



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y LA SALUD

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

***“EFECTOS DEL CIS-PLATINO EN LA EXPRESIÓN DE
LA PROTEÍNA ANTIOXIDANTE SOD1 EN CULTIVOS
DE CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO”***

TRABAJO FIN DE MÁSTER

LIA ALONSO GARCÍA

JULIO 2015



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

MARIA MONTES BAYÓN, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “*EFECTOS DEL CIS-PLATINO EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIOXIDANTE SOD1 EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO*” ha sido realizado por el Licenciado **Lía Alonso García** en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio 2015

Fdo.: Maria Montes Bayón

ÍNDICE

RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ESTRÉS OXIDATIVO.....	1
1.1.1. <i>Radicales libres</i>	3
1.1.2. <i>Radical superóxido</i>	4
1.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	6
1.2.1. <i>Familia de las SODs</i>	6
1.2.2. <i>Otros enzimas antioxidantes</i>	8
A) <i>Catalasa</i>	8
B) <i>Glutación peroxidasa</i>	9
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER.....	9
1.4. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS ENZIMAS ANTIOXIDANTES COMO BIOMARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	11
1.4.1. <i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	13
1.4.2. <i>Cromatografía de intercambio aniónico</i>	14
1.4.3. <i>Detectores (UV/VIS, ICP-MS)</i>	15
A) <i>UV/VIS</i>	15
B) <i>ICP-MS</i>	16

2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y MUESTRAS.....	21
3.2. INSTRUMENTACIÓN.....	22
3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA CON PATRONES DE SOD1 HUMANA.....	23
3.3.1. <i>Separación mediante HPLC de intercambio aniónico</i>	24
3.3.2. <i>Separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño</i>	25
3.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO.....	26
3.5. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA AL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA CON PATRONES DE SOD1 HUMANA.....	31
4.1.1. <i>Separación mediante HPLC de intercambio aniónico</i>	31
4.1.2. <i>Separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño</i>	35
4.2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA AL ANÁLISIS DE LOS CULTIVOS CELULARES EXPUESTOS A CISPLATINO.....	39
5. CONCLUSIONES.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	44

RESUMEN

La Superóxido dismutasa 1 es uno de los enzimas encargados de hacer frente al estrés oxidativo que tiene lugar en las células de manera natural. Su papel es clave para la detoxificación de la célula. La determinación de los cambios en concentración y actividad de los enzimas antioxidantes se emplea como biomarcador de estrés oxidativo, y es conocido que este aumenta en tratamientos con antitumorales como el cisplatino.

Sería de gran interés la posibilidad de realizar una separación y determinación simultánea de las distintas especies de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, la cromatografía de líquidos proporciona la posibilidad de aislar dichas especies con una detección en línea que proporciona información de las distintas especies por separado; por ello, se han realizado una serie de mediciones para optimizar la detección simultánea de la SOD1 con la catalasa y la glutatión peroxidasa, mediante HPLC combinado con detección UV/VIS e ICP-MS.

ABSTRACT

Superoxide dismutase 1 is one of the enzymes that are in charge of working against oxidative stress that occurs in cells naturally. It has a key role in the detoxification of the cell. Determination of changes in concentration and activity of the antioxidant enzymes is used as an oxidative stress biomarker, and it is known that increases in antitumor treatments such as cisplatin.

It would be of great interest the possibility of performing a simultaneous separation and determination of different enzymes species involved in fighting against oxidative stress. In this regard, liquid chromatography provides the ability to isolate such species with an online detection that provides information of the different species separately; therefore, a series of measurements have been done to optimize the simultaneous detection of SOD1 with catalase and glutathione peroxidase, through HPLC combined with UV/VIS and ICP-MS detection.

1- INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRÉS OXIDATIVO

La presencia del oxígeno en nuestra atmósfera ha dado lugar a lo largo de la evolución a que aparezcan las formas de vida aerobias, en las que el oxígeno juega un papel fundamental, siendo el aceptor final de la cadena de electrones, además de participar en otras rutas metabólicas y ser co-substrato en procesos enzimáticos. Esta evolución de organismos aeróbicos que pueden sobrevivir en ambientes ricos en oxígeno requiere un sistema de defensa contra las especies reactivas del oxígeno (ROS) que son producidas a partir del oxígeno molecular tras la reducción del mismo (Otto et al. 2014). Mientras que las concentraciones fisiológicas de ROS en organismos aeróbicos son beneficiosas, ya que están implicadas en rutas de señalización y además protegen contra invasión de patógenos, un desequilibrio y una alta concentración de estas ROS puede contribuir al desarrollo de ciertas enfermedades, ya que pueden reaccionar con moléculas biológicas como ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos y proteínas, oxidándolas y alterando su función (Zelko et al. 2002). A esta situación se le denomina **estrés oxidativo**.

El **estrés oxidativo** es, por tanto, una situación bioquímica que se caracteriza por el desequilibrio entre los radicales libres, principalmente las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y los mecanismos de defensa antioxidantes. El entorno normal reductor de la célula se preserva por la acción de las enzimas mitocondriales que mantienen el estado reducido gracias al constante aporte de energía.

Las ROS son altamente reactivas debido a la presencia de electrones desapareados en su capa de valencia. Esta alta reactividad se debe a la tendencia a compensar el desequilibrio electrónico cediendo o capturando electrones de otras moléculas del entorno. La principal fuente de ROS endógena se encuentra en los componentes de la cadena de transporte electrónico: NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipooxigenasa, citocromo P-450 y prostaglandina endoperóxido sintasa (ver **Figura 1** donde se detalla la producción de ROS por parte de la mitocondria). Por otro lado, las fuentes de ROS exógenas son fundamentalmente la contaminación ambiental, la radiación solar, y otros.

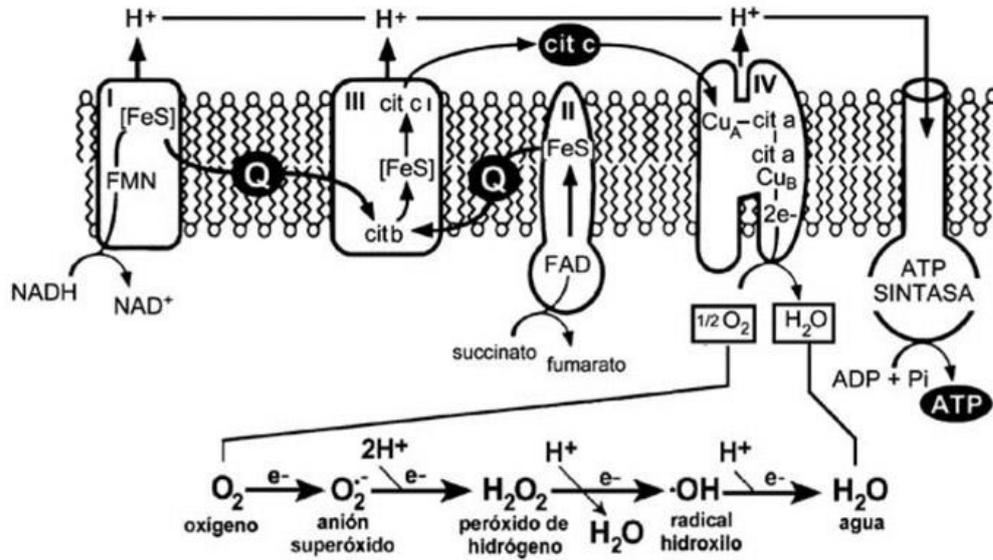


Figura 1. Generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

1.1.1. Radicales libres:

Los radicales libres tienen funciones beneficiosas, como en la lucha contra infecciones o la señalización celular, pero el organismo puede sufrir daños si es sometido a un exceso de radicales libres durante un tiempo prolongado. Se considera que los radicales libres participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades: algunos cánceres, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos o procesos neurodegenerativos.

Generalmente el radical libre es un agente oxidante que secuestra un electrón de un átomo, oxidándolo. De ahí que a la oxidación de multitud de compuestos celulares por radicales libres se la denomine estrés oxidativo. Para combatir el efecto oxidante de los radicales libres, preservando las funciones biológicas, se necesita de agentes antioxidantes.

Como se mencionó anteriormente, el origen de los radicales libres puede ser tanto *exógeno* (ingesta de alimentos pro oxidantes, humo de tabaco, polución, pesticidas, radiaciones...) como *endógeno* (cadena de transporte electrónico). La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable. Estas especies tan reactivas no causan daño en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes y de defensa (mecanismos físicos, mecanismos preventivos, mecanismos de reparación y las propias defensas antioxidantes). Podemos clasificar a los radicales libres de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación de los radicales libres.

DERIVADOS DEL OXÍGENO	DERIVADOS DEL NITRÓGENO
Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Óxido Nítrico (NO^{\bullet})
Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	Trióxido de Nitrógeno (N_2O_3)
Radical Hidroxilo (OH^{\bullet})	Peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)
Radical Peroxilo (ROO^{\bullet})	Nitrito (NO_2^-)
	Ácido Peroxinitroso ($HONO_2$)
	Dióxido de Nitrógeno (NO_2^{\bullet})

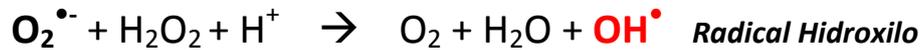
La principal ROS se considera que es el anión superóxido, a partir del cual también se formarán otras ROS secundarias.

1.1.2. Radical Superóxido:

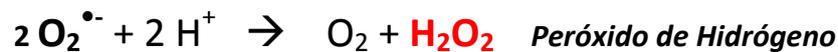
Se origina principalmente en la mitocondria: en la cadena de transporte de electrones, en la degradación de purinas por la xantina oxidasa, y por la acción de otras enzimas como las ciclooxigenasas, las lipoxigenasas, y la más importante, la NAD(P)H oxidasa.

Tiene una baja solubilidad, por lo que no difunde lejos de donde se produce, y se genera en elevadas cantidades. A partir del esto, puede verse involucrado en dos tipos de reacciones:

1. Reacción de Haber-Weiss no enzimática:



2. Acción de la Superóxido dismutasa:



El peróxido de hidrógeno difunde fácilmente a través de las membranas biológicas, por lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción. Por la acción de otras enzimas antioxidantes se produce su eliminación y detoxificación como se muestra en la **Figura 2**.

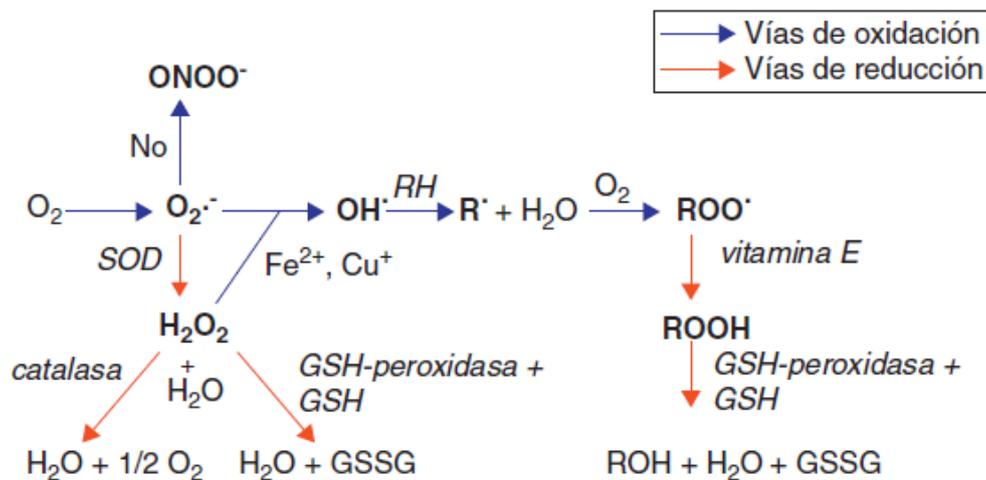


Figura 2. Principales ROS y su sistema de detoxificación.

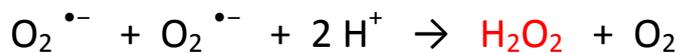
Los efectos nocivos de las ROS son contrarrestados por los sistemas de defensa antioxidante. Forman parte de estos sistemas de defensa las moléculas antioxidantes como las vitaminas, la coenzima Q10, el glutatión o los fenoles, así como los sistemas antioxidantes enzimáticos como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la SOD, entre otras. A pesar de la acción de estos sistemas de defensa, el daño oxidativo se acumula durante el ciclo vital de la célula (Viñas et al. 2011, Jiménez).

1.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Se trata de enzimas que catalizan reacciones con las ROS actuando como substratos, transformándolas así en productos más estables sin propiedades oxidantes.

1.2.1. Familia de las SODs:

Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de enzimas (metaloproteínas) que catalizan eficientemente la dismutación del anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) producido durante el estrés oxidativo al que están expuestas las células, en peróxido de hidrógeno:



La reacción química de dos pasos del anión superóxido con el grupo prostético de la SOD empieza con la forma oxidada del enzima (Fe^{3+} , Cu^{2+} y Mn^{3+}), uniendo el anión superóxido, ganando un protón y liberando oxígeno molecular. La forma reducida del enzima (Fe^{2+} , Cu^+ y Mn^{2+}) se une entonces a un segundo anión superóxido y un protón, para así liberar H_2O_2 y volver a su estado oxidado.

Están presentes en las mitocondrias, núcleo, citoplasma y espacios extracelulares. Son productos de diferentes genes y se designan según su localización:

- SOD1 (citoplasmática), SOD2 (mitocondrial) y SOD3 (extracelular).

A pesar de que todas catalizan la misma reacción, no comparten homología en la estructura primaria como se observa en la **Figura 3** (Johnson et al. 2005). Tienen un papel antioxidante vital en la salud humana, proporcionado por su labor a la hora de eliminar una de las especies reactivas del oxígeno, el anión superóxido.

Como se ha dicho, en humanos se conocen 3 tipos de SODs, siendo la más abundante la variedad citosólica (SOD1), identificada por su grupo prostético, que contiene cobre y zinc, lo que es esencial para su funcionamiento. Las SODs son la primera línea de defensa en la detoxificación de productos resultantes del estrés oxidativo, coordinadas con otras enzimas detoxificantes. El descubrimiento de la actividad enzimática de las SODs ocurrió en 1968–1969 por McCord y Fridovich, pero

las proteínas ya habían sido descubiertas antes de que se conociese su actividad enzimática. Mann y Keilin habían purificado la proteína 30 años antes a partir de sangre e hígado bovino, y la habían identificado como una proteína unida a cobre de la cual se desconocía la función. La proteína fue llamada “eritrocupreína” o “hepatocupreína” o, más tarde “citocupreína”. La purificación se basaba únicamente en el contenido en cobre de la proteína.

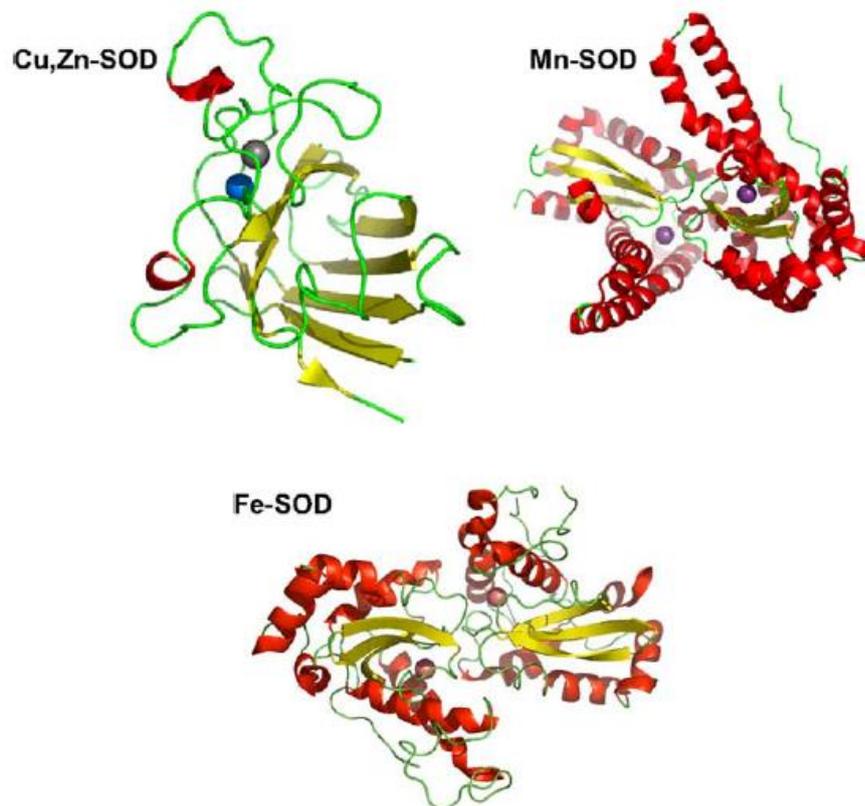


Figura 3: Diferentes estructuras de las SODs. La SOD1 humana contiene Cu y Zn , la SOD2 contiene Mn, y por último la que contiene Fe está presente en bacterias.

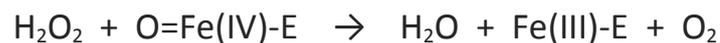
El anión superóxido, substrato de las SODs, había sido descubierto en los años 30 por Pauling, aunque no sabía que el radical se podía producir biológicamente, o que podría ser la clave de tantos procesos patológicos. Huber aisló más tarde la misma proteína del hígado bovino, basándose en este caso en su actividad anti inflamatoria, y la llamó *Orgoteína*.

La relación de la superóxido con la inflamación, fue más tarde descubierta por Babior, que encontró que los neutrófilos, a la hora de fagocitar, producían grandes cantidades de radical superóxido. Llegó a la conclusión de que parte del daño que se producía en los tejidos asociado a con el proceso inflamatorio podía ser atribuido al superóxido que generaban los neutrófilos, y que la SOD podría proteger las células de este daño. A partir de este momento se descubrieron gran cantidad de enfermedades que incluían daños producidos por el superóxido: daño por isquemia-reperfusión, ataque al corazón, ictus, fallos orgánicos tras transplantes y rechazo (McCord et al. 2005).

1.2.2. Otros enzimas antioxidantes

A) *Catalasa:*

La catalasa es un enzima antioxidante muy importante perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas, que cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno en H₂O y oxígeno ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Utiliza como cofactor al grupo hemo y al manganeso. La reacción química se produce en dos etapas:



Donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores.

Además de esta actividad catalítica, descomponiendo el H₂O₂, puede también descomponer el peroxinitrito (radical libre derivado del nitrógeno). Juega un papel importante en los eritrocitos contra el estrés oxidativo.

Se encuentra principalmente en los peroxisomas, pero también se ha detectado en el citoplasma, o en la membrana citoplasmática de células cancerosas humanas.

Se ha encontrado que en células con cáncer, se hayan niveles bajos de expresión de la catalasa, que se relacionan con una alta producción de H₂O₂, que está envuelto en

la señalización de rutas para inducir la proliferación, migración e invasión en células con cáncer (Glorieux et al. 2015).

B) Glutación peroxidasa:

El enzima Glutación peroxidasa (GPx), cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Este enzima usa como cofactor el selenio.



La glutación peroxidasa, tiene menos especificidad de sustrato, por lo que detoxifica un rango más amplio de ROS, como peróxido de hidrógeno, radicales peróxido, etc. Tiene como co-sustrato el glutación reducido, que donará los electrones necesarios.

En los vertebrados se conocen al menos 4 formas de GPx: una forma citosólica (GPx1), una forma gastrointestinal (GPx-GI), una forma secretada en el plasma (GPx-P) y una forma epididimial secretada (GPx-EP).

1.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y CÁNCER

El estrés oxidativo se ha relacionado habitualmente con el cáncer debido a los efectos dañinos de los radicales libres en macromoléculas como el DNA. Durante la formación de un tumor, se cree que el balance redox juega un papel importante, regulando diferentes rutas de señalización. Las células cancerígenas a menudo presentan un incremento en la generación de ROS, un incremento en su acumulación y una desregulación de las enzimas antioxidantes. Esto se puede explicar por la presencia de defectos mitocondriales y una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes (Glorieux et al. 2015).

El cáncer es por sí misma una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las células neoplásicas producen de forma intrínseca una mayor cantidad de ROS que las células normales, mientras que los niveles de actividad enzimática de los sistemas

antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la SOD se hallan disminuidos según publicaciones consultadas (Glorieux et al. 2015, Viñas et al. 2012, Johnson et al. 2005).

Los mecanismos por los cuales las células neoplásicas presentan niveles de ROS más elevados que las células normales pueden ser múltiples: en primer lugar, las células neoplásicas tienen incrementadas sus necesidades metabólicas, por lo que requieren mayores cantidades de ATP para mantener su elevado ritmo de crecimiento y proliferación, lo que contribuye a la formación de ROS. A esto se le añade que las células tumorales utilizan más la vía de la glucólisis para la síntesis de ATP, que es mucho menos efectiva que la cadena respiratoria mitocondrial. Esta alteración favorece la fuga de electrones desde el complejo respiratorio hacia el citoplasma, originándose una mayor cantidad de radicales libres intracelulares (Viñas et al. 2012, Johnson et al. 2005). Al estrés oxidativo generado por las alteraciones metabólicas se le añade la producción de grandes cantidades de ROS por parte de las células inflamatorias que infiltran el tejido tumoral y que incrementan el estrés oxidativo en el microambiente tumoral.

Además, la mayoría de los pacientes oncológicos padecen anorexia, hecho que impide el correcto aporte de nutrientes y por lo tanto un déficit de vitaminas y otros antioxidantes que compensen la producción de radicales libres. Este déficit puede verse agravado por las náuseas y los vómitos originados por los tratamientos oncológicos o por la propia enfermedad, que dificultan la ingesta de alimentos. A todos estos factores hay que añadirles los radicales libres generados por los tratamientos oncológicos específicos como la quimioterapia y/o la radioterapia (**Figura 4**) (Miar et al. 2015, Viñas et al. 2012, Johnson et al. 2005).

Varios estudios han demostrado cómo los tratamientos de quimioterapia elevan los niveles de estrés oxidativo en los pacientes que los reciben pudiendo causar modificaciones perjudiciales en muchas proteínas clave, como enzimas reparadoras del DNA, proteínas metabólicas, reguladores de la apoptosis y, por supuesto, las enzimas antioxidantes. Las células cancerígenas generalmente presentan una actividad disminuida tanto de la SOD1 como de la SOD2.

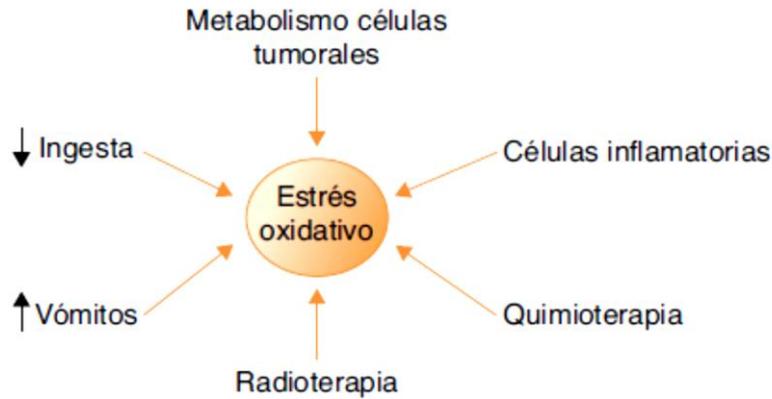


Figura 4: Principales factores que influyen en la elevación del estrés oxidativo en pacientes con cáncer.

Algunos mecanismos de defensa adaptativa celular, como las enzimas antioxidantes y los sistemas de protección redox, ayudan a regular el estrés oxidativo leve, no obstante estos mecanismos tienen una capacidad limitada en las células neoplásicas, por lo que una producción excesiva de ROS durante el tratamiento de quimioterapia puede elevar los niveles de estrés oxidativo hasta tal punto que desencadenen la muerte celular (Miar et al. 2015, Viñas et al. 2012).

El cisplatino por ejemplo, empleado en quimioterapia desde la década de los 70, aumenta la cantidad de ROS, lo que resulta en una mayor oxidación de macromoléculas, (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) y una actividad reducida de los antioxidantes enzimáticos como la SOD, catalasa y GPx, que ya tienen una actividad reducida, ya que se ha observado que ocurre así en células con cáncer (Palipoch et al. 2013, Johnson et al. 2003). El aumento del estrés oxidativo por la acción reducida de estos enzimas tiene implicaciones en el desarrollo de la enfermedad (Hess et al. 2015).

1.4. DETERMINACION DE LOS CAMBIOS EN LOS ENZIMAS ANTIOXIDANTES COMO BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La determinación de los cambios en concentración y actividad de los enzimas antioxidantes se emplea como biomarcador de estrés oxidativo al que puede verse

sometida la célula. En este sentido, las metodologías, sin duda, más utilizadas para la monitorización en particular de la SOD como biomarcador de estrés oxidativo en muestras de sangre y tejidos humanos se basan en la medida de su actividad enzimática, mediante métodos espectrofotométricos. La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema, poco frecuente en ensayos enzimáticos habituales, derivado de la inestabilidad intrínseca en medios acuosos de su sustrato (el radical anión superóxido). Por ello, dicha determinación se lleva a cabo de forma indirecta utilizando dos componentes: un generador del radical anión superóxido y un detector del mismo. El generador produce el radical superóxido a una velocidad controlada constante. En ausencia de SOD, el radical superóxido se acumula hasta llegar a una concentración tal que la velocidad de reacción con el detector se iguale con la velocidad de producción, consiguiéndose este estado de equilibrio en más o menos un segundo. Si la SOD está presente, compite con el detector por el radical superóxido, produciéndose una disminución del radical superóxido captado por el detector, manifestándose ésta en una inhibición de la señal (absorbancia) del detector. De esta manera se considera como una unidad de actividad de SOD a la actividad de esta enzima que produciría un 50% de la máxima inhibición causada por este enzima sobre la señal del detector.

El método espectrofotométrico más utilizado es el ensayo del pirogalol. En este método, el generador de radical superóxido y el detector son el reactivo de pirogalol, compuesto orgánico que se autooxida en medio básico generando en el medio de reacción radicales superóxido, especie que es secuestrada por la SOD. Por lo que se mide el efecto inhibitor del enzima sobre la autooxidación del pirogalol, que puede ser monitorizado espectrofotométricamente a 420 nm.

Cuando se precisa conocer la concentración absoluta de la enzima en fluidos biológicos es necesario emplear los métodos ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). Utilizando kits comerciales con el anticuerpo anti-SOD es posible determinar concentraciones del enzima en fluidos biológicos inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a través de medidas espectrofotométricas.

Sin embargo cuando se desea llevar a cabo la medida simultanea de varios enzimas antioxidantes, en lugar de llevar a cabo ensayo específicos para cada una de ellas, la posibilidad de realizar una separación y determinación simultanea de las distintas especies resulta muy atractiva. En este sentido, la cromatografía de líquidos proporciona la posibilidad de aislar dichas especies con una detección en línea que proporciona información de las distintas especies por separado. El esquema de funcionamiento del sistema que se puede emplear se muestra en la **Figura 5**.

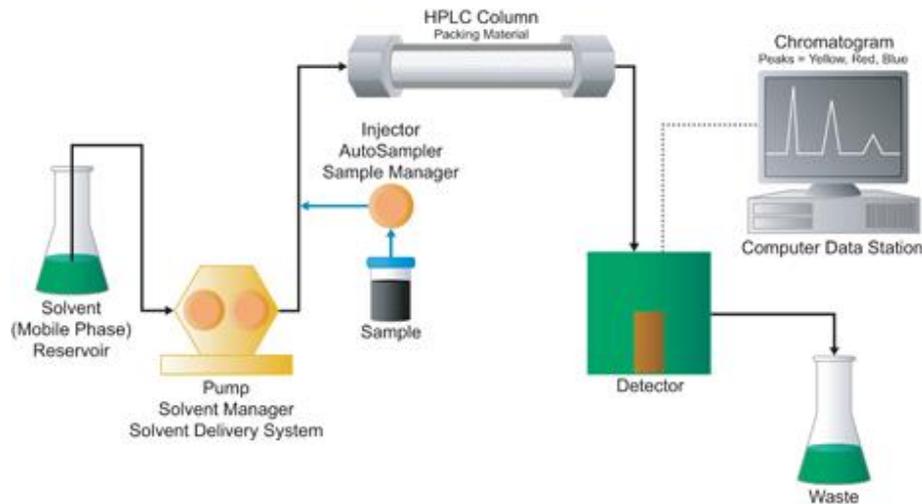


Figura 5. Diagrama esquemático de un sistema cromatográfico para la separación de especies.

Los principales métodos para la monitorización de proteínas son la cromatografía de exclusión molecular, y la cromatografía de intercambio aniónico.

1.4.1. Cromatografía de exclusión molecular:

La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con

un tamaño de diámetro determinado. Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas; y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria; en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular como se muestra en la **Figura 6**.

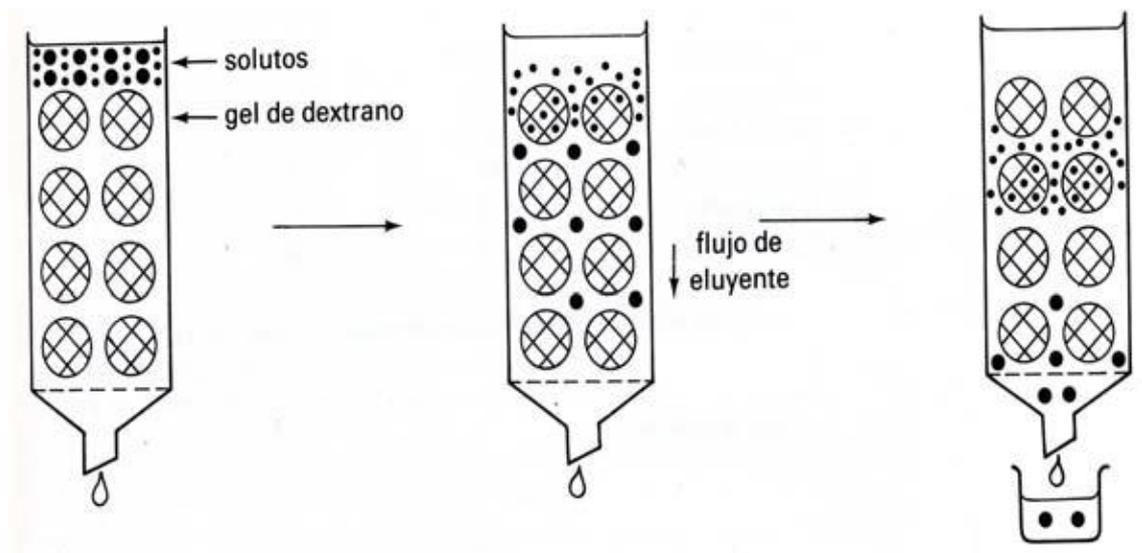


Figura 6: Mecanismo de la cromatografía de exclusión.

Las mallas del gel permiten la entrada selectiva de las partículas de menor masa molecular. De ahí que las partículas de mayor peso molecular salgan primero (Sepsey et al. 2014, Fekete et al. 2014).

1.4.2. Cromatografía de intercambio aniónico:

La cromatografía de intercambio iónico es un método que permite la separación de moléculas basada en sus propiedades de carga eléctrica. Se compone de dos fases: la fase estacionaria o intercambiador iónico, y la fase móvil. La fase estacionaria insoluble

lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria.

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del buffer con el material por los sitios de unión.

Un intercambiador iónico es, por lo general, un polímero que tiene grupos cargados unidos. La mayoría de las proteínas son estables dentro de un margen de pH determinado (es decir, hay un margen en el que no se desnaturalizan), en el que están cargadas positiva o negativamente. Por lo tanto si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, se debe utilizar un *intercambiador aniónico*: son portadores de grupos con cargas positivas que unen aniones de forma reversible. Los intercambiadores débilmente básicos más corrientes son los grupos aminos alifáticos o aromáticos (García-Álvarez-Coque et al. 2015).

1.4.3. Detectores (UV/VIS, ICP-MS):

A) *Detector UV/VIS:*

Este detector, ampliamente usado en HPLC, destaca por su universalidad, ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-780 nm en el cual trabajan la mayoría de detectores.

B) ICP-MS:

La técnica de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry), es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Es una técnica de análisis inorgánico que es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica de forma simultánea con una gran precisión. El ICP-MS combina dos propiedades analíticas que la convierten en un potente instrumento en el campo del análisis de trazas multielemental. Por una parte obtiene una matriz libre de interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de Ar y por otra parte presenta una alta relación señal/ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas (Bulska et al. 2012).

2- OBJETIVOS

Como se ha explicado en la introducción, la superóxido dismutasa 1 es un enzima implicado en la protección contra el estrés oxidativo que afecta a la célula. Este estrés se ve incrementado especialmente en situaciones como el tratamiento con medicamentos anticancerígenos. Por ello, la determinación de los cambios en la concentración de este y otros enzimas antioxidantes se puede emplear como biomarcador del estrés oxidativo al que se ve sometida la célula, lo que será útil para comprender las reacciones que la misma puede tener bajo diferentes condiciones.

Para ello, es necesario optimizar su separación mediante diferentes detecciones, utilizando en primer lugar patrones de los diferentes enzimas, así como la preparación de las propias células para la obtención de las muestras que se utilizarán para la separación cromatográfica.

Teniendo en cuenta todo esto, el objetivo principal y los objetivos parciales de este trabajo serán los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Evaluación de los efectos del cis-platino en la expresión simultánea de la proteína antioxidante SOD1 y otras proteínas antioxidantes en cultivos de células de cáncer de ovario mediante el uso de diversas técnicas analíticas.

OBJETIVOS PARCIALES

- Optimizar un método para la separación de Superóxido dismutasa 1 comparando distintos métodos cromatográficos y empleando la detección UV/VIS.
- Comprobar si con el método cromatográfico propuesto se pueden detectar simultáneamente otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa empleando detección UV/VIS e ICP-MS.
- Aplicación de la metodología desarrollada al estudio de la SOD1 de células de cáncer de ovario en cultivo: optimización de la preparación de las células para la separación cromatográfica.
- Comparación de los resultados para la SOD1 en la línea celular después de la exposición a cisplatino y la acumulación de Pt intracelular.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS, MATERIALES Y MUESTRAS

Reactivos:

- H₂O ultrapura (18,2 Ω de resistividad) obtenida usando un sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA) alimentado con agua destilada.
- Tris (hidroximetil)-aminometano, Merck, Alemania.
- Acetato de amonio, Panreac Química SAU, Barcelona, España.
- Ácido nítrico, Panreac SAU, Barcelona, España.
- Polvo liofilizado de superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- Polvo liofilizado de superóxido dismutasa de eritrocitos humanos, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- Solución acuosa de catalasa de eritrocitos humanos, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- Polvo liofilizado de glutatión peroxidasa de eritrocitos humanos, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- PBS (tampón fosfato salino) a partir de agua Milli-Q y las sales que aparecen en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Composición PBS

Componente	Concentración (g/l)
NaCl	8'0
KCl	0'2
Na ₂ HPO ₄	1'15
KH ₂ PO ₄	0'2
Piruvato de sodio	0'036
Glucosa	1'0
Kanamicina	0'007

- Tripsina, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- Medio DMEM, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania.
- Nitrógeno líquido.

Materiales:

- Micropipetas: 0,1-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l, High Tech-Lab, Varsovia, Polonia.
- Pipetas de plástico 3 ml.
- Tubos de ensayo 10 ml.
- Tubos para centrífuga 1 ml.
- Tubos para ultrafiltración con membrana porosa Microcon 10 KDa, Millipore Co., Bedford, USA.
- Jeringas de 25 μ l, Hamilton Co., Reno, USA.
- Pipetas graduadas 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Pipeteador electrónico Fastpette V2, Labnet International, Edison, NJ, USA.
- Frascos de Roux 5 ml.
- Columna de intercambio aniónico MonoQ HR 5/5 (50 mm x 5 mm), Pharmacia, AmershamBio-Sciences, Uppsala, Suecia.
- Columna de exclusión por tamaños Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia.

Muestras:

Las muestras de células de cáncer de ovario (A2780 y A2780CIS) con diferentes tratamientos con cisplatino fueron obtenidas de las líneas celulares del Laboratorio de la Dra. Maria Sierra del Departamento de Genética de la Universidad de Oviedo.

3.2. INSTRUMENTACIÓN

- Equipo HPLC modelo LC-10AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) con detección UV/VIS, bomba de alta presión de doble pistón con un bucle de inyección de 20 μ l.
- Equipo HPLC Agilent modelo 1100 Series (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), compuesto de una bomba cuaternaria de doble presión, un desgasificador de

vacío, un auto-inyector un sistema de termostatación de las columnas y un detector de diodos en fila.

- Espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Agilent modelo 7700 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), que consta de un analizador de masa de tipo cuadrupolo e incorpora un multiplicador de electrones secundario. Como gas portador en el ICP-MS se ha empleado He (99.999% de pureza máxima) de Air Liquide (España). La señal del equipo fue optimizada con una solución de ng/g de Li, Co, Y, Tl y Ce en ácido nítrico al 1%, con objeto de alcanzar la máxima sensibilidad. En la **Figura 7** se muestra un diagrama esquemático de los componentes de un sistema de ICP-MS.

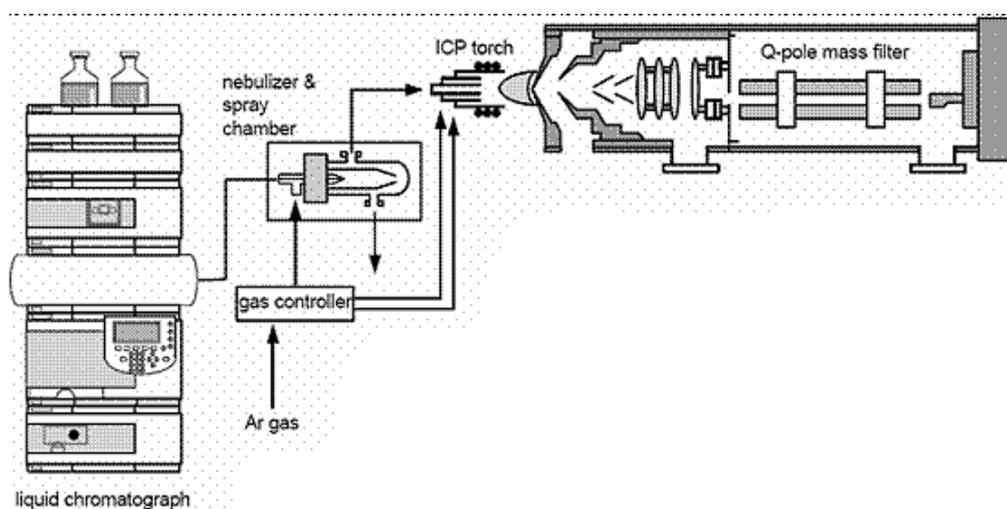


Figura 7: Diagrama esquemático de los elementos que componen un equipo de ICP-MS como el utilizado.

- Centrífuga modelo Biofuge Stratos, Kendel Laboratory Products, Hanan, Alemania.
- Balanza analítica modelo XB-120 Precisa Gravimetrics AG, Dieticon, Suiza.
- pHmetro modelo micropH-2000, Crisol instrumentes S.A., Alella, España.
- Campana de flujo laminar.
- Baño de laboratorio.
- Estufa de 37°C para el cultivo de la líneas celulares.

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA CON PATRONES DE SOD1 HUMANA.

El primer paso en el presente trabajo consistió en la puesta a punto de la metodología para la separación cromatográfica de la SOD1, así como de la CAT y la GPx; del resto de proteínas que estarán presentes en las células que más tarde utilizaremos.

Para ello es necesario que utilicemos patrones comerciales de los 3 enzimas, haciendo una disolución de 1mg/mL de los mismos. A partir de estos patrones llevaremos a cabo toda la metodología, tanto el HPLC como el ICP-MS, lo cual se expone a continuación.

3.3.1. Separación mediante HPLC de intercambio aniónico:

El primer paso en la optimización de la separación cromatográfica de estos enzimas fue el uso de cromatografía de intercambio aniónico. Los puntos isoeléctricos teóricos de los enzimas que estudiaremos son los siguientes: SOD1 5,63; CAT 5,4 y GPx 6,2. Por ello, a un pH de 7,4 presentarán carga neta negativa. Las fases utilizadas para la separación cromatográfica fueron ajustadas a este pH.

Respecto a la elección de la columna, se optó por una columna de presión media, de 50 mm x 5 mm de diámetro interno (Mono Q) que posee en su superficie un cambiador iónico en la forma de un amonio cuaternario. La elección de las fases A y B se basó en sus propiedades para la separación de proteínas con el gradiente más adecuado y se optó por utilizar como fase A tris-ácido acético, y como fase B acetato de amonio, que será el que realice la elución. El modo de elución empleado es en la forma de gradiente salino incrementando la concentración de acetatos con el tiempo. El tiempo total del cromatograma fue de aproximadamente 30 min.

Las condiciones de trabajo que se decidió aplicar finalmente se recogen en la **Tabla 3.**

Tabla 3: Condiciones experimentales empleadas en la cromatografía de intercambio aniónico.

Columna	Mono Q HR 5/5 (50 mm x 5 mm i.d.)
Volumen de inyección	20 μ l
Flujo fase móvil	1 mL min ⁻¹
Fase A	Tris-ácido acético 10 mM pH=7,4
Fase B	A + 250 mM acetato de amonio
Gradiente de elución	0 a 100% de B en 30 min 100% de B durante 5 min

Como se ha dicho, el método de detección será UV/VIS, y para ello se seleccionaron dos longitudes de onda del espectro visible, 259 nm y 280 nm, sabiendo que la más apropiada para la detección de estas proteínas es la de 259 nm.

Se empezó utilizando el patrón de la SOD1, y una vez identificado su tiempo de retención, se continuó con los otros dos enzimas, identificando así mismo sus tiempos de retención. Además, disminuyendo progresivamente la concentración de SOD1 en la disolución, bajando desde 1 mg/mL hasta 0,125 mg/mL, se estableció el límite de detección y la linealidad del método.

Teniendo en cuenta que el enzima que más nos interesa es la SOD1, se procedió a una detección específica del Cu y del Mn que contiene mediante el acoplamiento de la línea de HPLC a un equipo de ICP-MS, para confirmar así la presencia de este enzima en el tiempo de retención obtenido mediante la detección UV/VIS. El primer paso para ello fue optimizar los parámetros de este equipo para asegurar una detección más sensible de los dos metales que nos interesan. Para optimizar las condiciones se utilizó una disolución de calibrado estándar, utilizando después la disolución del patrón de SOD1 a 1 mg/mL.

También se optimizó la celda de colisión/reacción para evitar interferencias que pudieran afectar a nuestra medida. Para ello se eligieron los gases de colisión y

reacción y el flujo de los mismos. Se utilizaron las mismas fases y el mismo flujo que anteriormente para llevar a cabo la elución en las mismas condiciones.

3.3.2. Separación mediante cromatografía de exclusión por tamaños:

Puesto que la separación con el uso de la columna de intercambio aniónico, aunque resultaba adecuada para el análisis de la SOD1 no proporcionaba suficiente información sobre las demás proteínas de interés, puesto que algunas de las especies no mostraban retención en la columna (como la catalasa) y eluían en el volumen muerto, se evaluó la posibilidad de cambiar de alternativa y emplear una columna de exclusión por tamaños.

La columna elegida se trata de una columna SEC200 (Superdex 200 10/300), cuyo intervalo de fraccionamiento abarca desde 10 hasta 600 KDa, por lo que abarca el tamaño de nuestros tres enzimas de interés.

También se decidió optimizar otros parámetros como el flujo y composición de la fase móvil (en régimen isocrático en este caso) ya que serían más apropiados para este tipo de separación. Las condiciones elegidas finalmente se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Condiciones experimentales empleadas en la cromatografía de exclusión por tamaño.

Columna	Superdex 200 (10 x 300)
Volumen de inyección	20 μ l
Flujo fase móvil	0,6 mL min ⁻¹
Fase	50 mM acetato de amonio pH=7,4
Modo de elución	Isocrático

Las longitudes de onda elegidas serán 280 nm 360 nm, ambas del espectro visible.

Tras la optimización de los tres patrones y la obtención de los tiempos de retención de los mismos, se procede a analizar una dilución que contenga los tres patrones en la misma muestra a una concentración de 1 mg/mL.

Se llegó a la conclusión que el uso de la columna SEC200 es más adecuado para la separación de estas enzimas que pueden estar simultáneamente presentes en las muestras sujeto de análisis.

3.4. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO

Las células fueron obtenidas a partir de líneas celulares del Laboratorio de la Prof. María Sierra del Departamento de Genética de la Universidad de Oviedo.

Es importante trabajar en condiciones de esterilidad, para evitar cualquier tipo de contaminación en las células; por ello se trabaja en una campana de flujo laminar, con todo el material estéril, que solo debe abrirse dentro de la campana.

A partir de la línea A2780 (botella T75), que se conservan en estufa de 37°C se hicieron 4 pases nuevos, con el siguiente procedimiento:

3.4.1. Pase de células:

La mayoría de líneas celulares doblan en cultivo en 24-48h, cuando las condiciones de crecimiento son adecuadas. De esta manera, el número de células se multiplica en cualquier cultivo en unos pocos días, ocupando toda la superficie de la placa y empobreciendo el medio al consumirse los nutrientes y acumularse productos de deshecho en éste. Es por esto que si se desea mantener una línea en cultivo durante más tiempo, de manera periódica hay que reponer nutrientes y eliminar productos de degradación. Para la mayoría de líneas celulares que crecen adheridas a un sustrato, la forma más conveniente de levantarlas en una suspensión celular (para poder manejarlas fácilmente en suspensión), es mediante el uso de tripsina (proteasa), que digiere aquellas proteínas celulares implicadas en la adhesión celular al soporte. Pare ello el procedimiento estándar es el siguiente:

- A partir de un frasco de roux, con las células creciendo en la superficie de la placa, se retira el medio.
- Se realiza un lavado con 3 mL de PBS a 37°C y descartamos.
- Lavamos con 0,5 mL de tripsina, hasta que vemos que la capa de células se desprende de la pared.

- Añadimos 3 mL de medio completo DMEM para detener la tripsinización y recogemos a un tubo.
- Centrifugamos a 1000 rpm durante 5 minutos.
- Descartamos sobrenadante, y resuspendemos.
- Pasamos 0,5 mL a cada tubo y rellenamos con 4,5 mL de medio, teniendo así una densidad de 1/10 respecto al principio.

Una vez listas las líneas celulares, fueron tratadas con distintas cantidades del antitumoral cisplatino, como se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Tratamientos aplicados a las células.

Control (sin tratamiento)
5 μM Cisplatino
10 μM Cisplatino
20 μM Cisplatino

Para la medición de SOD1 en las células de cáncer de ovario es necesario llevar a cabo la lisis celular, ya que los enzimas se encuentran en el interior. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

3.4.2. Lisis celular:

Tendremos las células en pellet en el fondo de un tubo, forma en la que fueron obtenidas del hospital.

- El primer paso es resuspender las células en 500 μ L de agua Milli Q e un tubo eppendorf.
- En un recipiente con nitrógeno líquido, se introducirán los eppendorfs con las células resuspendidas hasta que se congelen completamente.
- Se descongelan, y se repite el procedimiento de congelación dos veces más.
- Centrifugamos a 5000 rpm durante 15 minutos.

- Recogemos el sobrenadante, dónde se encontrará el contenido de las células, y pasaremos a un tubo con un filtro de 10 KDa.
- Centrifugamos a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Añadimos 100 µL de agua para lavar y centrifugamos 5 minutos.

Una vez realizado este procedimiento, habremos liberado los componentes internos de las células, incluyendo los enzimas que queremos identificar, por lo que ya podremos utilizarlo para hacer las mediciones y las pruebas analíticas que nos interesan.

3.5. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA AL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Una vez optimizados los métodos de análisis, y obtenidas las muestras deseadas, podremos llevar a cabo la determinación de las enzimas en las células de cáncer de ovario.

El análisis se realizó con la columna de exclusión por tamaño SEC200, ya que se concluyó que era con la que mejores resultados se obtenían.

Se midieron las 4 muestras, incluyendo el control, tanto en el HPLC como en el ICP-MS para la confirmación, con los protocolos establecidos previamente con la utilización de los patrones.

4- RESULTADOS

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA CON PATRONES DE SOD1 HUMANA.

4.1.1. Separación mediante HPLC de intercambio aniónico:

El primer paso fue la realización de un blanco de gradiente, para saber cómo se comporta y cómo será el fondo y así poder tenerlo en cuenta a la hora de interpretar nuestros picos y nuestros resultados. La primera muestra analizada fue la SOD de la que se obtuvo el siguiente cromatograma:

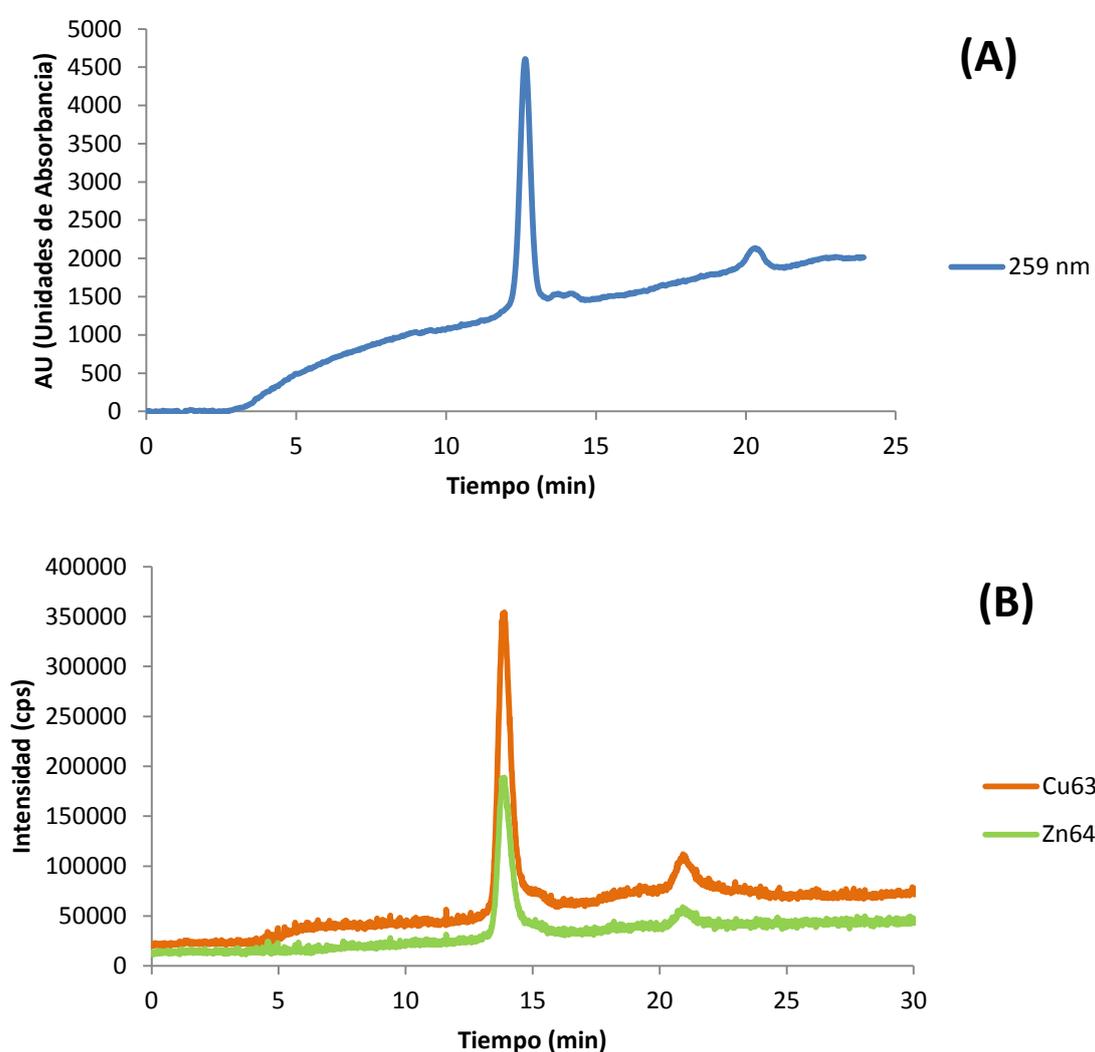


Figura 8: Perfil cromatográfico de la SOD obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico. A) Detección espectrofotométrica a 259 nm. B) Detección por ICP-MS de Cu y Zn.

En este perfil cromatográfico a 259 nm se observa claramente el pico correspondiente a la SOD a los 12 minutos (tiempo de retención) en la Figura 8.A, presente en el patrón comercial con un perfil estrecho y solo aparecen pequeñas impurezas del patrón a otros tiempos de retención. Como se dijo previamente, se realizó además una detección por ICP-MS para confirmar que el tiempo de retención observado corresponde con el enzima deseado. Para ello se realizó la detección específica del Cu y del Zn presentes en la SOD, y, a pesar de que se detectaron varios isótopos de cada elemento, solo se muestran los más significativos, el Cu 63 y el Zn 64. Como se observa, aparece un pico a los 14 minutos, por lo que podemos confirmar que el pico que detectamos a los 259 nm corresponde con la SOD.

Para evaluar las características analíticas de la metodología para la determinación de la SOD1 se llevó a cabo un calibrado con distintas diluciones del patrón lo que permitió establecer los límites de detección de la metodología HPLC-UV. Así mismo, se evaluó la reproducibilidad llevando a cabo un triplicado de la inyección de uno de los patrones de calibrado. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la **Figura 9** y la **Tabla 6**. Como se puede observar, la metodología propuesta permite, en principio, la determinación de SOD1 a niveles de $\mu\text{g/mL}$ lo que permitiría su aplicación en muestras reales.

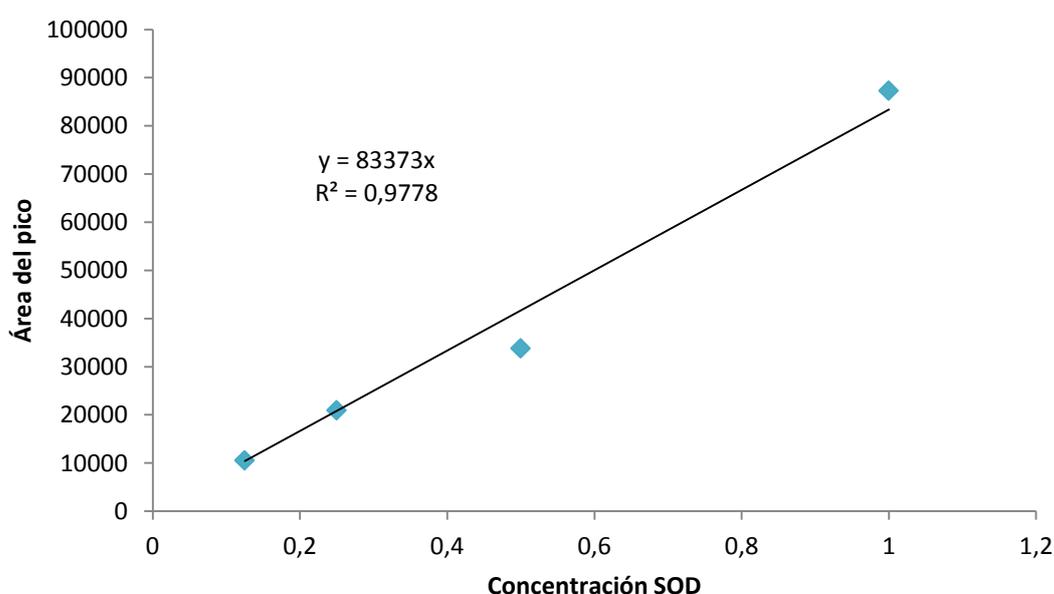


Figura 9: Calibrado de SOD1 mediante HPLC-UV en área y altura de pico.

Tabla 6: Características analíticas de la metodología propuesta para la determinación de SOD1 mediante HPLC-UV

Característica	Valor
LOD	0,013 mg/mL
%RSD (n=3)	< 10 %
R ²	0,97
LOQ	0,13 mg/mL

Sin embargo, este tipo de análisis no aporta ninguna ventaja adicional a los tradicionales métodos inmuno-químicos (p.e. ELISA) existentes que proporcionan características analíticas similares. La ventaja de los métodos cromatográficos radica en la posibilidad de analizar diferentes especies de manera simultánea y por ello se evaluó la posibilidad de estudiar el comportamiento, en estas condiciones, de otras proteínas antioxidantes como son la catalasa y la glutatión peroxidasa.

En primer lugar se procedió a la medida de un patrón de catalasa, para comprobar si tenían tiempos de retención lo suficientemente separados como para poder identificar los dos enzimas en la muestra sin que se solapasen. El cromatograma obtenido se muestra en la **Figura 10**.

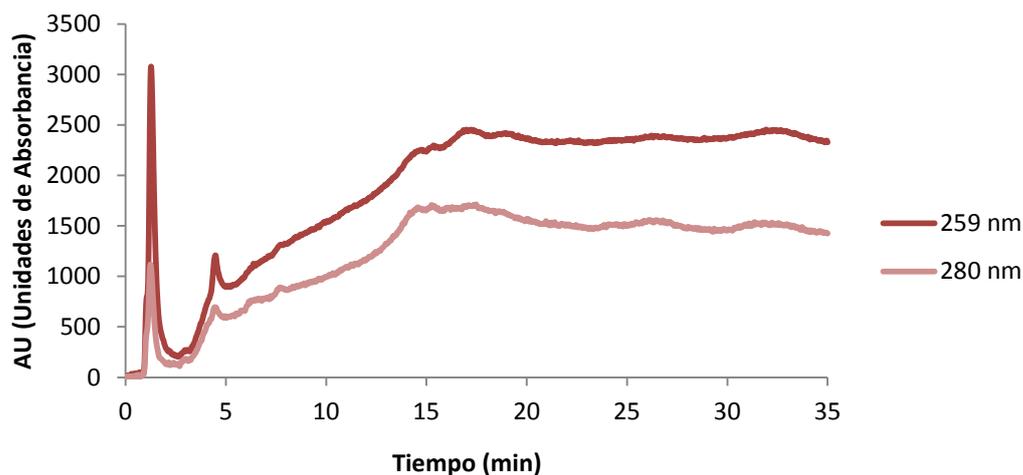


Figura 10: Perfil cromatográfico obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico y detección UV/VIS a 259 y 280 nm de la catalasa.

Como se puede observar, el pico obtenido aparece en los primeros minutos, que corresponden al volumen muerto, es decir, no muestra retención en la columna cromatográfica. Para verificar que no se trataba de la especie que se observa a los 2 min se inyectaron concentraciones crecientes del patrón pero no se observaron resultados positivos, por tanto, se abandonó esta determinación.

Igualmente, se procedió al análisis de la glutatión peroxidasa, para comprobar si su tiempo de retención no se solapa con el de la SOD y lo podemos utilizar para su aplicación en muestras de cultivos. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la **Figura 11**.

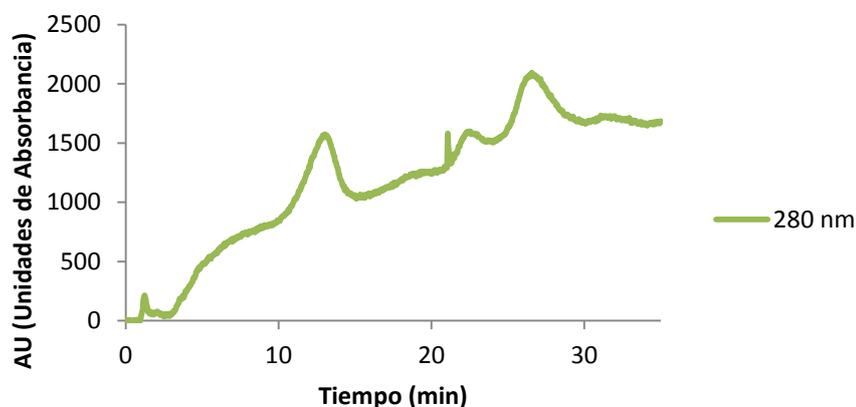


Figura 11: Perfil cromatográfico obtenido mediante cromatografía de intercambio aniónico y detección UV/VIS a 280 nm de la GPx.

En este caso se optó por hacer la detección a 280 nm, ya que por las características de la GPx, se ve mejor a esta longitud de onda. Como podemos observar, aparecen varios picos, bastante anchos, por lo que no podemos asegurar cual es el que corresponde a este enzima y no podríamos utilizarlo para la detección en la muestra.

A la vista de estos resultados, se decidió cambiar el tipo de cromatografía, pasando a una columna de exclusión por tamaño.

4.1.2. Separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño:

En primer lugar se realizó un blanco, por las razones antes mencionadas. Tras ello se procedió con la primera muestra, que fue la de SOD, obteniéndose el siguiente cromatograma que se muestra en la **Figura 12**.

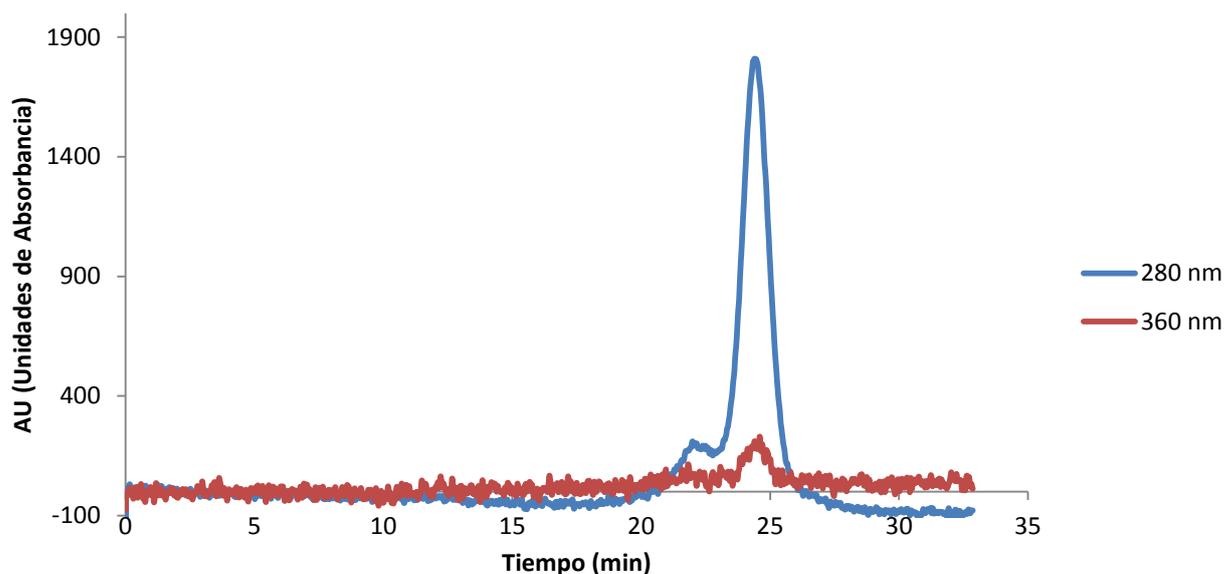


Figura 12: Perfil cromatográfico de la SOD obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección UV/VIS a 280 y 360 nm.

La cromatografía de exclusión tiene como ventaja principal que se lleva a cabo en régimen isocrático, es decir, sin cambio de disolventes con el tiempo, lo que conlleva un ahorro de tiempo considerable pues la columna no ha de ser equilibrada después

de cada inyección. Sin embargo, como limitación podríamos mencionar el limitado poder de resolución que se obtiene en la mayor parte de las columnas. En el caso de la SOD1, su perfil es nuevamente adecuado por lo que podría emplearse este tipo de cromatografía para su determinación.

En estas condiciones, se llevó a cabo la inyección de un patrón de catalasa, como observamos en el cromatograma en la Figura 13. En este caso, la presencia del grupo hemo permite además la absorción de la proteína en la región del visible y permite confirmar su presencia en el pico a 15 min aunque con un perfil bastante ancho (probablemente debido a impurezas del patrón).

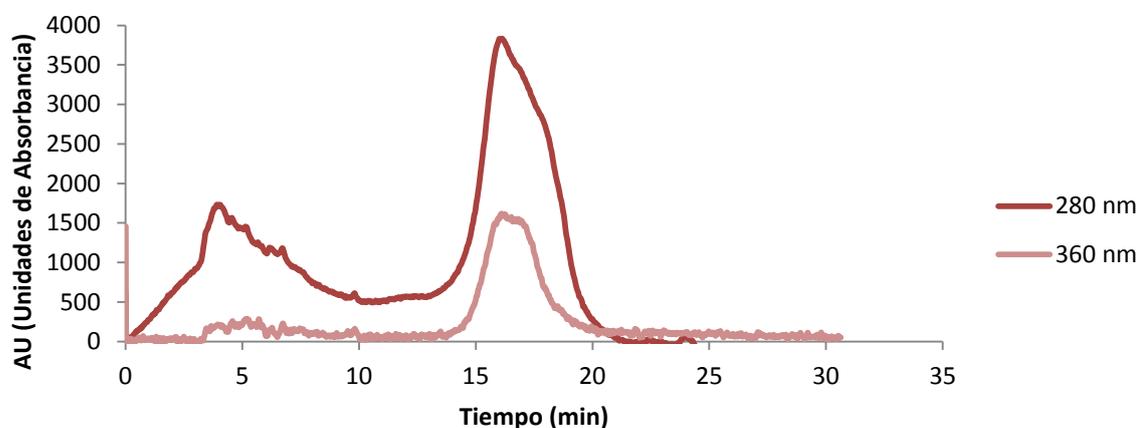


Figura 13: Perfil cromatográfico de la catalasa obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección UV/VIS a 280 y 360 nm.

A pesar de que al principio aparece un pico indeseado, que podría ser debido a impurezas presentes en patrón, el pico presumiblemente correspondiente a la catalasa aparece, con bastante intensidad, en el minuto 15 por lo que tendría una separación de unos 10 minutos con la SOD, lo cual sería suficiente para poder distinguir los dos picos en una muestra en la que apareciesen los dos.

El siguiente paso fue medir la última de las enzimas de interés, la glutatión peroxidasa (GPx) que proporcionó los resultados que se muestran en el cromatograma que se muestra en la **Figura 14**. El pico mayoritario que obtenemos aparece a los 20 minutos, justo entre la SOD y la catalasa, aunque con poca intensidad debido a la

ausencia de grupos cromóforos relevantes en la proteína. Sin embargo, por los resultados obtenidos, la cromatografía de exclusión por tamaños resultaría más adecuada para la separación de todas las enzimas en estudio. Por ello, se procedió a realizar una mezcla de las tres especies para su posterior análisis mediante SEC-UV y también SEC-ICP-MS. Los resultados se encuentran recogidos en las **Figuras 15 y 16** respectivamente.

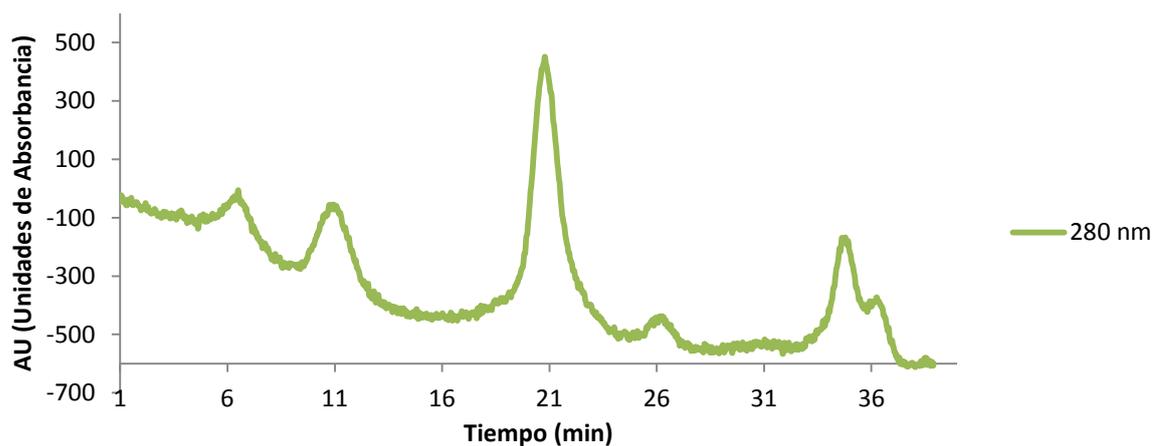


Figura 14: Perfil cromatográfico de la GPx obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección UV/VIS a 280 nm.

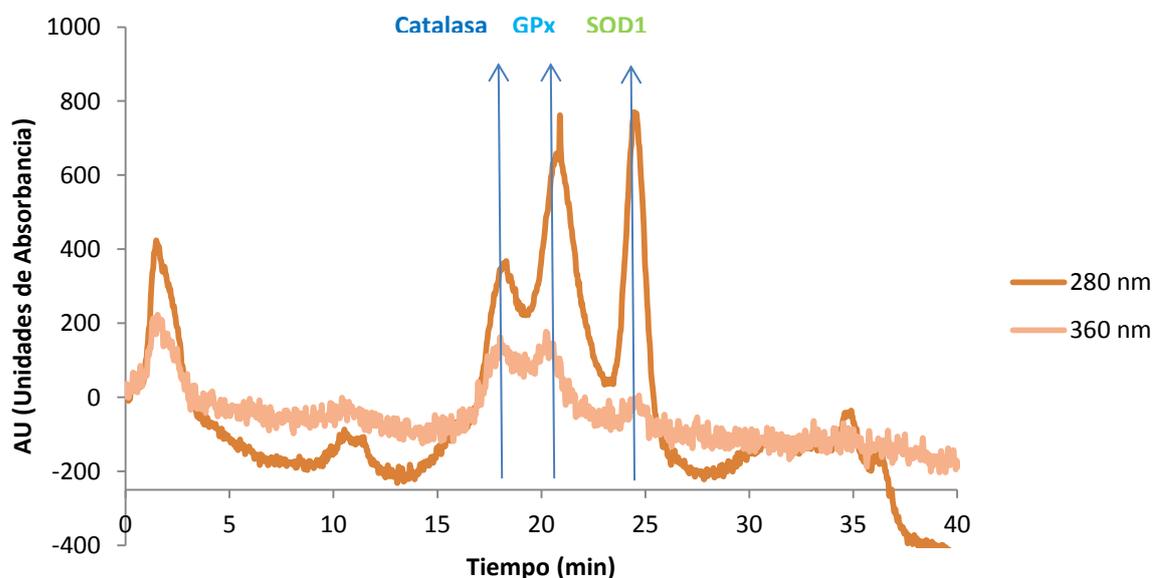


Figura 15: Perfil cromatográfico de las enzimas SOD/CAT/GPx obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección UV/VIS a 280 y 360 nm.

El perfil obtenido se puede interpretar de la siguiente manera: se observa claramente el pico correspondiente a la SOD con un tiempo de retención de 25 minutos; respecto a la catalasa y la GPx, eluyen más cercanas entre si y por eso sus picos se solapan parcialmente, ya que los dos picos anteriores al de la SOD se corresponden con los de estos dos enzimas. Se observa también el pico correspondiente a las posibles impurezas presentes en el patrón de la catalasa. A continuación, las muestras se inyectaron en el mismo sistema cromatográfico pero empleando el ICP-MS como detector. La ventaja principal de este sistema es que puesto que los distintos enzimas presentan distintos metales en sus sitios activos (Cu/Zn, Fe y Se) aunque los picos solapen parcialmente, se verán separados cuando se monitorice la señal correspondiente al metal.

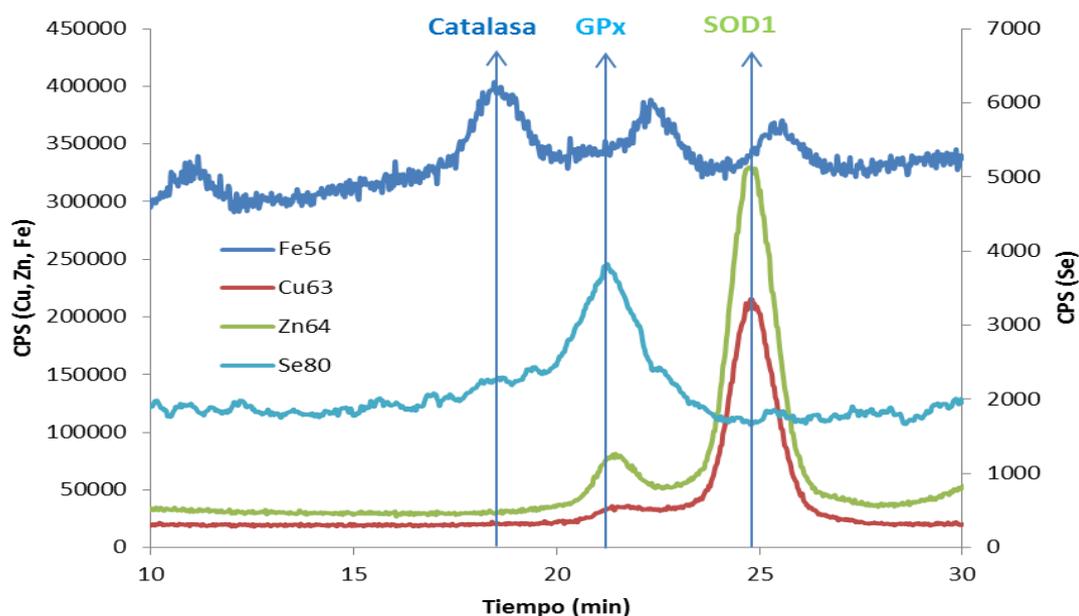


Figura 16: Perfil cromatográfico de las enzimas SOD/CAT/GPx obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección ICP-MS.

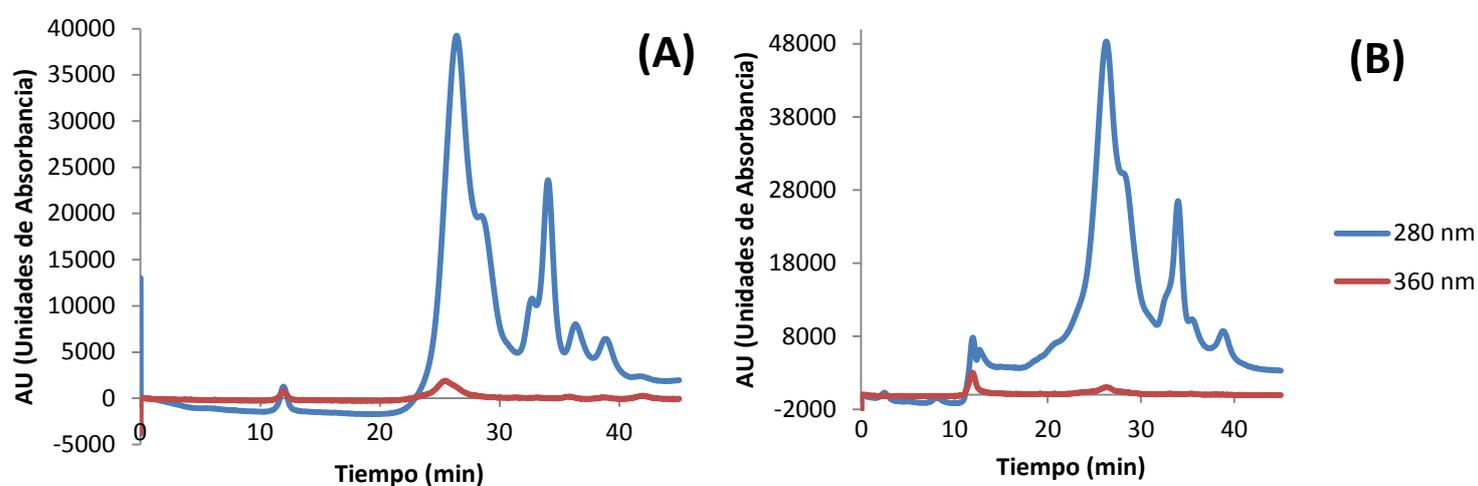
La **Figura 16** muestra, en primer lugar la presencia de todas las enzimas inyectadas y puede observarse que el perfil del Fe aparecen varios picos debidos a impurezas del patrón aunque teniendo en cuenta el perfil obtenido por UV y los pesos moleculares de las proteínas, el pico correspondiente a la catalasa es el de 18 minutos, seguido por el de la GPx que presenta un único pico a 21 min y la SOD1 que presenta un pico

mayoritario a aproximadamente 25 min. Por tanto, gracias a la espectrometría de masas elemental será posible discriminar entre los distintos enzimas presentes en las muestras sujeto del análisis de manera simultánea.

Conociendo todos estos resultados, podemos comenzar con la medida de las muestras de células.

4.2. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA AL ANÁLISIS DE LOS CULTIVOS CELULARES EXPUESTOS A CISPLATINO

Como se muestra en la **Tabla 5**, disponemos de cuatro muestras de células de cáncer de ovario, cada una con una concentración diferente de cisplatino. En primer lugar se llevó a cabo la lisis de las células y su centrifugación para eliminar las membranas celulares. A continuación se inyectaron en el sistema SEC-UV para evaluar posibles diferencias entre muestras. Los cromatogramas obtenidos se encuentran a continuación en la Figura 17 (A, B, C y D correspondientes al control, 5 μ M cisplatino, 10 μ M cisplatino y 20 μ M cisplatino respectivamente)



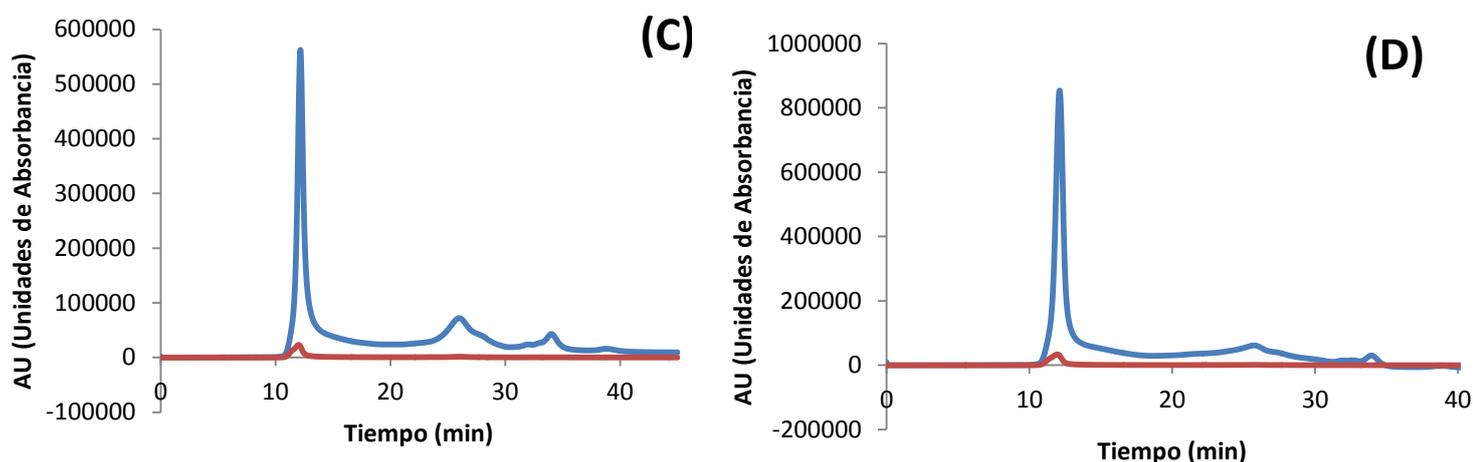


Figura 17: Perfiles cromatográficos obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño y detección UV/VIS de A) control, células sin tratamiento con cisplatino; B) células tratadas con 5 μM de cisplatino; C) células tratadas con 10 μM de cisplatino y D) células tratadas con 20 μM de cisplatino.

En primer lugar, del perfil de HPLC-UV puede observarse que a medida que aumenta la concentración de cisplatino, empieza a observarse un pico en el volumen muerto de la columna (especies de alto peso molecular u oligómeros proteicos) que muestran una gran absorción a 280 nm. Al tiempo de retención de las enzimas de interés aparece un gran número de picos y para poder llevar a cabo la comparación entre muestras será por tanto necesario emplear la detección elemental mediante ICP-MS. Los cromatogramas obtenidos se muestran a continuación para la muestra de 10 y 20 μM de cisplatino (Figuras 18 y 19 respectivamente).

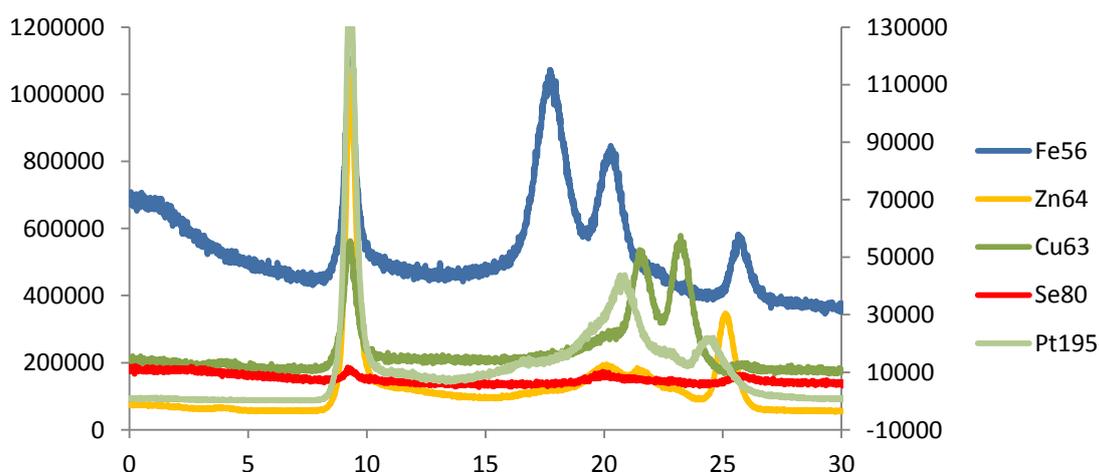


Figura 18: Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección ICP-MS de la muestra correspondiente al tratamiento con 10 μM de cisplatino.

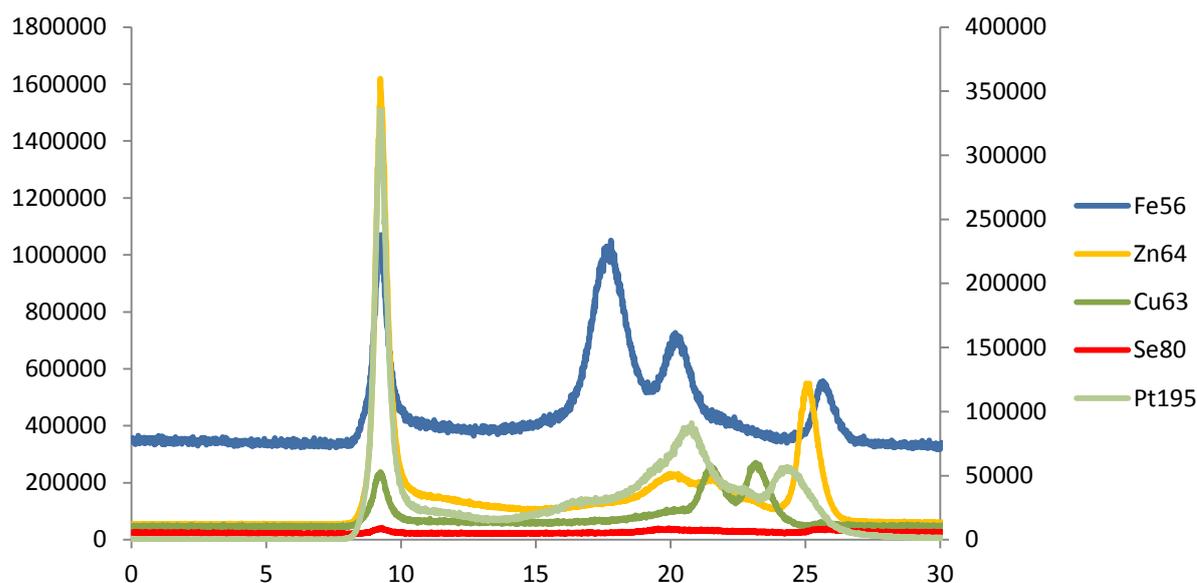


Figura 19: Perfil cromatográfico obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño con detección ICP-MS de la muestra correspondiente al tratamiento con 20 μ M de cisplatino.

Los resultados obtenidos muestran distintas conclusiones: en primer lugar es posible detectar SOD1 y trazas de GPx así como de catalasa en las distintas células. Además, a medida que aumenta la concentración de cisplatino, se hace evidente la presencia de un pico en el volumen muerto con este metal. Además, es posible detectar la presencia de los tres enzimas en estudio aunque la concentración de la GPx es muy baja en este caso. Estos cromatogramas ponen de manifiesto que a medida que aumenta la cantidad de platino, disminuye la de SOD1 como vemos en los elementos Zn y Cu (ligeramente desplazados en cuanto a tiempo de retención respecto a patrón) y la catalasa mientras que la concentración de la GPx mantiene prácticamente el mismo área.

5- CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son:

- 1) Es posible desarrollar un método cromatográfico que permita detectar simultáneamente tres enzimas antioxidantes (SOD1, GPx y Catalasa) mediante cromatografía de exclusión por tamaños y detección con UV e ICP-MS.
- 2) Las tres enzimas han sido detectadas en muestras de cultivos celulares de cáncer de ovario expuestos a cisplatino empleando la metodología desarrollada. Sin embargo, la presencia de otras especies hace necesario para futuros experimentos probablemente el fraccionamiento de las muestras (p.e. ultracentrifugación con membranas) para mejorar la separación de especies.
- 3) El análisis semicuantitativo de las muestras ha revelado que a medida que aumenta la concentración de cisplatino, parecen descender los niveles de SOD1 y Catalasa lo que parece indicar un aumento del estrés oxidativo inducido por cisplatino que genera un desgaste mayor de la defensa antioxidante de las células aunque estudios cuantitativos han de ser realizados.

6- BIBLIOGRAFÍA

- Akladios, F. N., Andrew, S. D., & Parkinson, C. J. (2015). Selective induction of oxidative stress in cancer cells via synergistic combinations of agents targeting redox homeostasis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(13), 3097–3104.
- Balaban, R. S.; Remoto, S. & Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants and Aging Cell, 120 (4): 483-495.
- Bulska, E., Danko, B., Dybczyński, R. S., Krata, A., Kulisa, K., Samczyński, Z., & Wojciechowski, M. (2012). Inductively coupled plasma mass spectrometry in comparison with neutron activation and ion chromatography with UV/VIS detection for the determination of lanthanides in plant materials. *Talanta*, 97, 303–311.
- Darley-Usmar, V. & Starke-Reed, P.E. (2000). Antioxidants: Strategies for Interventions in Aging and Age-Related Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2: 375–377.
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
- Fang, Y. Z.; Yang, S. & Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872- 879.
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., & Guillaume, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 161–173.
- García-Alvarez-Coque, M. C., Ruiz-Angel, M. J., Berthod, a., & Carda-Broch, S. (2015). On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Analytica Chimica Acta*, 883, 1–21.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and Cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*.

- Hess, J. a., & Khasawneh, M. K. (2015). Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. *BBA Clinical*, 3, 152–161.
- Imlay, J.A. Pathways of Oxidative Damage. (2003). *Annual Reviews of Microbiology*, 57: 395–418.
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5 SPEC. ISS.), 340–352.
- Kim, J. W., Nie, B., Sahm, H., Brown, D. P. G., Tegeler, T., You, J. S., & Wang, M. (2010). Targeted quantitative analysis of superoxide dismutase 1 in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(7-8), 700–704.
- Longchar, A., & Prasad, S. B. (2015). Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. *Toxicology Reports*, 2, 489–503.
- McCord, J. M., & Edeas, M. a. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 59(4), 139–142.
- Miar, A., Hevia, D., Muñoz-Cimadevilla, H., Astudillo, A., Velasco, J., Sainz, R. M., & Mayo, J. C. (2015). Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon and lung cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 85, 45–55.
- Miller, A. F. Superoxide Dismutases: Active Sites that Save, but a Protein that Kills. (2004). *Current Opinion in Chemical Biology*, 8: 162–168.
- Neault, J. F., Benkirane, a., Malonga, H., & Tajmir-Riahi, H. a. (2001). Interaction of cisplatin drug with Na,K-ATPase: Drug binding mode and protein secondary structure. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 86(2-3), 603–609.

Nuevo Ordoñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., & Sanz-Medel, a. (2010). Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. *Analytical Chemistry*, 82(6), 2387–2394.

Ordóñez, Y. N., Deitrich, C. L., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Feldmann, J., & Sanz-Medel, a. (2011). Species specific isotope dilution versus internal standardization strategies for the determination of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(1), 150.

Otto, C. M., & Prendergast, B. (2014). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-sod (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and Ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–349.

Palipoch, S., Punsawad, C., Chinnapun, D., & Suwannalert, P. (2013). Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by curcumin and α -tocopherol. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 973–979.

Reddi, A. R., Jensen, L. T., Naranuntarat, A., Rosenfeld, L., Leung, E., Shah, R., & Culotta, V. C. (2009). The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(2), 154–162. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.032>

Sepsey, A., Bacskay, I., & Felinger, A. (2014). Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions. *Journal of Chromatography A*, 1331, 52–60.

Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265–7279.

Tanaka, M., Kuribayashi, K., Kogawa, K., Nakamura, K., & Watanabe, N. (2013). Intracellular superoxide dismutase activity defines invasiveness of the murine T-lymphoma cell line L5187Y-ML25 in vitro and in vivo. *Leukemia Research*, 37(1), 89–92.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M. T. D. Mazura, M. & Telser, J. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84.

Viñas, G., Puig, T., & Porta, R. (2012). Estrés oxidativo en pacientes con cáncer: dos caras de una misma moneda. *Medicina Clinica*, 139(4), 171–175.