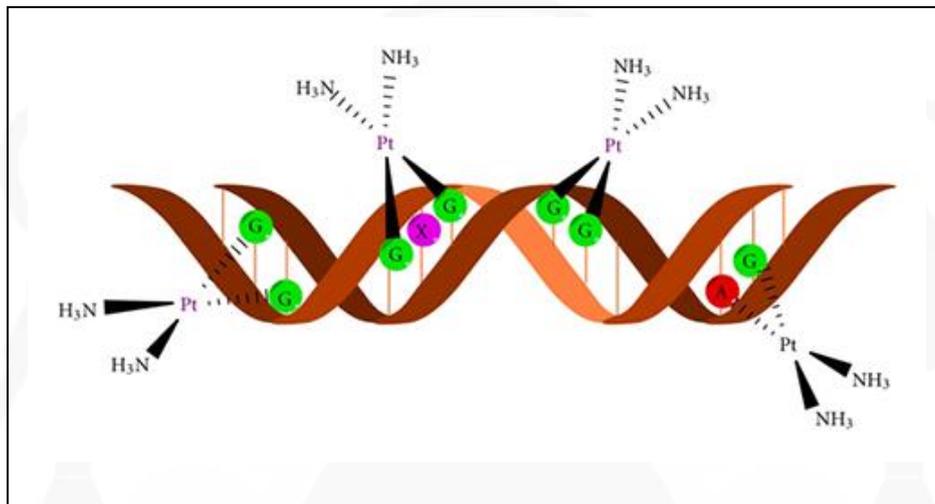


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

Estudio de compuestos platinados para el tratamiento de cáncer de ovario y pulmón



Paula González Carrera

Departamento de Química Física y Analítica

Facultad de Química (Universidad de Oviedo)

Junio 2024



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad global, que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células que pueden destruir y reemplazar tejidos sanos y extenderse por todo el cuerpo mediante un proceso llamado metástasis. En 2022, hubo casi 20 millones de nuevos casos y aproximadamente 10 millones de muertes, siendo el cáncer de pulmón el más común y mortal. Por otro lado, ese mismo año se diagnosticaron a nivel global 324,000 nuevos casos de cáncer ovario. Este cáncer tiene una alta tasa de letalidad debido a la ausencia de síntomas durante las primeras etapas de desarrollo, la adquisición de resistencia a agentes quimioterapéuticos y las altas tasas de recurrencia (70-80%).

Los tratamientos tanto para el cáncer de pulmón como de ovario incluyen cirugía y quimioterapia, siendo los compuestos platinados como el cisplatino o carboplatino los más empleados. Sin embargo, debido al uso prologado de estos agentes, se acaban desarrollando resistencias, además de que puede provocar efectos secundarios significativos. Para mejorar su eficacia y reducir la toxicidad, se investigan nuevas combinaciones terapéuticas y análogos platinados, como el PT-112, un nuevo compuesto en desarrollo cuya forma química es de pirofosfato de platino.

En este trabajo se estudió la viabilidad celular, así como la capacidad de incorporación del cisplatino a diferentes modelos celulares a través de su interacción con su diana terapéutica que es el ADN, en células sensibles y resistentes de cáncer de ovario y pulmón. Además de la medida de platinación del DNA, se han iniciado estudios de platinación de otros compartimentos celulares (ARN y proteínas) para poder comparar las diferentes líneas en el futuro e incluso el empleo de nuevos compuestos alternativos a cisplatino.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. It is characterized by the uncontrolled growth of tumor-forming cells that destroy and replace healthy tissues and spread throughout the body in a process called metastasis. In 2022, there were nearly 20 million new cases and about 10 million deaths, among which, lung cancer was the most common and fatal. Additionally, 324,000 new cases of ovarian cancer were diagnosed globally. This cancer is extremely deadly due to the lack of early symptoms, resistance to chemotherapeutic agents, and high recurrence rates (70-80%).

Treatments for lung and ovarian cancer include surgery and chemotherapy, especially platinum-based compounds such as cisplatin or carboplatin. However, long-term use of these agents can lead to the development of drug resistance and significant side effects. To enhance their efficacy and reduce toxicity, new therapeutic combinations and platinum analogues, such as PT-112, a novel compound in development, are being investigated with the structure of a platinum pyrophosphate.

In this work, we studied the cell viability and the incorporation capacity of cisplatin in different cellular models through its interaction with its therapeutic target, which is DNA, in both sensitive and resistant ovarian and lung cancer cells. In addition to measuring DNA, studies on the platination of other cellular compartments (RNA and proteins) have also been initiated to compare the different cell lines in the future and even consider the use of new compounds as alternatives to cisplatin.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Paula González Carrera, declaro que todo el contenido recogido en este Trabajo Fin de Grado es original y que todas las fuentes de información empleadas han sido correctamente citadas.

ÍNDICE

1. Introducción: definición, clasificación y estadística del cáncer de ovario y pulmón.....	1
1.1. Tratamientos para el cáncer de ovario y pulmón.....	2
1.2. Cisplatino: características, mecanismos de acción y resistencia.....	3
1.3. Otros compuestos platinados.....	4
1.4. Medida de incorporación celular de los compuestos de platino. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	5
1.5. Objetivos.....	6
2. Materiales y métodos	7
2.1. Cultivo celular.....	7
2.2. Determinación de viabilidad celular	8
2.4. Extracción de ADN de células	9
2.5. Análisis de incorporación de platino en el DNA mediante FIA-ICP-MS.....	9
2.6. Estudio inicial del fraccionamiento de nucléolos y sus componentes macromoleculares a partir de células A549	10
2.7. Cuantificación de elementos macromoleculares: ARN y proteína	11
3. Resultados	11
3.1. Comparación morfología líneas celulares	11
3.2. Viabilidad celular tras tratamiento con compuestos de platino.....	12
3.3. Estudio de la platinación del ADN mediante FIA-ICP-MS.....	15
3.4. Análisis de la incorporación de platino en células de cáncer de pulmón y fraccionamiento.	17
4. Discusión.....	23
5. Conclusiones	25
6. Bibliografía	26

1. Introducción: definición, clasificación y estadística del cáncer de ovario y pulmón

La organización mundial de la salud define el cáncer como “un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo”. Se caracterizan por el rápido crecimiento de células anormales, creando masas denominadas tumores, que pueden destruir y reemplazar tejidos sanos y, en último término, diseminarse por todo el cuerpo en un proceso llamado metástasis [1].

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Según las estadísticas del Global Cancer Observatory (GCO), la agencia internacional de investigación del cáncer, en 2022 se diagnosticaron casi 20 millones de casos nuevos en todo el mundo. Además, cerca de 10 millones de muertes fueron causadas por estas patologías, siendo el cáncer de pulmón el de mayor incidencia (12,4% de todos los casos globales) y mayor mortalidad (18,7%) en ambos sexos [2].

El mayor factor de riesgo de padecer cáncer de pulmón está asociado al consumo de tabaco. Sin embargo, los avances realizados en el área han permitido reducir la mortalidad. Por otra parte, un 4% por año, tanto en hombre como mujeres, entre los años 2017 a 2021, según datos recogidos por la ACS (American Cancer Society). El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos principales: no microcítico (80-85%) y microcítico (10%-15%). El no microcítico se puede clasificar en adenocarcinoma (40%), carcinoma de células escamosas (20%-25%) y carcinoma de células grandes (10%-15%). La edad media de diagnóstico es 70 años, y la probabilidad de padecer cáncer para un hombre es de 1 en 16, mientras que para una mujer es de 1 en 17. La tasa de supervivencia relativa a cinco años para el cáncer de pulmón no microcítico es del 23%, mientras que para el microcítico es menor, el 6% [3],[4]. En España, en el año 2022, se diagnosticaron 30.196 nuevos, tratándose del cuarto cáncer más común en la población [5].

En cuanto a las mujeres, el cáncer de ovario es uno de los más letales, situándose octavo en el ranking de mortalidad, debido a la ausencia de síntomas específicos durante las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad, el desarrollo de resistencias a agentes quimioterapéuticos y las altas tasas de recurrencia (70-80% de los casos). Este tipo de tumor maligno puede afectar tanto a los ovarios como a las trompas de Falopio y al peritoneo [6].

En 2022 se diagnosticaron alrededor de 324.000 nuevos casos de cáncer de ovario, con una tasa de incidencia de 6,7 casos por 100.000 personas y una tasa de mortalidad de 4,2 casos/100.000 personas, mientras que, en España, según datos de la AECC, se detectaron 14 casos por 100.000

habitantes. La tasa de supervivencia relativa a cinco años es del 50,8%, y afecta principalmente a mujeres mayores de 45 años [7].

El cáncer de ovario puede clasificarse en dos tipos principales según la célula de origen afectada: epitelial (90%) y no-epitelial (10%) (incluyendo tumor de estroma de cordón sexual y tumor de células germinales). El epitelial se puede subclasificar en mucinoso (3%) y no mucinoso (97%), y este último a su vez se clasifica en carcinoma seroso (70% de no-mucinosos) (de alto o bajo grado), carcinoma de endometrio (10%), carcinoma de células claras (10%) y subtipos inespecíficos (5%) [8].

Según su progresión, el cáncer de ovario puede ser clasificado en distintos estadios establecidos por la FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). El estadio I incluye tumores que se encuentran confinados en los ovarios; en el estadio II, uno o ambos ovarios se ven afectados y existe propagación a otros órganos de la pelvis o desarrollo de cáncer peritoneal primario. En el estadio III, hay una propagación hacia el peritoneo fuera de la pelvis y/o metástasis en los ganglios linfáticos. Y, por último, en el estadio IV, se produce metástasis que afecta a órganos distantes [9].

1.1. Tratamientos para el cáncer de ovario y pulmón

Los principales tratamientos para el cáncer de ovario normalmente incluyen una combinación de cirugía y quimioterapia [10].

- Cirugía: la cirugía citoreductora es la más común durante las primeras etapas de desarrollo del cáncer, aunque dependiendo de la extensión de la masa tumoral, también pueden realizarse histerectomía (extirpación del útero y cuello uterino) o salpingooforectomía (extirpación de ovario y trompa de Falopio) unilateral o bilateral a las pacientes, entre otras.

- Tratamientos quimioterapéuticos: En cuanto a la quimioterapia, los agentes platinados como el cisplatino y el carboplatino son los más empleados.

En cuanto al cáncer de pulmón, el tratamiento varía dependiendo del tipo y estadio. El tratamiento más común combina cirugía y quimioterapia, aunque si el cáncer se encuentra en los estadios I ó II se puede tratar con radioterapia. El agente quimioterapéutico más utilizado es el cisplatino, al igual que en el tratamiento de cáncer de ovario, que se suele utilizar en combinación con otros agentes como el paclitaxel o docetaxel [11]

1.2. Cisplatino: características, mecanismos de acción y resistencia.

El cisplatino o cisdiaminodicloroplatino (II) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, (CAS No. 15663-27-1) se emplea en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como sarcomas, linfomas, carcinomas y tumores de células germinales, así como cáncer de ovario, pulmón, cabeza y cuello, vejiga y testículos.

Se trata de un compuesto neutro con una molécula de platino (II) central unido a dos átomos de cloro y moléculas de amoníaco en posición cis (Figura 1). Tiene una masa molar de 300,5 g/mol, densidad de 3,7 g/cm³ y una solubilidad en agua de 2,53 g/L a 25°C. Es un polvo cristalino de color amarillento a temperatura ambiente. Fue aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) en 1978 [12].

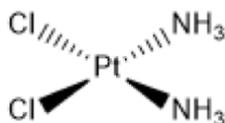


Figura 1. Estructuras químicas de cisplatino (1).

El cisplatino es un compuesto que se activa cuando uno o ambos cloros son reemplazados por moléculas de agua, lo que lo hace altamente reactivo. Esta reacción ocurre espontáneamente en el citoplasma debido a la baja concentración de iones cloruro. Debido a su naturaleza electrófila, puede formar enlaces covalentes con proteínas que contienen azufre y con ácidos nucleicos [13].

Además, el cisplatino se une con alta afinidad al ADN mitocondrial y nuclear, específicamente mediante la formación de un enlace covalente en la posición N7 del anillo imidazol de dos guaninas adyacentes. Debido a la formación de estos aductos, se inhiben los mecanismos de replicación del DNA. Cuando la cantidad de daño en el ADN causado por el cisplatino es limitada, los sistemas de reparación celular pueden reconocer y eliminar estas lesiones. Por el contrario, cuando el daño inducido por el cisplatino no puede repararse, la detención del ciclo celular puede volverse permanente (senescencia celular) o las células pueden entrar en apoptosis [14].

Asimismo, se ha observado que el cisplatino genera especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente o indirectamente a través de la mitocondria. Un aumento en la concentración de estas especies puede llevar a la peroxidación lipídica, generándose como producto final malondialdehído (MDA), que aumenta la carbonilación de las proteínas resultando en un aumento del estrés oxidativo en las células [15].

A pesar de las ventajas de los compuestos platinados, y debido al uso prolongado de estos agentes, se pueden originar resistencias en las que las células ya no responden a los medicamentos que normalmente les afectan. Esta resistencia puede deberse a distintos mecanismos, entre los que se incluyen la capacidad de sobrellevar los cambios genéticos inducidos por el platino mediante procesos de reparación del ADN o bien de expulsar dichos compuestos o reducir su entrada antes de que lleven a cabo su acción [16].

Además, estos compuestos platinados pueden presentar efectos citotóxicos secundarios como nefrotoxicidad (28–36% de pacientes), ototoxicidad (90%), neurotoxicidad (30%), toxicidad gastrointestinal (70–80%), otros efectos no deseados menos frecuentes son hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, toxicidad hematológica y toxicidad visual, que reducen significativamente la calidad de vida de los pacientes y obligan a reducir la dosis del medicamento o incluso a su interrupción completa [17].

Por todo ello, en la actualidad se buscan alternativas para mejorar la efectividad del cisplatino y reducir sus efectos secundarios. Entre ellas destaca la combinación con otros fármacos, como paclitaxel o docetaxel para el cáncer de ovario, o con UFT (combinación de tegafur y uracilo) para el tratamiento de carcinoma de pulmón no microcítico avanzado [18, 19, 20].

1.3. Otros compuestos platinados

Para evitar los efectos secundarios del cisplatino hay numerosos estudios en busca de nuevos análogos platinados. Actualmente los únicos aprobados por la FDA para tratamiento son el carboplatino y oxaliplatino (Figura 2), mientras que aún se encuentran en análisis clínicos el nedaplatino, heptaplatino y lobaplatino [21].

El mecanismo de acción del carboplatino y el oxaliplatino es análogo al del cisplatino, se une al ADN formando aductos, lo que lleva a la apoptosis celular. Los efectos tóxicos del carboplatino, en comparación con el cisplatino son menores, debido a que la activación y la unión al ADN son más lentas, sin embargo son necesarias dosis más altas de carboplatino para que resulte efectivo [21, 22, 23].

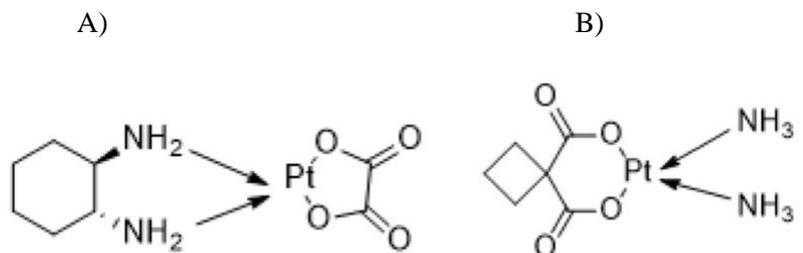


Figura 2. Estructuras químicas de oxaliplatino (A) y carboplatino (B).

En la misma línea, el compuesto platinado PT-112, (R,R-1,2-ciclohexanodiamina-pirofosfato-platino(II)) se encuentra en las fases 1/2 de desarrollo farmacéutico. Estudios recientes han demostrado una reducción en su capacidad de unión al ADN, en comparación a otros compuestos platinados, presentando mínima toxicidad renal y neurotoxicidad. Sin embargo el mecanismo de acción de PT-112 todavía no ha sido descrito de forma detallada [24, 25].

1.4. Medida de incorporación celular de los compuestos de platino. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Investigar las causas y mecanismos de resistencia al cisplatino puede proporcionar información valiosa para la identificación de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento o al desarrollo de nuevos fármacos que disminuyan la resistencia de los existentes. Como se ha comentado, una fuente importante de resistencia puede ser una acumulación disminuida de cisplatino en las células cancerosas, que ha sido observada frecuentemente en células resistentes. Por ello, la determinación intracelular de platino o incluso más específicamente, la platinación del ADN resultan importantes parámetros a tener en cuenta para detectar resistencia celular al mismo. En este sentido, la cuantificación de la incorporación de platino en cultivos celulares tratados con cisplatino se ha llevado a cabo mediante ICP-MS de manera global tras la digestión de la muestra.

Aunque existen diferentes posibilidades para evaluar la incorporación celular de los compuestos de platino, hoy en día la medida más sensible se realiza empleando sistemas de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, por sus siglas en inglés) que es una técnica de análisis elemental con una alta sensibilidad, que utiliza como fuente de ionización el plasma de argón. Permite identificar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Para la introducción de la muestra, se utiliza un sistema de nebulización automática cuya función es generar un aerosol de gotas pequeñas y uniformes de la muestra. La presencia de una cámara de nebulización evita que las gotas más grandes lleguen al plasma y solo las más pequeñas lo hagan.

Durante el análisis, cuando las gotas de muestra llegan al plasma, estas sufren un proceso de desolvatación, vaporización, atomización e ionización, formando iones elementales monocargados de los elementos que estuvieran presentes en la muestra. Dichos iones se separan en función de su relación m/z y la señal detectada aumenta en proporción al número de iones que llegan al detector [26]. Estos iones se dirigen a través de la lente de iones y entran en el espectrómetro de masas, donde serán separados en función de su relación masa/carga, y serán analizados por el detector [27].

1.5. Objetivos

Los compuestos platinados son una herramienta eficaz para el tratamiento de tumores malignos de ovario y pulmón. Sin embargo, el desarrollo de resistencias a estas quimioterapias suponen una grave amenaza para la supervivencia de los pacientes. Por ello, es necesario ahondar, por un lado en la incorporación celular de los fármacos en función del tipo de células en estudio así como en el estudio de las posibles resistencias que pudieran desarrollarse y que puedan encontrarse en la práctica clínica, así como en la evaluación de nuevas terapias de compuestos platinados.

En esta línea, en el presente trabajo de fin de grado se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar la sensibilidad de diferentes modelos celulares de cáncer de ovario y de pulmón en el tratamiento con cisplatino a través de estudios espectrofotométricos de viabilidad celular.
2. Estudio de la platinación del ADN en los modelos celulares anteriores como medida de la eficacia del fármaco a través de estrategias de espectrometría de masas elemental (ICP-MS).
3. Iniciar estudios de fraccionamiento celular para poder establecer la platinación de otros compartimentos (p.e. ARN y proteínas) dentro de los nucleolos celulares.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo celular

Para la primera parte del estudio se usaron 3 tipos de líneas celulares adherentes de cáncer de ovario: A2780, carcinoma epitelial de ovario; A2780cis, versión resistente de A2780 a cisplatino, y OVCAR3, adenocarcinoma epitelial de ovario. Adicionalmente se utilizó la línea A549 de carcinoma epitelial de pulmón.

Para el cultivo de las células se siguieron las recomendaciones de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Brevemente, las líneas celulares A2780 y A2780 cis se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SBF). Por su parte, las células OVCAR3 se cultivaron en medio RMPI-1640 (Gibco), suplementado con 20% SBF y 0,01 mg/mL de insulina. Por último, para la línea A549 se utilizó medio DMEM con 10% SBF. En todos los casos, se añadió 0,2% de plasmocin (InvivoGen) para evitar la contaminación por micoplasma. Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta que alcanzaron un 80% de confluencia (Figura 2), correspondiente con la etapa de crecimiento exponencial. Para el subcultivo celular, se lavaron las células con PBS y se añadió 1 mL de tripsina para levantar las células, incubando a 37°C. Una vez en suspensión, se añadió medio de cultivo y se centrifugaron las células durante 5 min a 1.300 rpm para finalmente plaquearlas en un nuevo flask a un ratio 1:3. Todos los procedimientos de cultivo celular se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar.

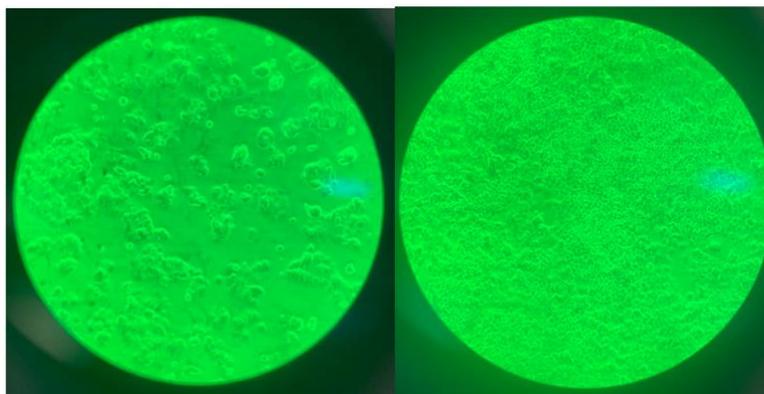


Figura 2. Comparación de diferentes momentos durante el crecimiento celular de OVCAR 3, al microscopio óptico (aumento objetivo 10x). A la izquierda, se observan las células al inicio de la fase exponencial y a la derecha, al final de la misma.

2.2. Determinación de viabilidad celular

Tras el tratamiento con compuestos de platino, se empleó el reactivo WST-1, el cual se utiliza para la cuantificación espectrofotométrica de la proliferación celular, el crecimiento, la viabilidad y la quimiosensibilidad en células. El ensayo está basado en la actividad metabólica de las células, las enzimas celulares reaccionan con el WST-1 formando formazán (color rojo intenso). En resumen, a mayor absorbancia mayor número de células viables.

En primer lugar, se determinó la concentración celular (células/mL) utilizando una cámara de Neubauer para el conteo en microscopio óptico. Se sembraron 15.000 células por pocillo (500 μL /pocillo) en una placa de 24 pocillos, y se dejaron en el incubador por 24 h para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos. Después, se añadieron concentraciones crecientes de los tratamientos, por duplicado. Concretamente, para las líneas de cáncer de ovario (A2780, A2780cis y OVCAR3) se trataron las células durante 72 h con las siguientes concentraciones de cisplatino: 0 μM (control), 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 60 μM . En cuanto a la línea de carcinoma pulmonar A549, se trató con distintas concentraciones de cis-Pt (0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM ; 60 μM) durante 24, 48 y 72 h. Pasados los tiempos de tratamiento, se eliminó el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 200 μL /pocillo de una solución del reactivo WST-1 (18 μL reactivo/mL de medio completo). Tras 1 h de incubación (o cuando el reactivo adquirió una coloración naranja intensa), se pasaron 85 μL de cada tratamiento (por duplicado) a un nuevo pocillo en una placa de 96 para proceder a la medición de la absorbancia a 440 nm utilizando el lector de placas de ThermoFisher Scientific Varioskan Flash.

El tratamiento de los datos obtenidos se realizó mediante el software Graphpad versión 10.2.2, mediante un modelo de regresión no lineal, (log(inhibitor) vs. response-variable slope, no constrain), para la obtención de las curvas de supervivencia celular y las concentraciones inhibidora media máxima (IC_{50}).

2.3. Inducción de resistencia en OVCAR3

Se trató de inducir resistencia al cisplatino a las células OVCAR3. Para ello, se mantuvieron en cultivo durante dos semanas, a 37°C, 5% de CO_2 y 95% de humedad, de forma que, cada vez que se hacía un pase se añadía cisplatino al medio (concentración IC_{25}).

2.4. Extracción de ADN de células

Para la extracción de ADN de las líneas de cáncer de ovario se utilizó un Kit de extracción de ADN (PureLink, DNA Mini Kit, Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo PureLink Genomic DNA mini kit. Las células se levantaron mediante tripsinización, se resuspendieron en 200 μL de PBS y se añadieron 20 μL de Proteínasa K y 20 μL de ARNasa A. Se incubaron durante 2 min para luego añadir un buffer de lisis que incluye el kit, incubando durante 10 min a 55°C, para posteriormente añadir 200 μL de etanol 100%. Se añadió la muestra a una columna de purificación y se procedió al lavado del ADN con los buffer suplementados en el kit. Posteriormente se añadieron 50 μL del buffer de elución y se centrifugó para obtener el ADN purificado, que se almacenó a -20°C.

Se utilizó como concentración de cisplatino el IC_{75} correspondiente a cada línea celular, durante un periodo de incubación de 3 horas.

2.5. Análisis de incorporación de platino en el DNA mediante FIA-ICP-MS

En este estudio se trabajó con el método denominado análisis por inyección de flujo (*Flow Injection Analysis- Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry*, FIA-ICP-MS). En este tipo de análisis, una bomba peristáltica bombea de forma continua una disolución portadora (HNO_3 , al 2%) en la que se inyecta un pequeño volumen de la muestra de interés mediante una válvula de 6 vías. Este procedimiento permite obtener una alta frecuencia del muestreo, logrando realizar un seguimiento continuo blanco-muestra automatizado [28] y además, un consumo mínimo de muestra empleando el sistema que aparece en la Figura 4.

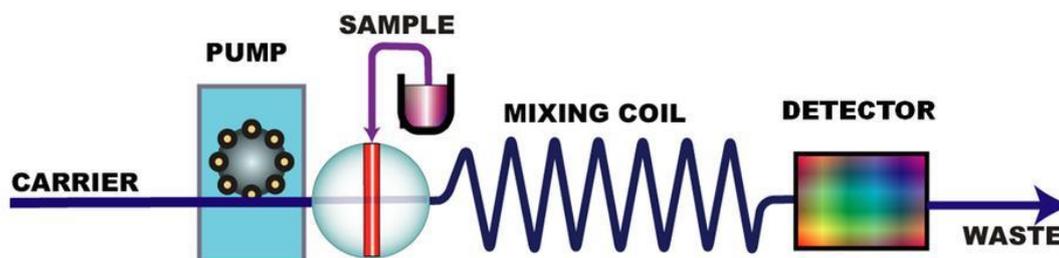


Figura 4. Esquema genérico del sistema de inyección en flujo. El detector en este caso es el ICP-MS

En el trabajo se utilizó la técnica FIA-ICP-MS para determinar la relación platino-ADN presente en la muestra, tras el tratamiento de las células de ovario con cisplatino. Este último para determinar la cantidad de ADN presente en cada muestra (ya que la cantidad de fósforo detectada es proporcional a la cantidad de ADN). Para ello se realizaron calibrados de Pt de concentración 4, 8, 10 y 20 ppb y de fósforo 3, 12, 18 y 24 ppm a través de la digestión de muestras de ADN comercial de concentración. Una vez purificado el ADN siguiendo los pasos descritos en 2.4., se diluyeron las muestras en una relación 1:10 antes de inyectarlas en el equipo. Se realizaron mediciones tanto de platino como de fósforo

2.6. Estudio inicial del fraccionamiento de nucléolos y sus componentes macromoleculares a partir de células A549

Tras plaquear 5 millones de células A549 en un flask T75 y esperar 24 h a que dichas células se adhieran, se trataron con 25 μ M cis-Pt por triplicados. Dichas concentraciones de fármacos se seleccionaron basándonos en estudios previos. También se incluyeron células control sin tratar. Tras 8 h de incubación, se recogieron las células mediante tripsinización para proceder a la extracción de los nucléolos, siguiendo el protocolo descrito por Bai y Laiho [29]. Las células se resuspendieron en 1 mL del buffer de extracción nuclear (50 mM Tris-HCL, pH 7.04, 0.14 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% IGEPAL CA-630, 1 mM DTT) y se incubaron con agitación 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron, 5 min. 300 x g a 4°C, las muestras para separar la fracción nuclear de la citoplasmática. Se descartó el sobrenadante y se procedió a la extracción del nucléolo utilizando 3 buffers de concentraciones crecientes (0,25 M; 0,35 M; 0,88 M) de sacarosa.

Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento de los componentes macromoleculares (ADN, ARN, proteínas), utilizando un método basado en gradientes por trizol, descrito por Bai y Laiho [29]. Los nucléolos purificados se resuspendieron en 1 mL de Trizol, se añadieron 200 μ L de cloroformo, y tras una incubación de 3 min se centrifugaron las muestras. El pellet se guardó para aislar el ADN y proteínas más tarde, mientras que la fase acuosa (que contiene el ARN) se transfirió a un nuevo tubo y se añadió isopropanol al 100% para precipitar el ARN, que se lavó con etanol al 80%. El pellet se incubó con etanol 100% durante X min y tras la centrifugación, se aisló el ADN del sobrenadante tras añadir etanol al 75%. En cuanto al pellet, que contiene la proteína, se añadió isopropanol para favorecer la precipitación proteica y se lavó con una solución 0,3 M de cloruro de guanidinio y posteriormente con etanol al 100%.

Así obtenemos por separado el ADN digerido, ARN y proteína presente en el núcleo de la célula, y podremos analizar por separado la unión del cisplatino a cada uno de estos compuestos.

2.7. Cuantificación de elementos macromoleculares: ARN y proteína

Para la determinación de la concentración de ARN se utilizó la espectrofotometría de absorción UV mediante el equipo Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*), que permite analizar fragmentos de ARN y ADN, tanto de cadena sencilla como doble [30]. Para determinar la concentración de ARN, se midieron las muestras a 260 nm.

En cuanto a la cuantificación de proteína se utilizó el fluorímetro Qubit (*Thermo Fisher Scientific*), un equipo preciso, sensible y rápido que requiere bajos volúmenes de muestra y permite la cuantificación tanto de ADN, ARN y proteína, a bajas concentraciones [31]. Se realizó una curva de calibrado, usando tres reactivos estándar incluidos y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la medición, se diluyeron 20 μL de cada muestra con 180 μL de la *Qubit working solution*. La medida en el equipo indica directamente la concentración de proteína en la muestra.

La medida del contenido de platino se realizó mediante el mismo sistema de inyección en flujo acoplado en línea al ICP-MS anteriormente descrito.

3. Resultados

3.1. Comparación morfología líneas celulares

Entre la línea A2780 (línea parental) y la línea A2780 cis (resistente), pudieron observarse diferencias en su morfología. Como puede observarse en la Figura 5 la línea resistente tiene una forma alargada, además de que crecía lentamente en comparación con su línea parental. En cuanto a las líneas OVCAR3 y A549 apenas se aprecian diferencias morfológicas entre ellas, la línea A549 tenía un nivel de crecimiento mayor que el resto, por lo que requerían pases más frecuentes.

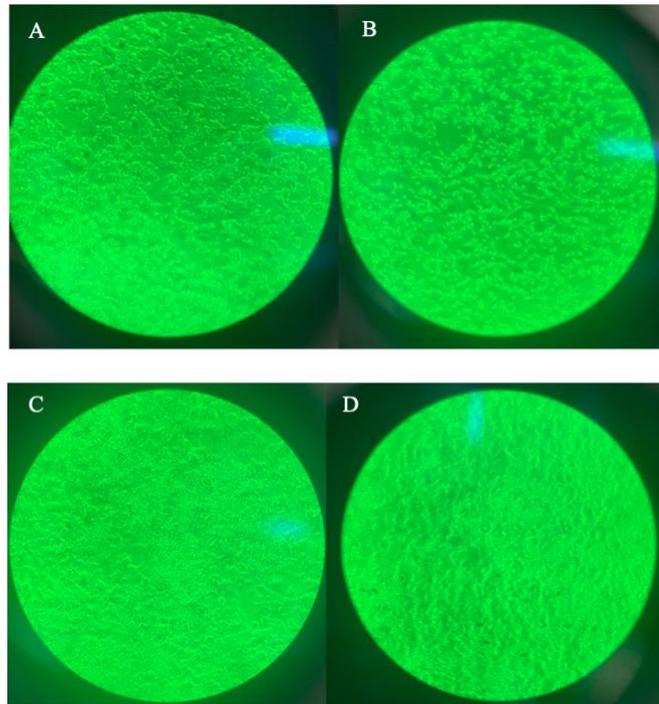


Figura 5. Células de cáncer de ovario A2780 (A), A2780 cis (B), OVCAR3 (C) y A549 (D) al microscopio óptico, aumento 10x.

3.2. Viabilidad celular tras tratamiento con compuestos de platino

Los primeros resultados obtenidos fueron los ensayos de proliferación y viabilidad celular de las líneas celulares A2780, A2780 cis y OVCAR3 empleando el ensayo WST1. De forma general, el ensayo WST-1 debe su nombre al reactivo empleado para la reducción del cloruro de tetrazolio a formazán, que contiene WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, España), una sal de color rojo claro y un agente de acoplamiento electrónico diluidos en un tampón fosfato salino. La reacción redox tiene lugar en el sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa y es dependiente de la oxidación de NADH a NAD⁺ (Figura 6). La NADH deshidrogenasa no es capaz de por sí de transferir electrones a la sal de tetrazolio, por lo que es necesario la presencia de un intermediario, como la menadiona. De este modo, al medir la cantidad de formazán, cuya formación está directamente correlacionada con la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, podemos conocer el número de células metabólicamente activas. Por lo tanto, mediante medidas de absorbancia, podemos conocer la viabilidad celular en los cultivos, de forma que valores elevados de absorbancia se correlacionan con alta viabilidad.

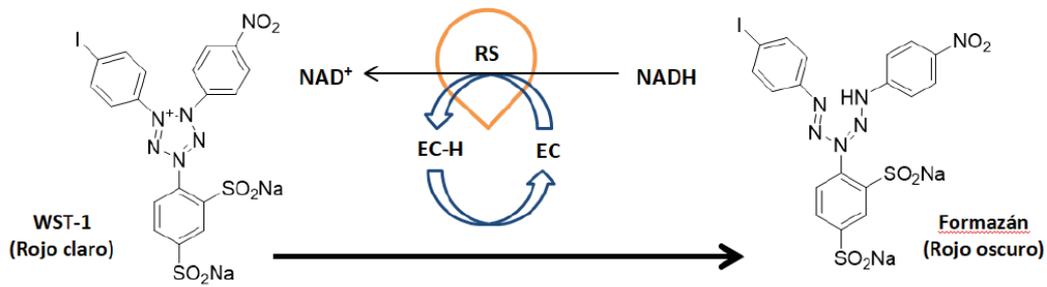
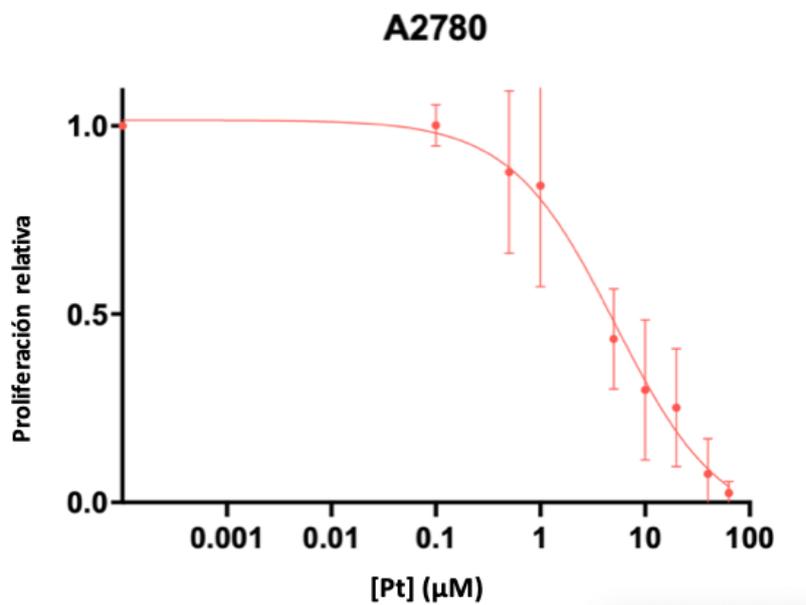


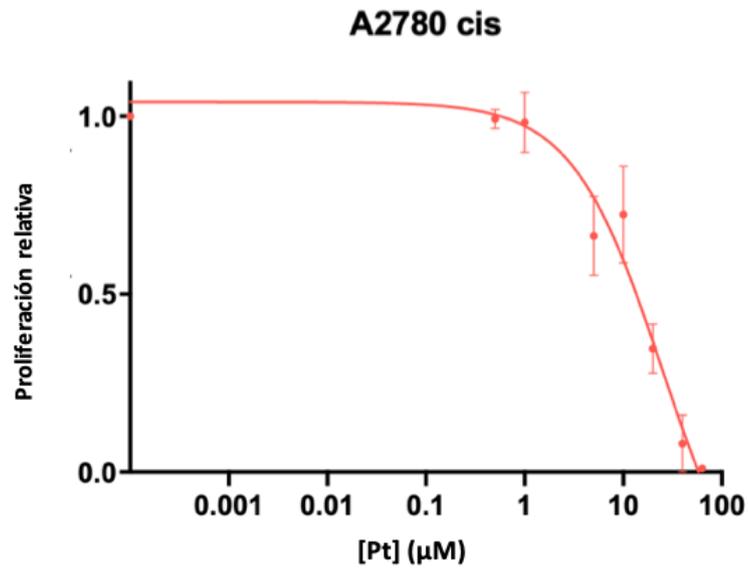
Figura 6. Esquema del funcionamiento del ensayo WST1.

Con los datos obtenidos se representó la concentración de cisplatino (en el eje de las x), frente a la tasa de proliferación (en el eje de las y), obteniéndose las curvas de supervivencia celular correspondientes (Figura 7) y determinando los valores de IC_{50} correspondientes a cada línea celular. A2780 $IC_{50}= 5,212 \mu M$, A2780cis $IC_{50}=24,82 \mu M$ y OVCAR3 $IC_{50}=4,667 \mu M$.

A)



B)



C)

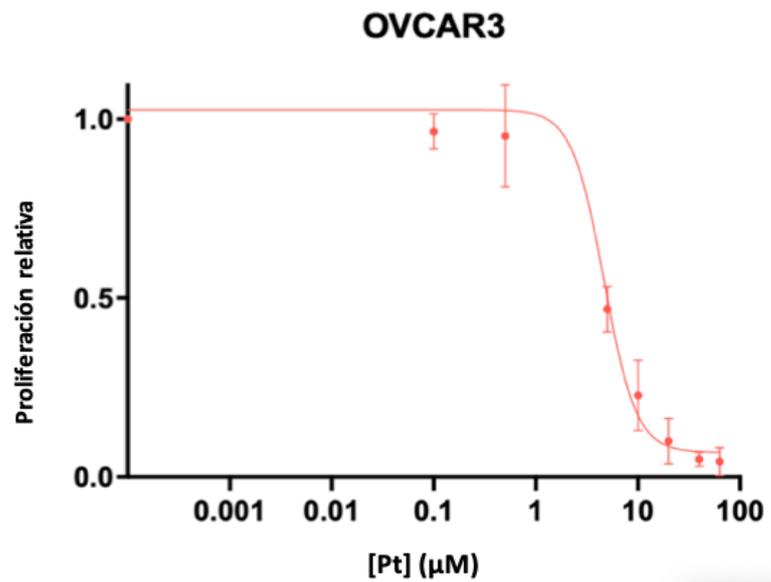


Figura 7. Curvas de supervivencia celular de las líneas A) A2780, B) A2780 cis y C) OVCAR3.

A partir de los IC_{50} , obtenidos mediante el software Graphpad, se obtuvo el valor de los IC_{75} , utilizando la fórmula: $IC_F = \left(\frac{F}{100-F}\right)^{1/H} \cdot IC_{50}$.

A2780 $IC_{75} = 15,636 \mu M$, A2780cis $IC_{75} = 74,46 \mu M$ y OVCAR3 $IC_{75} = 14,001 \mu M$

Esta fue la concentración utilizada posteriormente para tratar las células y extraer el ADN donde se llevarán a cabo las medidas de platinación con un tiempo de exposición al fármaco de 3h.

3.3. Estudio de la platinación del ADN mediante FIA-ICP-MS

Se determinó la cantidad total de platino y ADN, con el fin de determinar qué proporción se introdujo en el núcleo formando aductos con el ADN. Para ello, se calcularon en primer lugar las rectas de calibrado de platino y ADN (Figura 8 A y B, respectivamente). Esta última se obtuvo mediante digestión ácida de patrones de ADN comercial y medida del contenido de fósforo que es proporcional a la concentración de ADN en la muestra.

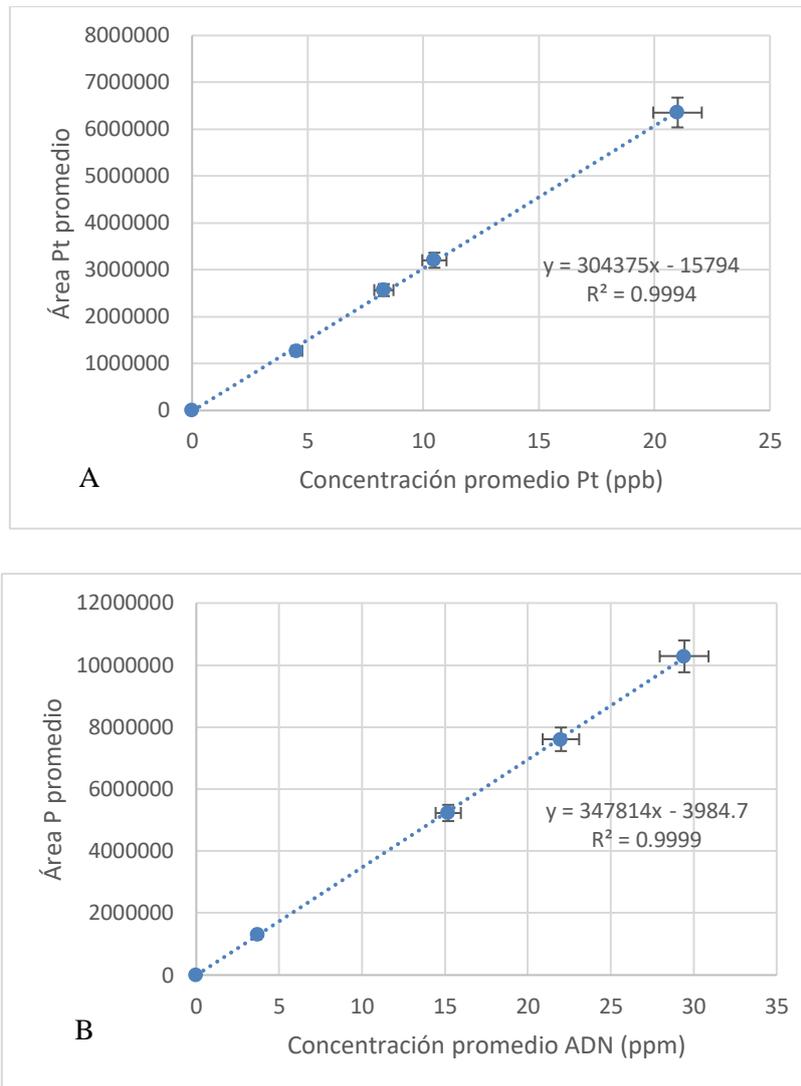


Figura 8. Calibrado obtenido con el FIA-ICP-MS realizado a partir de distintas concentraciones de A) platino y B) ADN (mediante la medida de P).

Con las rectas de calibrado se pudieron determinar las concentraciones en las muestras analizadas (ft platino/ μg de ADN), obteniendo los resultados representados en la Figura 9 para las líneas de cáncer de ovario sensibles a cisplatino.

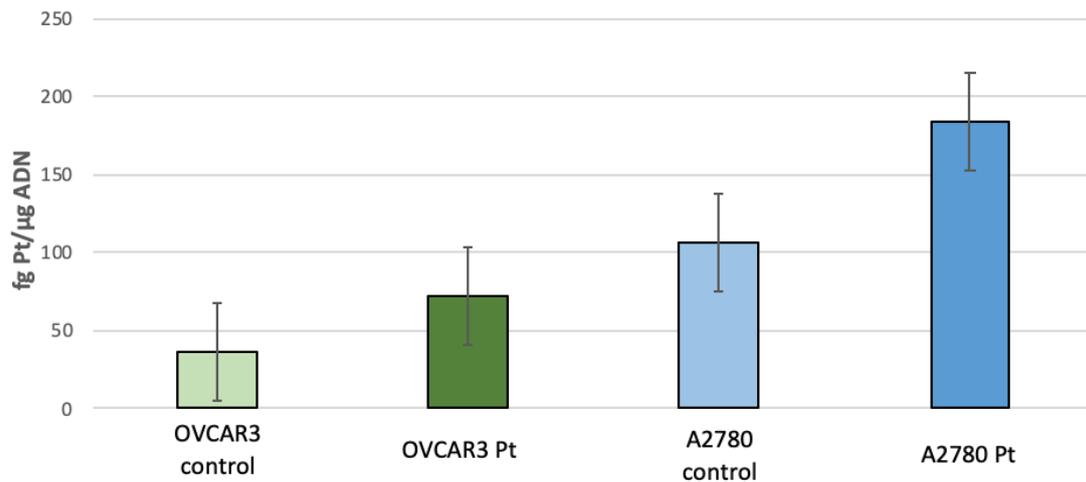


Figura 9. Representación gráfica de la concentración de platino (fg) respecto de la cantidad de ADN (μg) para las líneas de cáncer de ovario OVCAR3 (en verde) y A2780 (en azul). Se representan también los datos de las condiciones control donde no se añadió tratamiento.

Restándole el valor del control al tratamiento, obtenemos que la concentración de platino presente en OVCAR3 es de 35,13 fg Pt/ μg ADN y en las A2780 se corresponde con 77,01 fg Pt/ μg ADN.

3.4. Análisis de la incorporación de platino en células de cáncer de pulmón y fraccionamiento.

Como en el caso de la línea de ovario, se llevaron a cabo los ensayos de viabilidad de la línea A549 de cáncer de pulmón cisplatino y se elaboró la curva de muerte celular (Figura 10) a diferentes tiempos. La concentración que se decidió emplear fue de 25 μM de cisplatino y 8h de exposición. Posteriormente se procedió a evaluar el procedimiento de extracción de nucléolos y a la separación de ARN, proteína y ADN.

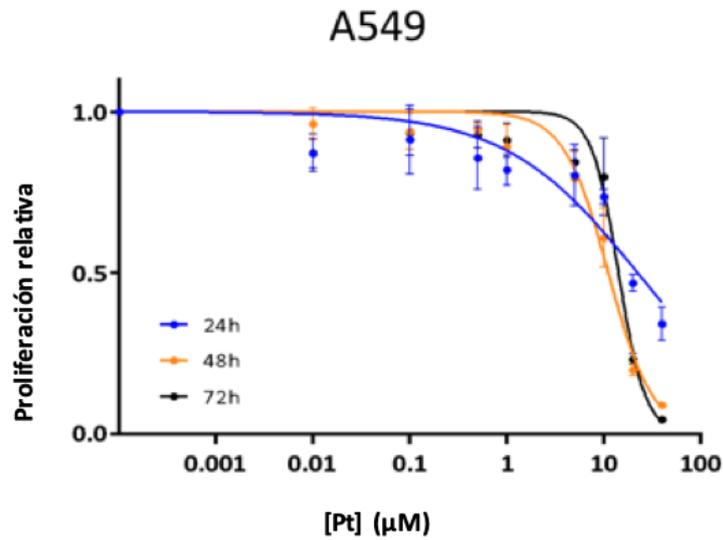


Figura 10. Curva de supervivencia celular de la línea A549.

En primer lugar, se determinaron las concentraciones de ARN (Tabla 1) y proteína (Tabla 2) de las muestras tratadas empleando las estrategias que se describen en la sección de Materiales y Métodos del presente Trabajo.

Tabla 1. Concentración ARN en los nucléolos de células A459 tras tratamiento durante 8 h con compuestos platinados (y condición control sin tratamiento).

CONDICIÓN	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN RNA ($\mu\text{g RNA/mL}$)
Control	R1	1828,3
	R2	1702,5
	R3	1670,2
	Media \pm SD	1733,67 \pm 83,53
Cisplatino	R1	1652,8
	R2	1712,2
	R3	1767,6
	Media \pm SD	1710,86 \pm 57,41

Tabla 2. Concentración de proteína en los nucleolos de A459

CONDICIÓN	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN PROTEÍNA (µg proteína/mL)
Control	R1	110
	R2	111
	R3	108
	Media ± SD	109,66 ±1,52
Cisplatino	R1	110
	R2	99,6
	R3	90,9
	Media ± SD	100,16 ± 9,56

A continuación, se determinó la cantidad de platino presente en las diferentes fracciones aisladas del núcleo celular. Para ello, se llevaron a cabo estrategias análogas a las empleadas para evaluar la interacción del platino con el ADN mediante FIA-ICP-MS de las diferentes fracciones digeridas.

Como en el apartado anterior, se introdujeron patrones de calibrado de platino y de ADN y se obtuvieron las áreas promedio de las señales, que se utilizaron para representar las rectas de calibrado correspondientes (Figura 11).

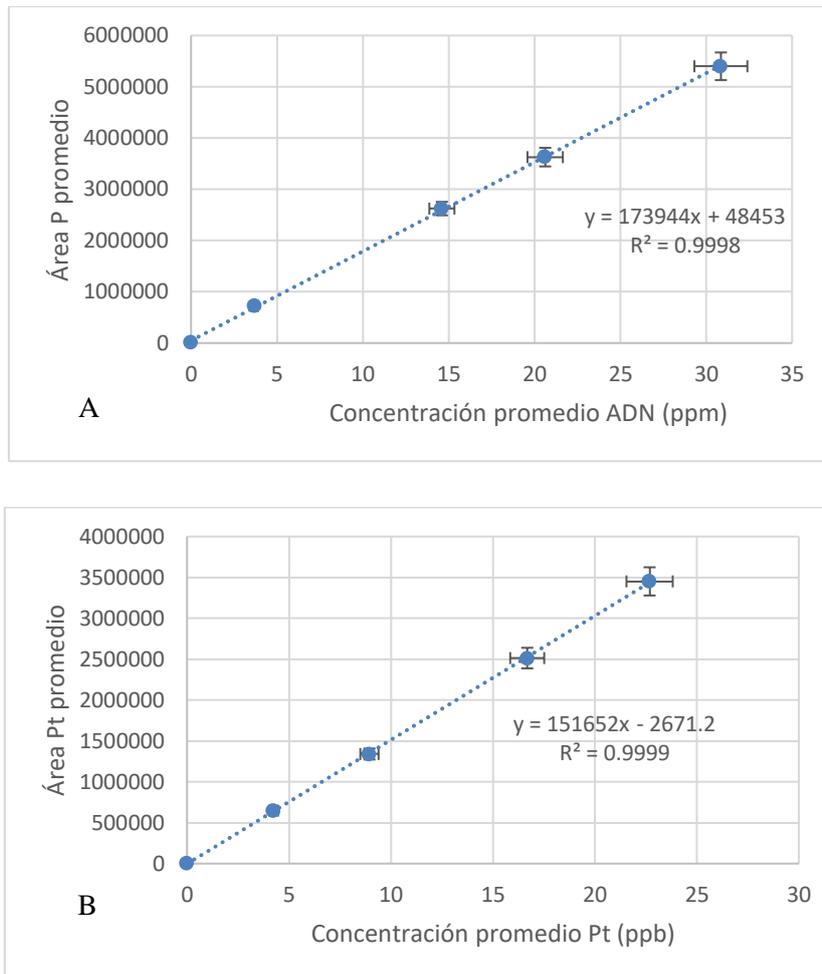


Figura 11. Calibrados obtenidos con el FIA-ICP-MS realizados a partir de distintas concentraciones de ADN (A) y platino (B)

En cuanto a las muestras de proteína y ARN, se analizó un patrón de platino por separado para cada una, como se muestra en la Figura 12.

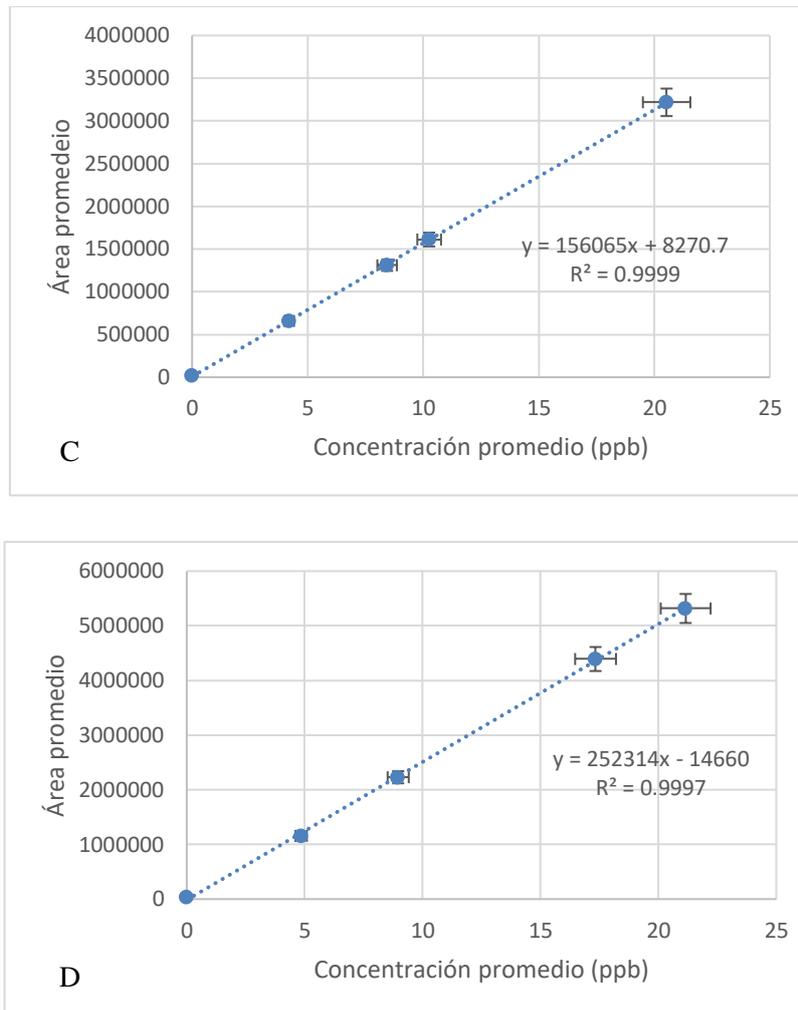


Figura 12. Calibrado obtenido con el FIA-ICP-MS realizado a partir de distintas concentraciones de platino, para las muestras de proteína (C) y ARN (D) medidas en diferentes días.

Con las rectas de calibrado y los resultados de cuantificación, se determinaron las concentraciones de cisplatino presente en cada componente macromolecular, tal y como se representa en la Figura 13.

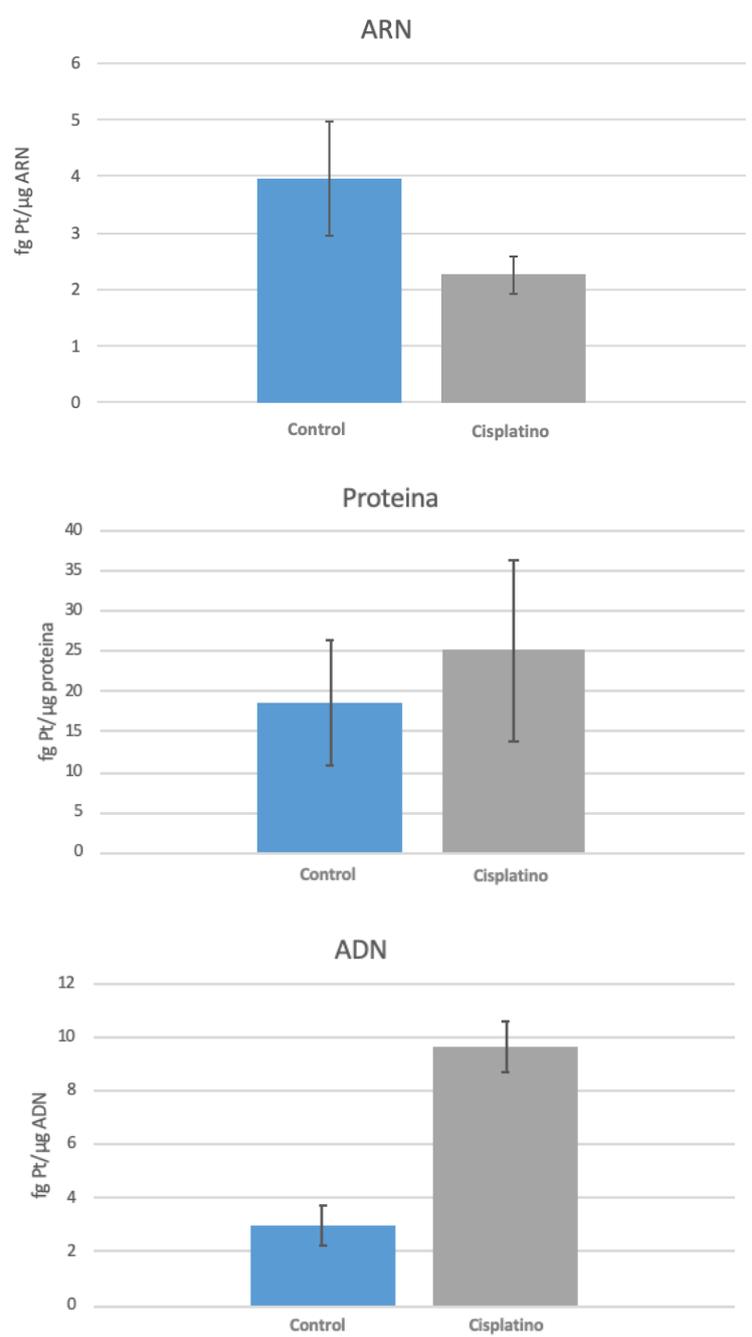


Figura 13. Comparación de las concentraciones de platino en ARN, proteína y ADN.

4. Discusión

Entre los tratamientos disponibles para los cánceres de ovario y pulmón destaca el uso de compuestos platinados, que han demostrado tener una alta eficacia en la resolución de estas patologías. Sin embargo, se han observado también el desarrollo de resistencias, de tal forma que, aunque durante las primeras etapas del tratamiento se detecta una ralentización y/o disminución de la progresión maligna, más adelante este efecto se revierte y el cáncer vuelve a avanzar. En el presente trabajo fin de grado se han evaluado los niveles de resistencia de varios modelos celulares de cáncer de ovario y de pulmón, así como la incorporación de compuestos platinados en elementos subcelulares.

En cuanto a los carcinomas de ovario, pudo observarse que la línea celular A2780cis fue la más resistente ($IC_{50}=24,82 \mu M$) al tratamiento con cisplatino durante 72 h en comparación a su versión sensible A2780 ($IC_{50}=5,21 \mu M$) y a OVCAR3 ($IC_{50}=4,66 \mu M$). En cuanto a estas últimas líneas, a pesar de que sus IC_{50} sean muy similares, presentan una tendencia diferente a distintas concentraciones de cisplatino. Mientras que en las células A2780 se observa que la proliferación celular se reduce de forma gradual, habiendo una reducción de la viabilidad celular incluso a concentraciones bajas de cisplatino ($0,5 \mu M$) (Figura 7), en las OVCAR3 se puede determinar una mayor resistencia al cisplatino en concentraciones inferiores a $5 \mu M$, punto a partir del cual la viabilidad celular disminuye de forma drástica (Figura 7).

En cuanto al análisis de la incorporación de platino al ADN, éste solo pudo llevarse a cabo con las líneas celulares A2780 y OVCAR3 debido a problemas técnicos con las células A2780 cis. Asimismo, mientras que los ensayos de viabilidad celular se realizaron a 72 horas para permitir suficiente tiempo para la internalización del fármaco, la unión al ADN y la ejecución del daño y muerte celular, el análisis de incorporación de platino se realizó a 3 horas, ya que ensayos realizados previamente en el laboratorio habían determinado que este tiempo es suficiente para poder observar dicha incorporación sin que las células lleguen a entrar en apoptosis. Los resultados obtenidos mediante FIA-ICP-MS permitieron verificar la incorporación de platino al ADN de las células A2780 y OVCAR3, con diferencias evidentes entre ambas líneas. En primer lugar, se observó señal inespecífica para platino en ambas condiciones controles, si bien fueron mayores en la línea A2780. Este fenómeno se ha observado previamente en el grupo de investigación con otras muestras, y si bien no se ha determinado aún la causa real, es muy probable que dicha detección de platino se deba a contaminaciones cruzadas a lo largo del proceso de preparación y adquisición de la muestra. De todas formas, los niveles más elevados de platino en las condiciones tratadas con fármaco permiten concluir que la concentración detectada de platino

en la línea A2780 fue de 77,01 fg Pt/ μ g ADN mientras que en las células OVCAR3 fue de 35,13 fg Pt/ μ g ADN. Estos datos indicarían que la línea OVCAR3 es 2 veces más resistente al tratamiento con cisplatino que las A2780, impidiendo la formación de aductos del Pt con el ADN al presentar, seguramente, mecanismos más eficaces para la reparación del daño al ADN o bien para reducir la entrada de la droga en el núcleo celular. Futuros estudios de las proteínas y rutas de señalización alteradas serían necesarios para determinar estos mecanismos.

Si bien parece que el cisplatino actúa sobre múltiples objetivos celulares que representan diversas vías de transducción de señales que conducen a muerte celular, el ADN sigue siendo el objetivo principal de muerte celular. Es bien sabido que el cisplatino forma aductos intracadena en el ADN y activa la vía de reparación del mismo. Por lo tanto, la reducción en la formación de aductos o bien una mayor capacidad de reparación de los mismos se han propuesto como mecanismos importantes de resistencia a la acción mediada por platino de muerte celular. Pero otro mecanismo importante de resistencia a los derivados del platino como agentes antitumorales es el sistema de transporte. De hecho, un sistema defectuoso de absorción del fármaco que resulta en una alteración del contenido intracelular del mismo se ha observado desde hace mucho tiempo en células resistentes al cisplatino tanto in vivo como in vitro. Los primeros estudios sugirieron que el cisplatino entra a las células por difusión pasiva que no requiere transportador activo. Sin embargo, recientemente los estudios han demostrado que los transportadores que controlan la homeostasis del cobre intracelular también están implicados en la regulación de la entrada y salida de agentes antitumorales basados en Pt. Estudios previos desarrollados en el grupo de investigación donde se ha realizado este TFG han mostrado que la incorporación intracelular de cisplatino en la línea A2780 es muy superior a la OVCAR3 o a la A549. Por tanto, esto unido con una mayor capacidad de enlace al ADN hace que esta línea sea la más sensible de las evaluadas para el tratamiento propuesto.

Simultáneamente a este experimento, se trató de inducir mayor resistencia al cisplatino a la línea OVCAR3. Sin embargo, se observó que estas células no sobrevivían al añadir cisplatino, lo que indicaba que habían alcanzado su máximo nivel de resistencia a la droga.

Finalmente, se llevó a cabo el estudio de incorporación de cisplatino en la línea de cáncer de pulmón A549 Según estudios anteriores, y tal y como ya se ha discutido en este trabajo fin de grado, el cisplatino actúa uniéndose al ADN formando aductos que conducen a la apoptosis celular. Sin embargo, en muchos casos se desconoce si el cisplatino está presente en otras fracciones subcelulares del núcleo como pueden ser las proteínas y el ARN. Para tener una caracterización más completa de su modo de interacción, se aislaron y analizaron las diferentes

fracciones y su platinación. Los resultados obtenidos mediante ICP-MS determinaron que mientras que el cisplatino se une al ADN nucleolar mayoritariamente, la unión de cisplatino al ARN se encuentra a niveles de control, que como se ha mencionado anteriormente, está anormalmente elevado. Finalmente, en las muestras proteicas se observó cierto nivel de platinación, aunque con una elevada variabilidad entre réplicas que debería ser estudiado en mayor detalle en otros modelos celulares. Experimentos adicionales serían necesarios para poder ahondar en esta cuestión científica.

5. Conclusiones

En este trabajo se logró analizar la incorporación de platino a células de cáncer de ovario y pulmón, utilizando herramientas de ICP-MS.

Se evaluó con éxito la capacidad de incorporación de cisplatino en el ADN de las líneas celulares OVCAR3 y A2780, demostrando que OVCAR3 es más resistente, lo cual sugiere que presenta mecanismos de acción más eficaces. A pesar de que no se pudo analizar la incorporación de platino en la línea A2780 cis, los ensayos de viabilidad realizados indican que es la línea más resistente, entre las tres utilizadas.

Por otra parte, en la línea A459, los análisis de incorporación de cisplatino revelaron que la diana terapéutica de cisplatino es el ADN, encontrando niveles similares a los del control en ARN y ligeramente superiores en el caso de proteínas. Sería necesario realizar nuevos estudios para determinar el mecanismo de acción de este nuevo compuesto.

Estos resultados obtenidos resaltan la necesidad de investigar nuevos fármacos y combinaciones terapéuticas para mejorar la eficacia y reducir la toxicidad en el tratamiento de estos cánceres.

6. Bibliografía

- [1] Organización mundial de la Salud. Accedido: 3 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- [2] «Cancer Today», Internacional Agency for Research on Cancer. Accedido: 1 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/en>
- [3] M. B. Schabath y M. L. Cote, «Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer», *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 28, n.º 10, pp. 1563-1579, oct. 2019, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-19-0221.
- [4] American Cancer Society. [En línea]. Disponible en: <https://www.cancer.org>
- [5] Asociación Española Contra el Cancer (AECC). [En línea]. Disponible en: <https://www.contraelcancer.es/es>
- [6] Y. Zhang *et al.*, «Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: age, period and birth cohort analysis», *BMC Cancer*, vol. 19, n.º 1, p. 984, dic. 2019, doi: 10.1186/s12885-019-6139-6.
- [7] Ovarian Cancer Research Alliance. Accedido: 1 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://ocrahope.org/get-the-facts/>
- [8] P. Gaona-Luviano, L. A. Medina-Gaona, y K. Magaña-Pérez, «Epidemiology of ovarian cancer», *Chin. Clin. Oncol.*, vol. 9, n.º 4, pp. 47-47, ago. 2020, doi: 10.21037/cco-20-34.
- [9] D. G. Kwolek, S. Gerstberger, S. Tait, y J. M. Qiu, «Ovarian, Uterine, and Vulvovaginal Cancers», *Med. Clin. North Am.*, vol. 107, n.º 2, pp. 329-355, mar. 2023, doi: 10.1016/j.mcna.2022.10.016.
- [10] C. López-Portugués, M. Montes-Bayón, y P. Díez, «Biomarkers in Ovarian Cancer: Towards Personalized Medicine», *Proteomes*, vol. 12, n.º 1, p. 8, mar. 2024, doi: 10.3390/proteomes12010008.
- [11] H. Lemjabbar-Alaoui, O. U. Hassan, Y.-W. Yang, y P. Buchanan, «Lung cancer: Biology and treatment options», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1856, n.º 2, pp. 189-210, dic. 2015, doi: 10.1016/j.bbcan.2015.08.002.
- [12] «Cisplatin», Chemical book datase. [En línea]. Disponible en:

https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9236183.htm

- [13] L. Galluzzi *et al.*, «Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future», *Cell Death Dis.*, vol. 5, n.º 5, pp. e1257-e1257, may 2014, doi: 10.1038/cddis.2013.428.
- [14] A. Zoń y I. Bednarek, «Cisplatin in Ovarian Cancer Treatment—Known Limitations in Therapy Force New Solutions», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, n.º 8, p. 7585, abr. 2023, doi: 10.3390/ijms24087585.
- [15] P. B. Tchounwou, S. Dasari, F. K. Noubissi, P. Ray, y S. Kumar, «Advances in Our Understanding of the Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Therapy», *J. Exp. Pharmacol.*, vol. Volume 13, pp. 303-328, mar. 2021, doi: 10.2147/JEP.S267383.
- [16] Y. Lugones, P. Loren, y L. A. Salazar, «Cisplatin Resistance: Genetic and Epigenetic Factors Involved», *Biomolecules*, vol. 12, n.º 10, p. 1365, sep. 2022, doi: 10.3390/biom12101365.
- [17] L. Qi, Q. Luo, Y. Zhang, F. Jia, Y. Zhao, y F. Wang, «Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin», *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 32, n.º 8, pp. 1469-1486, ago. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00204.
- [18] M. K. Parmar *et al.*, «Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial», *The Lancet*, vol. 361, n.º 9375, pp. 2099-2106, jun. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13718-X.
- [19] N. Katsumata, «Docetaxel: an alternative taxane in ovarian cancer», *Br. J. Cancer*, vol. 89, n.º S3, pp. S9-S15, dic. 2003, doi: 10.1038/sj.bjc.6601495.
- [20] Y. Ichinose *et al.*, «UFT plus cisplatin combination chemotherapy in the treatment of patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma: A multiinstitutional Phase II trial», *Cancer*, vol. 88, n.º 2, pp. 318-323, ene. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000115)88:2<318::AID-CNCR11>3.0.CO;2-6.
- [21] A. Kopacz-Bednarska y T. Król, «Selected platinum complexes in standard and modern anti-cancer therapies», *Nowotw. J. Oncol.*, vol. 72, n.º 2, pp. 96-105, abr. 2022, doi: 10.5603/NJO.a2022.0011.
- [22] G. Los *et al.*, «Cellular pharmacokinetics of carboplatin and cisplatin in relation to their cytotoxic action», *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, n.º 2, pp. 357-363, jul. 1991, doi: 10.1016/0006-

2952(91)90723-I.

- [23] S. Bogliolo *et al.*, «Oxaliplatin for the treatment of ovarian cancer», *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 24, n.º 9, pp. 1275-1286, sep. 2015, doi: 10.1517/13543784.2015.1062874.
- [24] R. Soler-Agesta *et al.*, «PT-112 Induces Mitochondrial Stress and Immunogenic Cell Death, Targeting Tumor Cells with Mitochondrial Deficiencies», *Cancers*, vol. 14, n.º 16, p. 3851, ago. 2022, doi: 10.3390/cancers14163851.
- [25] D. D. Karp *et al.*, «Phase I study of PT-112, a novel pyrophosphate-platinum immunogenic cell death inducer, in advanced solid tumours», *eClinicalMedicine*, vol. 49, p. 101430, jul. 2022, doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101430.
- [26] F. Calderón-Celis y J. R. Encinar, «A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: Update and future perspective», *J. Proteomics*, vol. 198, pp. 11-17, abr. 2019, doi: 10.1016/j.jprot.2018.11.010.
- [27] D. Clases y R. Gonzalez De Vega, «Facets of ICP-MS and their potential in the medical sciences—Part 1: fundamentals, stand-alone and hyphenated techniques», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 414, n.º 25, pp. 7337-7361, oct. 2022, doi: 10.1007/s00216-022-04259-1.
- [28] P. MacLaurin, K. N. Andrew, y P. J. Worsfold, «Flow injection analysis», en *Process Analytical Chemistry*, F. McLennan y B. R. Kowalski, Eds., Dordrecht: Springer Netherlands, 1995, pp. 159-182. doi: 10.1007/978-94-011-0591-0_5.
- [29] B. Bai y M. Laiho, «Sequential Recovery of Macromolecular Components of the Nucleolus», en *The Nucleus*, vol. 1228, R. Hancock, Ed., en *Methods in Molecular Biology*, vol. 1228. , New York, NY: Springer New York, 2015, pp. 43-51. doi: 10.1007/978-1-4939-1680-1_5.
- [30] P. Desjardins y D. Conklin, «NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids», *J. Vis. Exp.*, n.º 1, p. 2565, nov. 2010, doi: 10.3791/2565.
- [31] A. Bocian *et al.*, «Comparison of Methods for Measuring Protein Concentration in Venom Samples», *Animals*, vol. 10, n.º 3, p. 448, mar. 2020, doi: 10.3390/ani10030448.