afectan tanto a la salud humana como al medio ambiente. En consecuencia, la medida directa de la radiactividad ambiental constituye en sí misma un biomarcador de exposición a agentes tóxicos.

Por otra parte, se puede emplear el radioinmunoanálisis (RIA) como una técnica inmunológica con gran aplicación en clínica, detectando antígenos o anticuerpos en líquidos biológicos, utilizando como marcadores algunos radioisótopos (H^3 , C^{14} y I^{125}). En la modalidad más empleada se añade antígeno marcado radiactivamente (Ag^*), la muestra con el antígeno a estudiar y anticuerpo específico y afin (que produzca una unión estable) a ese antígeno. A mayor concentración de antígeno no marcado, mayor formación de complejos antígeno-anticuerpo no marcados, y menor formación de complejos radiactivos (Ag^*-Ac). Tras la reacción, se mide la radioactividad de las fracciones unida y libre para poder calcular la concentración de Ag en la muestra problema. Cabe destacar que estas técnicas son rápidas, sencillas y cuantitativas. Además, su alta sensibilidad permite la cuantificación de los biomarcadores en concentraciones de pg/mL a ng/mL , incluso en muestras complejas sin necesidad de pretratamiento. No obstante, la utilización de marcadores radiactivos, que tienen corta semivida, conlleva elevados costes de inversión en instalaciones, riesgo en su manipulación y dificultad en la eliminación de los desechos radiactivos.

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE LUMINISCENCIA EN LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES

3.1. Técnicas de medida de fluorescencia directa y de imagen

Como se expondrá más adelante, los dispositivos para la medida de la fluorescencia *in situ* de células y tejidos han evolucionado muy rápidamente en los últimos años. Es conocido que la acidificación del pH de determinados orgánulos se asocia con distintos procesos patológicos.

Así, los lisosomas de las células tumorales tienen pH inferior que los de las células normales, mientras que para otros tipos de lisosomas de células tumorales se ha descrito el efecto contrario. Algunos derivados de acridinio y de antraceno (Figura 4A) se emplean con tal finalidad. Mediante el empleo de microscopía confocal con barrido de láser y citometría de flujo y gracias al diseño de los derivados fluorescentes de acridona unidos a los cavitandos (Figura 4B) capaces de alojar en su interior Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , es posible la detección de la anoxia inducida por la entrada masiva de Na^+ en las neuronas o si el transporte del Na^+ se ve alterado en procesos patológicos del colon. Los aniones, entre ellos los cloruros, se pueden detectar por el marcado efecto de amortiguación de fluorescencia (*quenching*) que ejercen sobre numerosos fluoróforos. Algunos marcadores como el yoduro de 6-metoxi-*N*-etilquinolinio (MEQ) (Figura 4C), permiten estudiar la respuesta del receptor a la variación de la concentración de Cl^- , mediante la visualización de las neuronas a través de microscopía confocal. Así, mediante un procedimiento no invasivo, se hace llegar a las células el derivado reducido, la 6-metoxi-*N*-etil-1,2-dihidroquinolina (DH-MEQ), liposoluble y capaz de atravesar

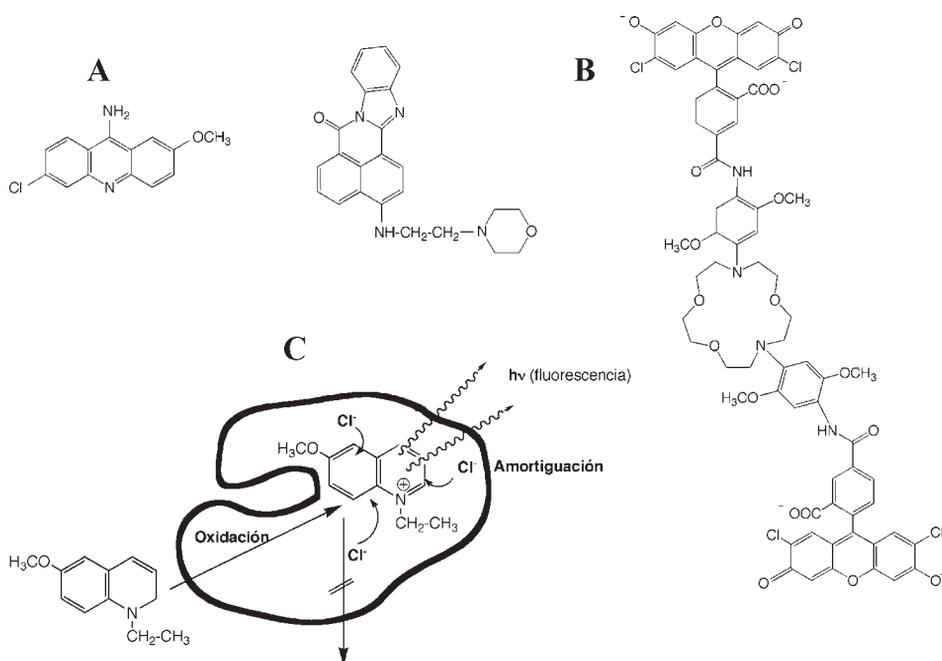


FIGURA 4. Estructuras químicas de sensores químicos utilizados en la detección y visualización de diversas patologías. (A) pH, (B) Cationes, (C) Aniones.

la membrana celular. Una vez en el interior de las células la DH-MEQ se oxida rápidamente a MEQ portador de carga, lo que hace que quede atrapado en el citoplasma celular y experimente el efecto de *quenching* debido a la presencia de los aniones cloruro.

Utilizando un microscopio óptico de fluorescencia, se aplica luz UV a través del filtro de excitación para visualizar reacciones inmunológicas en el portaobjetos (Figuras 5A y 5B) utilizando como marcadores fluorescentes la fluoresceína (emite luz verde) y la rodamina (luz roja) (2). El empleo de determinados marcadores fluorescentes permite distinguir células vivas de células muertas y también diferenciar células normales de otras presentes en tejidos deteriorados o que presentan determinadas patologías. También se han introducido otras técnicas para la visualización de células eucariotas tumorales como alternativa a los clásicos

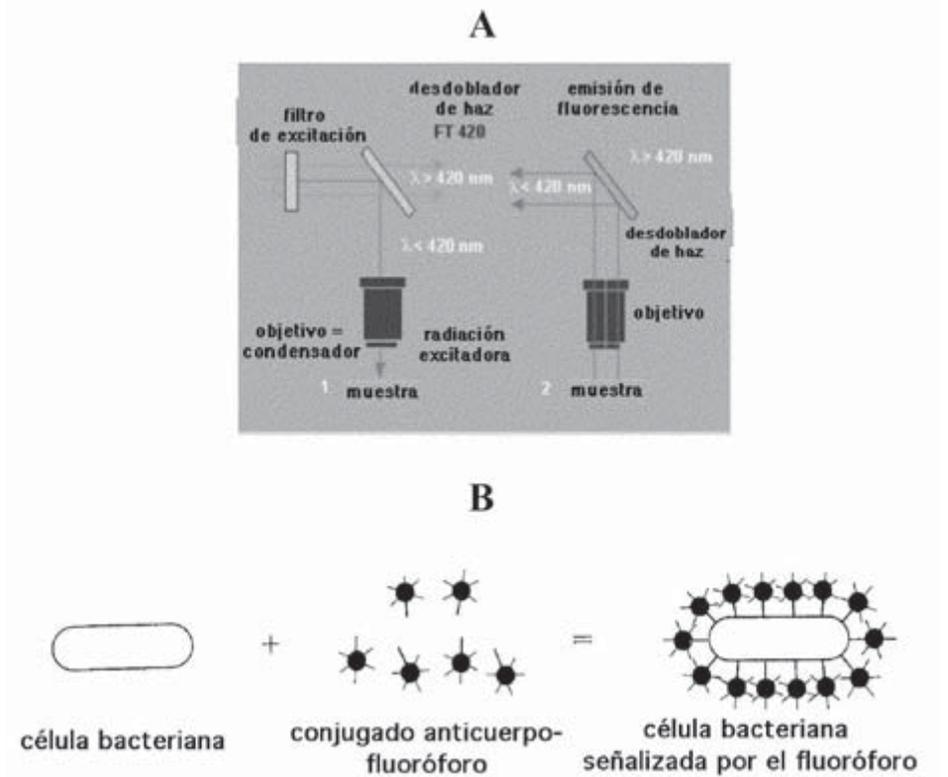


FIGURA 5. Esquema de un microscopio óptico de fluorescencia (A). Reacción de marcaje fluorescente para la visualización de microorganismos al microscopio (B).

ensayos citogenéticos. Así, el estudio y análisis de biomarcadores para células cancerosas mediante el análisis de la fluorescencia por hibridación *in situ* (Fluorescence in Situ Hybridization, FISH), permite analizar células en la interfase, mediante el empleo de una gran variedad de marcadores de fluorescencia para ADN (3). El ADN señalizado con un marcador fluorescente apropiado, posibilita el estudio de los núcleos en la interfase del ciclo celular, pudiendo observar directamente al microscopio y en tiempo real el proceso de división celular.

3.2. Técnicas de separación con detección luminiscente en el análisis de biomarcadores

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) permite la separación de los componentes de una muestra basada en la distribución de los mismos entre dos fases inmiscibles: una estacionaria y otra móvil. La cromatografía de líquidos se emplea acoplada a un detector fluorimétrico para identificar moléculas que emiten señal fluorescente, por fluorescencia nativa o inducida por marcaje (derivatización). Entre las ventajas analíticas que posee esta técnica puede subrayarse su rapidez, sensibilidad y amplio intervalo de linealidad.

La electroforesis capilar de zona (CZE) posibilita la separación de los componentes de una muestra en función de su relación carga/masa al aplicar un campo eléctrico elevado ($V = 20\text{-}30\text{ kV}$) en un medio líquido. En el interior del capilar se genera el flujo electroosmótico que propulsa y conduce a todos los componentes de la muestra, cargados o no, hacia el detector. Se aplica, entre otros, para el fraccionamiento de proteínas séricas, urinarias y de líquido cefalorraquídeo, la demostración de variantes de hemoglobinas, cuantificación de lipoproteínas, *screening* de drogas y diagnóstico molecular de enfermedades genéticas. Puede afirmarse que es una técnica rápida, que posibilita el empleo de poca cantidad de muestra y de reactivos y es útil para separar analitos de muy diverso peso molecular, neutros o cargados.

En estas técnicas de separación se emplea habitualmente la fluorescencia como sistema de detección por su excelente sensibilidad. Además, es frecuente la utilización de reactivos fluorogénicos y *reacciones de derivatización fluorescente* mediante las que se induce fluorescencia

en compuestos que no poseen esta propiedad. De esta manera es posible la determinación de compuestos no fluorescentes en bajas concentraciones mediante la medida de la fluorescencia inducida por los fluoróforos introducidos. Así pues, y tras la separación en el sistema (cromatografía o electroforesis) se logra una buena selectividad, se evitan las interferencias de los principales compuestos mayoritarios presentes en muestras biológicas (proteínas, ácidos nucleicos...) y se alcanza la sensibilidad requerida debido a la emisión de radiaciones electromagnéticas por los analitos electrónicamente excitados (mediante la absorción de radiaciones electromagnéticas). Tanto la cromatografía de líquidos (HPLC) como la electroforesis capilar (CZE) con detección fluorescente permiten la separación e identificación de los aductos carcinógeno-ADN, tal es el caso de los aductos que forman las aflatoxinas con el ADN; los resultados obtenidos con técnicas luminiscentes se comparan con los obtenidos por espectrometría de masas. Como es bien sabido, las aflatoxinas son muy fluorescentes y está bien establecido su relación con el cáncer de hígado (4).

La *quimioluminiscencia* se produce mediante la generación de especies electrónicamente excitadas en el transcurso de diversas reacciones químicas que, en general, implican oxidación. Ocurre cuando uno de los productos intermedios o finales de una reacción es quimioluminiscente y, por tanto, emite radiaciones electromagnéticas al desactivarse, pasando de estado excitado a estado fundamental. La medida de la quimioluminiscencia directa puede realizarse con un luminómetro, que desde un punto de vista económico es más accesible que un fluorímetro.

La mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son de tipo oxidativo. En ellas se oxida un sustrato. Por ello, los compuestos quimioluminiscentes se utilizan, junto con sustratos oxidables y con oxidantes como O_2 , peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ATP y NADH(H) y así es posible medir la concentración de componentes de las reacciones quimioluminiscentes (NADH, FMN, aldehídos, oxígeno...), o como indicadores de sustratos o enzimas que participan en reacciones en las que se produce o consume alguno de los componentes de la reacción luminiscente (deshidrogenasas, aminotransferasas, malato, oxalacetato, glucosa y otros).

Algunos compuestos luminiscentes que participan en muchas reacciones son:

- **Luminol** (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) y sus derivados. Sus características luminiscentes dependen mucho de la posición del grupo amino. Precisan de un oxidante fuerte (H_2O_2 , O_2 , ClO^- o MnO_4^-), y para conseguir la máxima eficacia necesitan un catalizador o cooxidante (Cu^{2+} , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ o el grupo hemo). El grupo hemo es su catalizador más eficaz, y el mejor medio es el tampón de carbonato, con un pH óptimo cercano a 11 (Figura 6A).
- **Ésteres de acridinio.** Estos derivados presentan ventajas con respecto al luminol, ya que la reacción quimioluminiscente se produce sólo con H_2O_2 en medio alcalino. En ella se produce su destrucción oxidativa originándose N-metilacridona en estado excitado (Figura 6B). Se emplea mucho para marcar proteínas en inmunoanálisis. Presentan una especificidad muy alta.
- **Lucigenina.** Se oxida por el H_2O_2 en disolución básica en presencia de iones metálicos que actúan como catalizadores, tal es el caso del Pb^{2+} . Se emplea en una reacción enzimática en la que participa la enzima xantina-oxidasa.

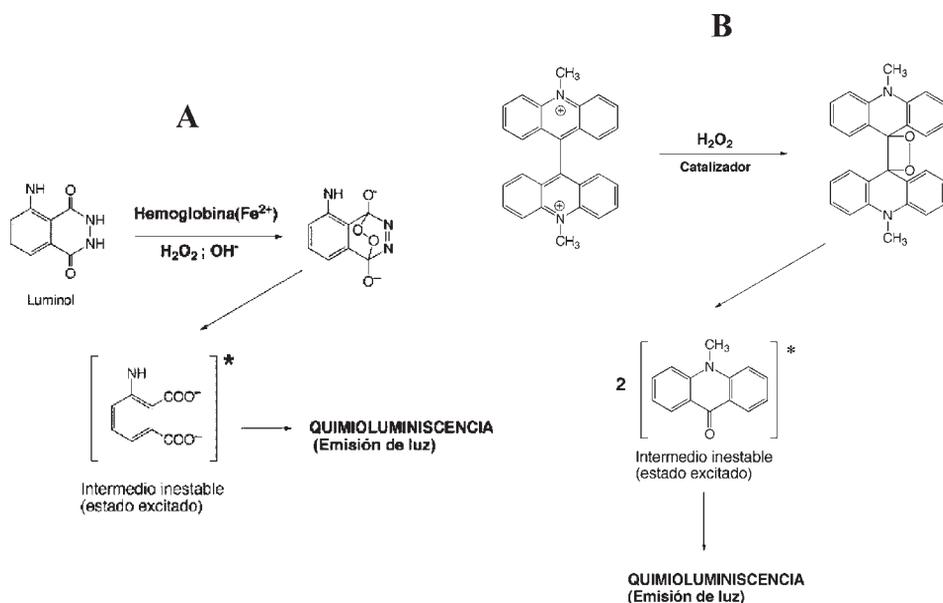


FIGURA 6. Reacción quimioluminiscente del luminol (A) y de los derivados de N-metil-acridinio (B).

Las reacciones quimioluminiscentes se utilizan con éxito para la detección sensible de analitos de interés en clínica tras su separación por cromatografía de líquidos (5).

Ventajas: estabilidad de los compuestos quimioluminiscentes, bajo límite de detección y elevada especificidad. Esta metodología es sencilla, rápida y con gran intervalo de respuesta lineal, además de no requerir instrumentación sofisticada.

Desventajas: las enzimas empleadas como marcadores que catalizan reacciones quimioluminiscentes pueden inactivarse durante las reacciones de marcaje. Sólo podrán marcar antígenos de bajo peso molecular.

3.3. Técnicas fluoroinmunoanalíticas (FIA)

El empleo de marcadores fluorescentes en inmunoanálisis con bajo límite de detección, ha conseguido que esta técnica (FIA) reemplace al radioinmunoanálisis (RIA) en muchos casos.

Casi siempre se emplea para la detección de anticuerpos. La señal fluorescente del complejo antígeno-anticuerpo formado puede ser originada por un fluoróforo unido covalentemente al antígeno añadido o por un sustrato que enzimáticamente se convierte en un producto fluorescente.

Una manera de mejorar la sensibilidad de las reacciones fluoroinmunoanalíticas consiste en inmovilizar los reactivos en soportes sólidos. Es frecuente la utilización de fluoroinmunoanálisis heterogéneos en los que intervienen lantánidos y sus quelatos. Para estas reacciones se utilizan como marcadores fluorescentes *quelatos de metales*, en especial del europio, Eu (III), y del terbio, Tb (III). Estos iones presentan la particularidad de tener rendimientos cuánticos elevados y, además, se caracterizan por presentar tiempos de vida de los estados excitados largos (100-1000 μ s), siendo muy eficaces los procesos de transferencia de energía del primer estado de singulete excitado al primer estado de triplete excitado con un amplio desplazamiento de Stokes. Todo ello tiene como consecuencia el que se puedan llevar a cabo las medidas de los productos de la reacción fluoroinmunoanalítica mediante resolución temporal con extremada sensibilidad y exenta de interferencias. Por ello, esta metodología es muy adecuada para la detección de α -fetoproteína (6).

4. BIOMARCADORES PARA PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

El síndrome coronario agudo es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial que abarca una gran variedad de procesos patológicos desde la inflamación y problemas vasculares a un amplio abanico de reacciones bioquímicas en los que la presencia de ROS (**R**eac-tive **O**xxygen **S**pecies, especies reactivas de oxígeno) desempeña un papel fundamental. En la práctica clínica es habitual la determinación de tropo-nina y creatinquinasa como biomarcadores que alertan sobre posibles problemas tromboembólicos. El cambio en los procesos de agregación plaquetaria constituye un biomarcador de riesgo de síndrome coronario. El grado de agregación plaquetaria se puede determinar mediante citome-tría de flujo marcando las plaquetas de enfermos tratados con aspirina, con un marcador fluorescente apropiado y también mediante un fluoroin-munoanálisis, valiéndose del isotiocianato de fluoresceína como marca-dor fluorescente. Los resultados obtenidos mediante ambas metodologías aparecen bien correlacionados y demuestran que el cambio en el grado de agregación plaquetaria está relacionado con el receptor de la glicopro-teína VI (7).

La presencia del anión superóxido y otras ROS constituyen una espa-da de doble filo para el organismo. Así, por una parte, estas especies cons-tituyen un sistema de señalización celular que pone en marcha los meca-nismos de defensa antimicrobianos relacionados con los fagocitos, pero, al mismo tiempo, los niveles elevados de ROS producen daños celulares que se traducen en patologías cardiovasculares, cancer, diabetes y enve-jecimiento celular rápido. Dado que el conjunto de lesiones y patologías originadas por la presencia de ROS no se puede asociar únicamente con la arterioesclerosis y las patologías cardiovasculares, sin embargo, hemos considerado oportuno incluirlo en este apartado, ya que es frecuente el empleo de técnicas de luminiscencia para su determinación.

El óxido de nitrógeno (NO) es una especie gaseosa, que actúa como regulador en numerosos procesos biológicos. El grupo NO reacciona con aniones superóxido, dando lugar a especies de nitrógeno oxidadas que son igualmente reactivas junto con las denominadas ROS. Así, los resi-duos de tirosina en las proteínas, debido a la presencia de ROS, originan diferentes isómeros de nitro-tirosina (*o*-, *m*- y *p*-). La presencia de estos

compuestos está íntimamente ligada con la arterioesclerosis y otros desórdenes que pueden desembocar en patologías cardiovasculares. Estos compuestos se pueden determinar mediante HPLC-UV, ya que la presencia de los grupos nitro amortigua la fluorescencia de la tirosina (8), impidiendo su análisis por HPLC-fluorescencia.

De este modo se han determinado en cultivos celulares la presencia o el incremento de los niveles de determinados biomarcadores del estrés oxidativo, como por ejemplo: 3-nitrotirosina, catalasas y superóxido dismutasa. Mientras que la 3-nitrotirosina se determina mediante un fluorinmunoanálisis competitivo, tanto catalasa como superóxido dismutasa se pueden cuantificar mediante un fluoroinmunoanálisis no competitivo de los denominados «tipo sandwich». La metodología propuesta requiere menos de 1 μ L de muestra, con un límite de detección muy bajo, y en un tiempo de análisis corto (45 min) se pueden cuantificar 96 muestras mediante lectura en microplaca (9). Utilizando también cultivos celulares como: HepG2, LLC-PK1 y un sistema lector de microplacas se puede determinar la generación de especies reactivas de oxígeno y la captación celular del oxígeno, determinando la variación de la fluorescencia de sensores químicos hidrosolubles sensibles al oxígeno (10).

Los F_2 -isoprostanos se originan por oxidación de los fosfolípidos celulares debido a la presencia de radicales libres, por ello, son unos buenos biomarcadores del estrés oxidativo. Estos compuestos se determinan mediante reacción de derivatización fluorescente con el reactivo 1-pirenildiazometano, de esta manera los ésteres formados se separan y cuantifican por HPLC con detección fluorescente con una gran sensibilidad (5-10 pg) (11). Entre otros compuestos biomarcadores indicativos del estrés oxidativo y de las consecuencias que de ello se derivan puede citarse la determinación del malonaldialdehído por HPLC con detección fluorimétrica mediante derivatización con dansilhidrazina. Los resultados obtenidos son comparables con los de HPLC acoplada a espectrometría de masas (12).

5. BIOMARCADORES PARA PATOLOGÍAS ASOCIADAS A PROCESOS CANCEROSOS

Las metodologías clásicas encaminadas a establecer el origen citogénico de los tumores han encontrado en su desarrollo numerosas dificul-

tades. Entre ellas puede señalarse la dificultad de llevar a cabo los cultivos celulares de células tumorales, la contaminación de éstos, el tiempo necesario de espera para lograr el crecimiento celular y, en muchas ocasiones, a pesar de la espera la obtención de un número insuficiente de células. Uno de los ensayos más simples de análisis citogenético consiste en el estudio de los linfocitos sanguíneos. Así, es bien conocido que el daño celular por exposición a determinados agentes tóxicos ocasiona daños en los linfocitos del torrente circulatorio. Sin embargo, esta prueba es muy inespecífica; por ello, la posibilidad de disponer de marcadores fluorescentes que se unan a los cromosomas de las células patológicas da lugar a una metodología muy selectiva, como el ya mencionado análisis de la fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH). Mediante esta técnica de marcaje fluorescente de los cromosomas se ha podido evidenciar con gran sensibilidad las alteraciones cromosómicas (13) para individuos expuestos a diversos agentes como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), acrilonitrilo, 1,3-butadieno y etilbenceno, todos ellos compuestos relacionados con procesos cancerosos.

Se están realizando notables esfuerzos encaminados a establecer unas directrices comunes que permitan evidenciar los efectos citotóxicos de diversos agentes cancerígenos. La mayoría de los agentes cancerígenos que causan daño en el ADN forman algún tipo de aducto con él. Una de las formas de evidenciar estos aductos y poner de manifiesto el daño celular y en el ADN es mediante el denominado *single cell gel electrophoresis/Comet assay*. En este análisis se procede a la separación del ADN por electroforesis en gel, el grado de afectación se evidencia por la modificación en la movilidad electroforética para los aductos-ADN con respecto las referencias de ADN no dañado (14).

Otros estudios clásicos de hemotoxicidad y citotoxicidad han puesto de manifiesto que la exposición a formaldehído produce daños cromosómicos y alteraciones en el ADN en personas que han mantenido un contacto prologado con este agente. En numerosos casos se ha podido correlacionar con la aparición de tumores malignos (15).

La expresión de algunas proteínas como las aurora kinasas se modifica en el caso del cáncer de ovario, por ello, estas enzimas pueden ser un biomarcador de pronóstico válido en la detección de este tipo de cáncer. La modificación de sus niveles se puede evaluar mediante marcaje fluorescente inmunohistoquímico. Los resultados obtenidos mediante estas

técnicas inmunohistoquímicas se han comparado con las técnicas de hibridación de fluorescencia FISH (16).

El carcinoma hepatocelular o hepatoma es uno de los tipos de cáncer primario más comunes y es responsable aproximadamente de un millón de muertes anuales en el mundo. Recientemente se ha identificado la proteína Hcc-2 que se expresa en los tejidos afectados de aquellos individuos que padecen este tipo de patología. La identificación de esta proteína se ha realizado mediante separación por electroforesis en gel bidimensional (2DGE) y caracterización de la misma mediante espectrometría de masas con ionización por desorción en matriz asistida por láser y detección con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Por otra parte, la localización de esta proteína en las células afectadas se lleva a cabo mediante microscopía de fluorescencia confocal empleando un marcador fluorescente adecuado y de gran sensibilidad (17).

Está bien establecido que el cáncer de próstata en la mayoría de los casos tiene un origen multifocal, por ello, cada día es más frecuente la utilización de técnicas especializadas de cultivo celular encaminadas a detectar alteraciones cromosómicas. Se ha descrito una buena correlación genotipo-fenotipo en los tumores de próstata estudiados mediante FISH (18).

6. BIOMARCADORES PARA PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA EXPOSICIÓN A AGENTES TÓXICOS

En la actualidad el interés por preservar el medio ambiente es elevado, dado el conocimiento que se tiene de las consecuencias que para la naturaleza tiene la actividad humana, tanto a nivel industrial como agrícola, e incluso los mismos residuos producidos a nivel urbano o rural. Por ello, algunas líneas de investigación se centran en la búsqueda de biomarcadores que indiquen la presencia de compuestos tóxicos en el medio ambiente, o bien, que hayan producido algún cambio en los animales, plantas o el ser humano al haber entrado dichos compuestos en la cadena trófica.

Entre los agentes tóxicos de tipo inorgánico destacan los metales pesados. Un buen biomarcador de la exposición a metales pesados, entre otros Cd, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, son las proteínas de bajo peso molecular

(≈ 7 kDa) denominadas metalotioneínas. Estas pequeñas proteínas juegan un papel fisiológico crucial en muchos seres vivos, tales como la homeostasis de elementos esenciales (Cu o Zn), la eliminación de metales tóxicos (Ag, Cd, Co, Hg, Ni, Pb), y la protección frente al estrés oxidativo, ya que los metales de transición son capaces de convertir el O_2 en especies de oxígeno reactivas (ROS) que atacan a muchas biomoléculas, como pueden ser los ácidos grasos. Romero-Ruiz y col. (19) han optimizado un método cromatográfico en fase inversa (RP-HPLC) con detección fluorimétrica y derivatización precolumna utilizando monobromobimano como agente derivatizante para la cuantificación de metalotioneínas en moluscos bivalvos (*S. plana*), para el seguimiento en el área del Parque Nacional de Doñana de la contaminación por metales pesados, producida en abril de 1998, en el río Guadiamar (afluente del río Guadalquivir) tras el vertido de las aguas residuales de la mina de Aznalcóllar. La cuantificación de las metalotioneínas es una buena herramienta analítica para monitorización de nuestros ríos, lagos y demás aguas superficiales y para su vigilancia frente a la contaminación por metales pesados.

Otro elemento inorgánico de reconocido carácter tóxico es el arsénico. Fuentes de exposición a este elemento pueden ser los alimentos, aunque su principal vía de intoxicación es el agua de bebida. El arsénico total puede ser determinado con muy buenos límites de detección mediante espectrofluorimetría atómica utilizando la generación de hidruros para introducir la muestra previa digestión ácida, si bien la activación neutrónica también es una técnica de elección (20). Como muestras se pueden utilizar los fluidos biológicos, sangre y orina, pero dado el pequeño tiempo de residencia del As en la orina (3-4 días) y en la sangre (2-3 horas), estas muestras se utilizarán como biomarcadores de una exposición reciente. Si se busca un biomarcador para exposiciones a largo plazo o crónicas, se tiene que recurrir a otros tipos de muestras, como pelo, piel o uñas, ya que son tejidos que acumulan los metales pesados durante su crecimiento. Entre todas ellas, las que menor riesgo de contaminación exterior tienen y, por tanto, son un biomarcador ideal para indicar una exposición crónica a As proveniente del agua de bebida, son las uñas de los dedos del pie.

Los compuestos policíclicos aromáticos (PACs) son moléculas orgánicas de gran impacto ambiental por su toxicidad, persistencia y su amplia distribución en el medio ambiente. Dentro de los PACs se inclu-

yen las dioxinas (dibenzo(*p*)dioxinas), los hidrocarburos policlorados, los dibenzofuranos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), todos estos compuestos se acumulan en los tejidos grasos. Los compuestos con más de tres anillos aromáticos pueden ser carcinogénicos y/o mutagénicos. Además, pueden transferirse desde el agua a los sedimentos y a los alimentos y, a través de ellos, a la cadena trófica (21). Se pueden utilizar los metabolitos de los PACs como biomarcadores de la exposición a estos compuestos en los organismos marinos. Los peces, sobre todo, a través de su piel o de sus agallas pueden absorber estos compuestos, además de la alimentación y los sedimentos marinos. Así, da Silva y col. (22) han cuantificado los metabolitos de naftaleno, fenantreno y benzo[*a*]pireno mediante RP-HPLC con detección fluorescente en muestras de bilis provenientes de catorce especies de peces para monitorear de forma conveniente y relativamente rápida la exposición y contaminación por PACs de las costas de Brasil.

La principal causa de la ingesta de dioxinas en el hombre está relacionada con la cadena trófica, a través de alimentos de origen animal que previamente han estado expuestos a ellas en su entorno. Para el control de la presencia de dioxinas en alimentos (23), se ha propuesto un método basado en la espectrofluorimetría y la quimiometría (*chemometrics*) para un *screening* ultrarrápido (inferior a dos minutos) y no invasivo.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), se utilizan como biomarcadores de su exposición en el hombre sus metabolitos en la orina, 1-OHP (1-hidroxipireno) y 1-OHPG (glucurónido de 1-hidroxipireno). Puesto que 1-OHPG es el metabolito mayoritario y es de tres a cinco veces más fluorescente que el 1-OHP es el biomarcador ideal para indicar casos de exposiciones moderadas a PAHs. Para su cuantificación se pueden utilizar varios métodos en los que la detección se lleva a cabo mediante medida de la fluorescencia nativa de estos compuestos, entre ellos: HPLC con detección fluorescente utilizando una columna fenilo, elución en gradiente utilizando mezclas de acetonitrilo y disolución tampón fosfato a pH 3,5; cromatografía de afinidad (CA), utilizando anticuerpos monoclonales 8E11 en la fase estacionaria y los compuestos eluidos son medidos por SFS (*Synchronous Fluorescence Spectrometry*); y un método mixto CA-RP-HPLC con detección fluorescente (24).

Los PAHs son contaminantes ampliamente distribuidos por el medio ambiente, sobre todo los ecosistemas acuáticos, de ahí la gran preocupa-

ción por controlar su presencia en estos medios. Al igual que en el hombre, se pueden utilizar los metabolitos de estas sustancias en los animales marinos para detectar su presencia y origen (25). Además, también se busca la presencia de otras sustancias que pueden coadyuvar la actividad tóxica de los PAHs, como por ejemplo los nitritos (26, 27).

Otro grupo de compuestos de gran impacto medioambiental son los esteroides y sus análogos. Estos compuestos se encuentran en las aguas residuales por acción del hombre y pueden llegar a las plantas y animales y provocar una serie de daños debido a su similitud química con las hormonas sexuales y a su posibilidad de interactuar con el ADN siendo, por tanto, cancerígeno y mutagénico. Entre estos compuestos se encuentra el 17-beta-etinilestradiol (EE_2), que es más resistente a la degradación que el esteroide natural 17-beta-estradiol (E_2). Para el control de estas sustancias en la naturaleza se pueden utilizar los peces como bioindicadores, como es el caso del pez cebrá (*Danio rerio*). Para su estudio se utiliza RT-PCR cuantificando mediante medidas de fluorescencia (28).

Otra utilidad de los biomarcadores es descubrir adulteraciones en los alimentos, medicamentos o plantas medicinales. Cada país dicta sus normas sobre las sustancias aptas para el consumo, que habitualmente se van trasladando y asumiendo por todo el mundo. Tal es el caso de las sustancias fenfluramina, norfenfluramina y N-nitrosfenfluramina, utilizadas para el control de la obesidad, pero que ha sido prohibido su uso por las graves consecuencias para la salud que conlleva, como daño cardiovascular, hepático o pulmonar. Sin embargo, todavía pueden ser encontradas en algunas plantas medicinales o productos dietéticos. Para el control de N-nitrosfenfluramina (responsable del daño hepático y que es cancerígeno) puede usarse como biomarcador el pelo, analizando el contenido de fenfluramina y norfenfluramina mediante RP-HPLC con detección fluorimétrica tras derivatización precolumna con DIB-Cl (29). Este método proporciona una muy buena sensibilidad y un buen límite de detección, ya que la concentración de estas sustancias en el pelo es baja, pero aporta, como en el caso del arsénico anteriormente comentado, información sobre un consumo continuado.

7. BIOMARCADORES PARA PATOLOGÍAS ASOCIADAS A ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En el caso de los procesos cancerosos está bien establecido en estudios epidemiológicos que la exposición a determinados factores ambientales de riesgo, así como otro tipo de factores genéticos en un gran número de casos conlleva el padecer esta patología. Sin embargo, en el caso de las enfermedades neurodegenerativas no se puede establecer una relación tan nítida causa-efecto. Así, estudios epidemiológicos en grupos familiares han permitido establecer la presencia en común en estos individuos de genes que predisponen a padecer cáncer y que cuando se alteran desencadenan la enfermedad. Por el contrario, en el caso de la enfermedad de Párkinson, como ejemplo de enfermedad neurodegenerativa, el 85% de los enfermos que la padecen no tienen antecedentes familiares. Se sabe que la exposición a determinados compuestos capaces de generar radicales libres, o bien, a otros que afectan a los mecanismos de detoxificación química del organismo, así como a determinados factores genéticos ligados a las glutatión transferasas y al grupo del citocromo P450 predisponen a padecer el síndrome parkinsoniano. En la Tabla I se presenta una comparación de los factores de riesgo que desencadenan procesos cancerosos y neurodegenerativos (30).

TABLA I. Comparación entre los factores de riesgo conocidos para patologías neurodegenerativas y cáncer (Tomado de ref. 30)

<i>P. Neurodegenerativas</i>	<i>P. Cancerosa</i>
<i>Ambientales</i>	
Radicales libres (manganeso, paraquat) Electrófilos (óxido de etileno, <i>n</i> -hexano)	Tabaco Dietas ricas en grasas
	Exposición a factores de riesgo laboral y ambiental
<i>Genéticos</i>	
<i>Genes causantes:</i> APP, PS1 PS2, α -SYN	<i>Genes causantes:</i> Rb, p53, BRCA1, WT1
<i>Genes de susceptibilidad:</i> APOE, GSTP1, CYP2D6	<i>Genes de susceptibilidad:</i> CYP1A1, GSTM1, NAT2

Algunas proteínas que son expresadas en el cerebro, incrementan sus niveles cuando el organismo se ve sometido a diferentes situaciones límite y especialmente en el caso de que aparezcan enfermedades neurodegenerativas. El aumento de los niveles de estas proteínas está también correlacionado con la aparición de anomalías en la composición del líquido cefalorraquídeo, que normalmente van acompañadas de alteraciones en el transporte de estas proteínas a través de la barrera hematoencefálica. Así, las isoformas 14-3-3 β y ζ y diversos fragmentos proteolíticos de la α -spectrina se liberan en procesos de degeneración neuronal. Estas proteínas se han determinado con éxito mediante un enzimo-fluorinmunoanálisis (31) en diversas muestras de líquido cefalorraquídeo y se han correlacionado con el grado de degeneración neuronal.

8. CONCLUSIÓN

Debido a los hábitos de vida, la exposición a agentes tóxicos perjudiciales para la salud, las mutaciones, la herencia genética y, por otra parte, al desarrollo de nuevas metodologías analíticas y al avance de la farmacología, hoy en día se diagnostican nuevas patologías antes desconocidas o con poca prevalencia. Eso hace que los parámetros anormales de algunas patologías puedan cambiar, y que los métodos para su detección también lo hagan con el fin de conseguir la determinación de bajas concentraciones y unos valores representativos del valor exacto del biomarcador.

La luminiscencia (Tabla II) responde a la sensibilidad y especificidad requerida para el análisis de algunas moléculas presentes a bajas concentraciones en los fluidos biológicos. De 2003 a 2008 ha aumentado el estudio de biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y de exposición a tóxicos, mientras que el de cancerígenos ha disminuido sensiblemente, como lo pone de manifiesto la consulta en las bases de datos más utilizadas en la búsqueda bibliográfica. Sería deseable que se pudieran conocer biomarcadores predictivos en los estadios más bajos de las diferentes patologías, o bien, cuando éstas aún no se han desarrollado y, sin embargo, se sospecha su potencial futuro por un claro componente genético. Por todo ello, la investigación en el campo de las metodologías analíticas que permitan la detección sensible y selectiva de estos biomarcadores debe caminar en paralelo con la investigación de aquellos.

TABLA II. Resumen de las patologías, los marcadores que permiten su detección o seguimiento y las técnicas analíticas luminiscentes utilizadas para su determinación

<i>GRUPO DE PATOLOGÍAS</i>	<i>MANIFESTACIÓN: BIOMARCADOR</i>	<i>TÉCNICA ANALÍTICA</i>
<i>Enfermedades cardiovasculares</i>	Ictus isquémico: Dímero-D, BNP	Quimioluminiscencia
	Patología cardiovascular: PCR, interleucinas, estrés oxidativo	Fluorescencia Quimioluminiscencia
<i>Enfermedades derivadas de la exposición a agentes tóxicos</i>	Alteración función tiroidea: PCHs (hidrocarburos aromáticos polihalogenados)	Fluorescencia
	Inmunotoxicología: Metales pesados	Fluorescencia
	Inducción enzimática, proteínas del estrés: Metales pesados, PAHs	Fluorescencia
	Aducto Hb: PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos)	HPLC-Fluorescencia
<i>Enfermedades tumorales</i>	Cáncer próstata: PSA	Quimioluminiscencia
	Cáncer hígado, testículo, ovario: α-fetoproteína	Quimioluminiscencia
	Cáncer ovario, endometrio, pulmón, mama, gastrointestinal: CA 125	Quimioluminiscencia
	Cáncer mama: CA 15.3, CA 27.29, ADNpl fetal	Quimioluminiscencia
	Cáncer colorrectal, pancreático, gastrointestinal, hígado, mama, pulmón: CEA, CA 19.9	Quimioluminiscencia
	Cáncer mama, ovario: BCRA 1, BCRA	Fluorescencia
	Cáncer páncreas, vía biliar, colon, pulmón, vejiga, melanoma: K-ras	Quimioluminiscencia
	Cáncer pulmón: RB y p53	Fluorescencia
<i>Enfermedades neurodegenerativas</i>	Alzheimer: Aβ 1-40, Aβ 1-42, P-tau 231 (en muestra LCR)	Quimioluminiscencia
	Alzheimer: AD7C-NTP (en muestras orina)	Fluorescencia
	Parkinson: Dopamina, p53	Quimioluminiscencia, Fluorescencia

9. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a M. José Calabuig Martínez sus valiosos comentarios y sentido crítico en la confección del manuscrito. Asimismo, desean manifestar su gratitud a Laura Peláez Aguado por su colaboración en la búsqueda bibliográfica; al MEC (CTQ-2006-13351BQU) y a la UCM (Grupos de Investigación 920234/2009) les agradecen su financiación.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Kelloff, G. J. & Sigman, C. C. (2005) New science-based endpoints to accelerate oncology drug development. *Eur. J. Cancer.* **41**: 491-501.
2. Haughland, R. P. (2002) Handbook of Fluorescent Probes, Molecular Probes Inc.
3. Mark, H. F. L. (1999) Fluorescence *in situ* Hybridization Analysis of Biomarkers in Cancer. *Exp. Mol. Pathology.* **67**: 131-134.
4. Farmer, P. B. & Singh, R. (2008) Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.* **659**: 68-76.
5. Gámiz-García, L., García-Campaña, A. M., Huertas-Pérez, J. F. & Lara, F. J. (2009) Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis. *Anal. Chim. Acta.* **640**: 7-28.
6. Schulman, S. G., Hochhaus, G. & Karnes, H. T. (1991) Fluorescence Immunoassay. En: *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis* (Baeyens, W. R. G.; De Kekuleire, D.; Korkidis, K., Eds.), pp. 341-380. Marcel Dekker Inc., Nueva York.
7. Bigalke, B., Geisler, T., Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Kremmer, E., Seizer, P., May, A. E., Lindemann, S. & Gawaz, M. (2008) Platelet collagen receptor glycoprotein VI as a posible novel indicator for the acute coronary syndrome. *Am. Health J.* **156**: 193-200.
8. Du, M., Wu, W., Ercal, N. & Ma, Y. (2004) Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, *o*-, *m*- and *p*-tyrosine in urine samples by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction. *J. Chromatogr. B.* **803**: 321-329.
9. Murphy, B. M., Dandy, D. S. & Henry, C. S. (2009) Analysis of oxidative stress biomarkers using simultaneously competitive/no-competitive micromosaic immunoassay. *Anal. Chim. Acta.* **640**: 1-6.

10. Hynes, J., Hill, R. & Papkovsky, D. B. (2006) The use of fluorescence-based oxygen uptake assay in the analysis of cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro*. **20**: 785-792.
11. Ritov, V. B., Kelley, D. E. & Kagan, V. E. (2002) Derivatization of F₂-isoprostanes with 1-pyrenyldiazomethane and their subsequent determination by fluorescence high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **311**: 10-18.
12. Lord, H. L., Rosenfeld, J., Volovich, V., Kumbhare, D. & Parkinson B. (2009) Determination of malondialdehyde in human plasma by fully automated solid phase analytical derivatization. *J. Chromatogr. B.* **877**: 1292-1298.
13. Sram, R. J., Beskid, O., Binkova, B., Rossner, P. & Smerhivsky, Z. (2004) Cytogenetic analysis using fluorescence in situ hybridization (FISH) to evaluate occupational exposure carcinogens. *Toxicol. Lett.* **149**: 335-344.
14. Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D. & Aitio, A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* **463**: 111-172.
15. Zhang, L., Steinmaus, C., Eastmond, D. A., Xin, X. K. & Smith, M. T. (2009) Formaldehyde exposure and leukemia: A new meta-analysis and potential mechanism. *Mutat. Res.* **681**: 150-168.
16. Mendiola, M., Barriuso, J., Mariño-Enríquez, A., Redondo, A., Palacios, J. & Hardisson, D. (2009) Aurora kinases as pronostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum. Pathol.* **40**: 631-638.
17. Nissom, P. M., Lo, N. S., Lo, J. C. Y., Ong, P. F., Lim, J. W. E., Ou, K., Liang, R. C., Scow, T. K. & Chung, M. C. M. (2006) Hcc-2, a novel mammalian ER thioredoxin that is differentially expressed in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* **580**: 2216-2226.
18. Beheshti, B., Vukovic, B., Marrano, P., Squire, J. A. & Park, P. C. (2002) Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci. *Cancer Gen. Cytogen.* **137**: 15-22.
19. Romero-Ruiz, A., Alhama, J., Blasco, J., Gómez-Ariza, J. L. & López-Barea, J. (2008) New metallothionein assay in *Scrobicularia plana*: heating effect and correlation with other biomarkers. *Environm. Pollut.* **156**: 1340-1347.
20. Adair, B. M., Hudgens, E. E., Schmitt, M. T., Calderon, R. & Thomas, D. J. (2006) Total arsenic concentration in toenails quantified by two techniques provide a useful biomarker of chronic arsenic exposure in drinking water *Environ. Res.* **101**: 213-220.
21. Giessing, A. M. B., Mayer, L. M. & Forbes, T. L. (2003) Synchronous fluorescent spectrometry of 1-hydroxypyrene: a rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes *Mar. Environ. Res.* **56**: 599-615.
22. da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Khran, M. M., Bicego, M. C. & Pires-Vanin, A. M. S. (2006) Metabolitos in bile of fish from Sao Sebastiao Channel, Sao Paulo,

- Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Mar. Pollut. Bull.* **52**: 175-183.
23. Bassompierre, M., Tomasi, G., Munck, L., Bro, R. & Engelsen, S. B. (2007) Dioxin screening in fish product by pattern recognition of biomarkers. *Chemosphere.* **67**: S28-S35.
 24. Lee, C.-K., Cho, S.-H., Kang, J.-W., Lee, S.-J., Ju, Y.-S., Sung, J., Strickland, P. T. & Kang, D. (1999) Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Lett.* **108**: 209-215.
 25. Fuentes-Ríos, D., Orrego, R., Rudolph, A., Mendoza, G., Gavilán, J. F. & Barra, R. (2005) EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of South Pacific Ocean. *Chemosphere.* **61**: 192-199.
 26. Shailaja, M. S. & Rodrigues, A. (2003) Nitrite-induced enhancement of toxicity of phenanthrene in fish and its implications for coastal waters. *Estuarine coastal and shelf science.* **56**: 1107-1110.
 27. Padrós, J., Pelletier, E. & Oliveira Ribeiro, C. (2003) Metabolic interactions between low doses of benzo[*a*]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharm.* **192**: 45-55.
 28. Notch, E. G., Miniutti, D. M. & Mayer, G. D. (2007) 17-beta-Ethinylestradiol decreases expression of multiple hepatic nucleotide excision repair genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* **84**: 301-309.
 29. Kaddoumi, A., Wada, M., Nakashima, M. N. & Nakashima, K. (2004) Hair analysis for fenfluramine and norfenfluramine as biomarkers for N-nitrosfenfluramine ingestion. *Forensic Sci. Internat.* **146**: 39-46.
 30. Migliore, L., Scarpato, R., Coppede, F., Petrozzi, L., Bonucelli, U. & Rodilla, V. (2001) Chromosome and oxidative damage biomarkers in lymphocytes of Parkinson's disease patients. *Int. J. Hyg. Health.* **204**: 61-66.
 31. Siman, R., Roberts, V. L., McNeil, E., Dang, A., Bavaria, J. E., Ramchandren, S. & McGarvey, M. (2008) Biomarker evidence for mild central nervous system injury after surgically-induced circulation arrest. *Brain Res.* **1213**: 1-11.