

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas cromatográficas y espectrometría de masas para estudios de metalómica de fármacos antitumorales de Pt en muestras biológicas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego Esteban Fernández

DIRECTORAS

**María Antonia Palacios Corvillo
María Milagros Gómez Gómez**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMETRÍA
DE MASAS PARA ESTUDIOS DE METALÓMICA DE
FÁRMACOS ANTITUMORALES DE Pt EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS**

Directoras:

Dra. María Antonia Palacios Corvillo

Dra. María Milagros Gómez Gómez

Diego Esteban Fernández

Madrid, 2008



Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Dña. M^a ANTONIA PALACIOS CORVILLO, Catedrática y Directora del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid

Dña. M^a MILAGROS GÓMEZ GÓMEZ, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid

Hacen constar que:

El presente trabajo titulado “DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS BASADOS EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA ESTUDIOS DE METALÓMICA DE FÁRMACOS ANTITUMORALES DE Pt EN MUESTRAS BIOLÓGICAS”, ha sido realizado en este Departamento y bajo nuestra dirección, por el Ldo. Diego Esteban Fernández, constituyendo así la Tesis Doctoral de su autor.

Madrid a 10 de Abril de 2008

Fdo: M^a Antonia Palacios Corvillo

Fdo: M^a Milagros Gómez Gómez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, la Dra. Milagros Gómez Gómez y la Dra. María Antonia Palacios, sin quienes este trabajo no habría podido llegar a buen término. A ellas les debo su experimentado consejo en el enfoque de las investigaciones a la vez que su libertad para dejarme desarrollar apuestas personales. De ellas recordaré su permanente dedicación y disponibilidad, además de haberme hecho sentir valorado.

Sin lugar a dudas esta sección de agradecimientos tiene un espacio reservado para la Dra. Carmen Cámara Rica. Gracias a ella he tenido la oportunidad de hacer realidad lo que había perseguido largos años, desarrollar una tesis doctoral. La apuesta que ella hizo por mí siempre me quedará como deuda. La cercanía, cariño y apoyo que me ha mostrado durante estos años han contribuido decisivamente a mi plena incorporación al grupo que entorno a ella creció.

También quiero expresar mi gratitud al Departamento de Química Analítica, a la Universidad Complutense de Madrid y a las instituciones que aportaron los medios económicos para financiar este trabajo.

No puedo dejar de mencionar a quienes me introdujeron en el mundo de la investigación y me enseñaron lo bonito que puede ser este trabajo. A los doctores Jesús Sanz Perucha e Isabel Martínez Castro debo su excepcional ejemplo profesional, y su aún más valioso ejemplo personal. En su laboratorio me sentí como en casa y siempre guardaré, ante todo, fuertes lazos de amistad.

También me gustaría citar aquí al Dr. Alfredo Sanz-Medel, a la Dra. Elisa González Blanco y a la Dra. María Montes Bayón, quienes me acogieron con los brazos abiertos en su grupo y me mostraron desde el primer día una gran amistad y cercanía. A ellos y a su gente les debo muchos conocimientos en Química Analítica y la lección de cómo debe ser el funcionamiento de un grupo de investigación.

A caballo entre jefe, compañero y amigo, quiero agradecer al Dr. Benito Cañas Montalvo sus consejos científicos, su disposición para atender mis consultas y su amistad en el día a día del laboratorio. Gracias Benito por tu apoyo y tu interés por la marcha de mi trabajo y de mi vida.

Cualquiera que haya trabajado investigando en un laboratorio sabe de la importancia de los compañeros. En ellos te apoyas, con ellos compartes éxitos y días

grises, y sin ellos es imposible desarrollar tu trabajo. Citar nombres tiene el problema de que siempre te dejas alguno, máxime cuando has pasado por tantos laboratorios como yo y has trabajado con tanta gente. A Cristina, M^a Luz, Ester, Jose, Luisa, Pi, Maites, Mares, Ángel, Nines, Estrella, Mer, Rocío, Rian, Jon, Christian, Teresa, Loli, Nuria, Héctor, Estefanía, Susana, Zoyné, Magie, Yolanda, Ana María, Conchita, Roberto, Ana, Carmen, Jandro, Hector, Azucena, Jorge, Mariella, Óscar, Costa, Armando,.... gracias por los momentos compartidos.

A lo largo de mi vida me han acompañado personas por las que siempre me he sentido querido y de las cuales he recibido un apoyo incondicional. Su ejemplo y consejo me han dado la visión y la libertad necesarias para elegir mi vocación profesional y personal. Por supuesto estas personas han sido mis padres, pero no sólo ellos. He tenido la gran suerte de vivir y aprender de mis abuelos y de mi hermana, que si bien hoy no están cerca, siguen muy presentes en mi vida.

Por último, me gustaría dar las gracias de manera muy especial a Isabel y Pablo, mi familia y sin lugar a dudas lo más importante en mi vida. A ellos agradezco el cariño y la generosidad mostrados a lo largo, no sólo de esta tesis doctoral, sino de todo el tiempo vivido juntos. Su entrega sin pedir nada a cambio es la más perfecta definición de amor.

A los que más quiero, Isabel, Pablo, mis padres,
mis abuelos, mi hermana y mis sobrinos

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada
puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein

Índice



	Pág.
Abreviaturas.....	1
A. Introducción.....	5
<i>A.1. Química del Platino.....</i>	<i>7</i>
<i>A.2. Fármacos antitumorales basados en complejos de Pt.....</i>	<i>8</i>
A.2.1. Cisplatino.....	8
A.2.2. Otros complejos de Pt con propiedades antitumorales.....	11
A.2.2.1. Reglas estructura-actividad.....	11
A.2.2.2. Fármacos de segunda y tercera generación.....	12
A.2.2.3. Nuevas generaciones de fármacos.....	14
A.2.3. Problemática sobre los fármacos antitumorales basados en complejos de Pt.....	14
<i>A.3. Antecedentes bibliográficos del análisis bioinorgánico de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.....</i>	<i>17</i>
A.3.1. Evolución del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en medio acuoso.....	19
A.3.2. Interacción de los fármacos de Pt con las biomoléculas de la sangre.....	25
A.3.2.1. Interacción de los fármacos de Pt con la albúmina.....	28
A.3.2.2. Interacción de los fármacos de Pt con la transferrina.....	31
A.3.2.3. Interacción de los fármacos de Pt con la hemoglobina.....	33
A.3.3. Interacción de los fármacos de Pt con la orina.....	34
A.3.4. Distribución y acumulación de los fármacos de Pt en tejidos.....	39
A.3.5. Interacción de los fármacos de Pt en el interior celular.....	41
A.3.5.1. Interacción de los fármacos de Pt con MT.....	46
A.3.5.2. Interacción de los fármacos de Pt con GSH.....	49
A.3.5.3. Interacción de los fármacos de Pt con otras biomoléculas celulares...	52
A.3.5.4. Interacción de los fármacos de Pt en muestras reales.....	53
<i>A.4. Metodología analítica para el análisis bioinorgánico.....</i>	<i>55</i>
A.4.1. Preparación de muestra.....	57
A.4.2. Técnicas instrumentales híbridas para el análisis de especiación bioinorgánico.....	60

A.4.2.1. Técnicas de separación.....	61
A.4.2.2. Técnicas de detección.....	70
B. Objetivos.....	77
C. Parte experimental.....	81
<i>C.1. Capítulo I: Caracterización del problema.....</i>	<i>83</i>
C.1.1. Trabajo 1: Accumulation, fractionation and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration (<i>J. Anal. Toxicol.</i> , 32(2) (2008) 140-146).....	86
<i>C.2. Capítulo II: Desarrollo de metodologías analíticas para la especiación de Pt en muestras biológicas.....</i>	<i>99</i>
C.2.1. Trabajo 2: Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues (<i>Talanta</i> , 72(2) (2007) 768-773).....	103
C.2.2. Trabajo 3: SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules (<i>J. Anal. At. Spectrom.</i> , 22 (2007) 1113-1121).....	113
C.2.3. Trabajo 4: Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins (<i>J. Anal. At. Spectrom.</i> , 23 (2008) 378-384).....	127
<i>C.3. Capítulo III: Otros estudios de especiación bioinorgánica de Pt en curso.....</i>	<i>139</i>
C.3.1. Desarrollo de metodologías analíticas mediante electroforesis en gel monodimensional y bidimensional para la separación de bio-especies de Pt	141
C.3.1.1. Introducción.....	141
C.3.1.2. Materiales y métodos.....	142
C.3.1.3. Resultados y discusión.....	145
C.3.2. Desarrollo de metodologías analíticas para la secuenciación de péptidos con Pt mediante ESI-LIT.....	154
C.3.2.1. Introducción.....	154
C.3.2.2. Materiales y métodos.....	154
C.3.2.3. Resultados y discusión.....	155

<i>C.4. Capítulo IV: Aplicaciones a los campos de la medicina y la biología molecular</i>	159
C.4.1. Trabajo 5: Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration (<i>Acta Oto-Laryngologica</i> (2007)).....	161
C.4.2. Trabajo 6: A new animal model of cisplatin ototoxicity: quantitative and functional results (<i>Hearing Research</i> (2008)).....	171
C.4.3. Trabajo 7: Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation (<i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 1743 (2005) 269-279).....	181
D. Discusión integradora	197
<i>D.1. Aportaciones fundamentales al desarrollo de metodología analítica</i>	200
D.1.1. Metodología analítica para la determinación del contenido de Pt en tejidos y en fracciones celulares por ICP-MS.....	200
D.1.2. Técnicas de fraccionamiento celular y citosólico.....	200
D.1.3. Acoplamiento SEC-ICP-MS para la separación de bio-especies con Pt formadas en experimentos <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> . Primera dimensión cromatográfica (1D).....	201
D.1.4. Preconcentración de las bio-especies de Pt contenidas en las fracciones SEC de 1D para su separación mediante AE-FPLC-ICP-MS. Segunda dimensión cromatográfica (2D).....	203
D.1.5. Caracterización estructural de las especies intactas fármaco:biomolécula en medios de incubación fisiológicos, suero sanguíneo y citosoles celulares, mediante técnicas estructurales de espectrometría de masas.....	205
D.1.6. Caracterización estructural de las especies fármaco:biomolécula a partir de sus digeridos trípticos, mediante técnicas estructurales de espectrometría de masas.....	208
D.1.7. Metodología de separación electroforética como complemento de las separaciones cromatográficas puestas a punto.....	210

<i>D.2. Aportaciones fundamentales a la comprensión de los mecanismos de actuación de los fármacos antitumorales de Pt.....</i>	212
D.2.1. Contenidos de Pt en tejidos y fracciones celulares de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.....	212
D.2.2. Fortaleza de la interacción fármaco:biomolécula.....	215
D.2.3. Interacción fármaco:biomolécula en tejidos de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.....	216
D.2.4. Derivados reactivos del cisplatino en distintos medios fisiológicos.....	217
D.2.5. Interacción del cisplatino con las biomoléculas citosólicas GSH y MT.....	218
D.2.6. Interacción del cisplatino con las proteínas del suero sanguíneo HSA y Tf.	221
<i>D.3. Propuestas para futuras investigaciones.....</i>	225
D.3.1. Metodologías para la separación y purificación de bio-especies con Pt.....	225
D.3.2. Metodologías para la caracterización estructural de bio-especies con Pt...	227
E. Conclusiones.....	229
F. Anexo I.....	235
G. Bibliografía.....	243

Abreviaturas

A	Adenine (adenina)
AAS	Atomic absorption spectroscopy (espectroscopía de absorción atómica)
ABR	Auditory brainstem response (respuesta auditiva del tronco del encéfalo)
AC	Affinity chromatography (cromatografía de afinidad)
AcMAS	Acetyl Met-Ala-Ser
AEC	Anion-exchange chromatography (cromatografía de intercambio aniónico)
AES	Atomic emission spectroscopy (espectroscopía de emisión atómica)
AV	Adsorptive voltammetry (voltamperometría de adsorción / redisolución)
BeSOD	Superoxodismutasa procedente de eritrocito bovino
BME	β -mercaptoetanol
BSA	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
capLC	Capillary liquid chromatography (cromatográfica de líquidos capilar)
CD	Circular dichroism (dicronismo circular)
CDDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II) o cisplatino
CE	Capillary electrophoresis (electroforesis capilar)
CEC	Capillary electrochromatography (electrocromatografía capilar)
CGE	Capillary gel electrophoresis (electroforesis capilar en geles)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
CHIP	<i>cis,trans</i> -diclorodihidroxis(isopropilamina)platino(IV) o iproplatino
CID	Collision induced dissociation (disociación inducida por colisión)
CZE	Capillary zone electrophoresis (electroforesis capilar de zona)
DACH	1,2-diaminociclohexano
DDTC	Dietilditiocarbamato
DF-ICP-MS	Double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS con analizador de masas de doble enfoque)
DTT	Ditiotreitol

ERKs	Extracellular signal-regulated protein kinases (proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares)
ESI	Electrospray ionisation (ionización por electrospray)
ESI-FT-ICR	Electrospray ionisation Fourier transform ion cyclotron resonance (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizador de resonancia ciclónica por transformada de Fourier)
ESI-IT	Electrospray ionisation ion trap (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizador de trampa de iones)
ESI-IT-FT-ICR	Electrospray ionisation ion trap Fourier transform ion cyclotron resonance (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizadores de trampa de iones y resonancia ciclónica por transformada de Fourier)
ESI-LIT	Electrospray ionisation linear ion trap (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizador de trampa de iones lineal)
ESI-Q-IT	Electrospray ionisation quadrupole linear ion trap (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizadores de cuadrupolo y de trampa de iones)
ESI-Q-TOF	Electrospray ionisation quadrupole time of flight (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizadores de cuadrupolo y tiempo de vuelo)
ESI-TQ	Electrospray ionisation triple quadrupole (ionización por electrospray acoplada a espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo)
ETAAS	Electrothermal atomic absorption spectroscopy (espectroscopía de absorción atómica electrotérmica)
ETD	Electron transfer dissociation (disociación por transferencia electrónica)
FAAS	Flame atomic absorption spectroscopy (espectroscopía de absorción atómica de llama)
FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectrometry (espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos)
FAIMS	High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (espectrometría asimétrica por movilidad de iones)

FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance (resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier)
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier)
G	Guanine (guanina)
GC	Gas chromatography (cromatografía de gases)
GFAAS	Graphite furnace atomic absorption spectrometry (espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito)
GSH	Glutación
Hb	Hemoglobina
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía de líquidos de alta resolución)
HSA	Human serum albumin (albúmina de suero humano)
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente)
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente)
IEC	Ion-exchange chromatography (cromatografía de intercambio iónico)
IEF	Isoelectric focusing (isoelectroenfoque)
IgG	Inmunoglobulina G
IPG	Immobilized pH gradient (gradiente de pH inmovilizados)
IT	Ion trap (trampa de iones)
ITP	Isotachopheresis (isotacoforesis)
LA	Laser ablation (ablación láser)
LA-ICP-MS	Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (ablación láser acoplada a espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente)
LC	Liquid chromatography (cromatografía de líquidos)
LIT	Linear ion trap (trampa de iones lineal)
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation (desorción/ionización láser asistida por matriz)
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight (desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo)

MALDI-TOF-TOF	Matriz-assisted laser desorption/ionisation double time of flight (desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas con doble analizador de tiempo de vuelo)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (proteínas quinasas activadas por mitógenos)
MAS	Met-Ala-Ser
Mb	Mioglobine (mioglobina)
MECC	Micellar electrokinetic capillary chromatography (cromatografía electrocinética capilar)
Mesna	sodium 2-mercaptoethanesulfonate (2-mercaptoetanosulfonato sódico)
MRFA	Met-Arg-Phe-Ala
MT	Metalotioneína
NAA	Neutron activation analysis (análisis por activación neutrónica)
NMR	Nuclear magnetic resonance (resonancia magnética nuclear)
PKC	Protein kinase C (proteína quinasa C)
PUF	Plasma ultrafiltrate (plasma sanguíneo ultrafiltrado)
Q	Quadrupole (cuadrupolo)
Q-ICP-MS	Quadrupolar inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS con analizador de masas de cuadrupolo)
RPC	Reverse phase chromatography (cromatografía de fase inversa)
SDS	sodium dodecylsulfate (dodecilsulfato sódico)
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SEC	Size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño)
SFC	Supercritical flow chromatography (cromatografía de fluidos supercríticos)
Tf	Transferrina
TOF-ICP-MS	Time of flight inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS con analizador de masas de tiempo de vuelo)
TQ	Triple quadrupole (triple cuadrupolo)
WR-1065	2-[(aminopropyl)amino]ethanethiol

A. Introducción



A.1. Química del Platino

El Platino (Pt) es un elemento químico de número atómico 78 y que pertenece al grupo 10 de la tabla periódica. Su configuración electrónica es $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^9 6s^1$. Se trata de un metal de transición blanco grisáceo, precioso, pesado, maleable y dúctil. Es relativamente resistente al ataque químico, presenta buenas propiedades físicas a temperaturas altas y buenas propiedades eléctricas. Por estos motivos se emplea en contactos eléctricos, electrodos, equipamiento de laboratorio, empastes, catalizadores de automóviles y joyería.

Fue descubierto en el siglo XVI por el español Antonio de Ulloa en unas minas de oro de Colombia. Es un metal escaso ya que su concentración en la corteza terrestre no supera los 15 ng Kg^{-1} y aparece asociado con Ru, Os, Rh, Ir y Pd, formando la llamada mena de platino. Alrededor de tres cuartas partes de la producción mundial de Pt procede de Sudáfrica, aunque Rusia, Canadá, Zimbabue y Estados Unidos también son productores destacados. En España existen pequeños yacimientos en la Serranía de Ronda (Málaga) y en Cabo Ortegal (La Coruña).

Aun siendo un metal noble se disuelve en agua regia, es atacado lentamente por el ácido clorhídrico en presencia de aire y puede reaccionar, según las condiciones, con cianuros, azufre o halógenos como el Cl y el F. Puede formar compuestos en estados de oxidación 0, II, IV, V y VI, éstos dos últimos asociados a oxo y fluoroderivados. Los dos estados de oxidación más importantes en disolución acuosa son II y IV, y por lo tanto los más comunes en medios biológicos. La mayoría de la química del metal deriva de su química de coordinación. En estado de oxidación II la mayoría de los complejos son plano-cuadrados como corresponde a un sistema d^8 . Teniendo en cuenta que el Pt(II) se considera como un ácido de Lewis "blando", los complejos que forme serán principalmente con bases blandas (S, Se, P,...) o con ligandos N-dadores. Uno de los complejos aniónicos más importantes es el $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ que en agua se hidroliza de forma rápida para dar $[\text{PtCl}_3(\text{H}_2\text{O})]^-$ y $[\text{PtCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$, complejos mono y diacu respectivamente. En estado de oxidación IV se forman complejos octaédricos.

A.2. Fármacos antitumorales basados en complejos de Pt

El estudio y los conocimientos adquiridos acerca de los iones metálicos y de su coordinación con diferentes ligandos, tienen hoy en día distintas aplicaciones en medicina. Por ejemplo, la utilización de ligandos capaces de coordinar selectivamente a un determinado ion metálico puede ayudar a reducir o incluso eliminar dicho ion de un organismo. Ésta práctica se denomina quelatoterapia y se emplea para eliminar ciertos metales tóxicos o para subsanar desequilibrios en las concentraciones fisiológicas de iones metálicos esenciales.

Otra aplicación de compuestos de coordinación en medicina es su uso como fármacos eficaces contra diversas enfermedades. De esta manera, los complejos de Au(I) se usan para el tratamiento de la artritis reumática, compuestos de Cu(II) como antiinflamatorios, complejos de Mn como mimetizadores de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, compuestos de Bi para el tratamiento de úlceras o complejos de V y Ti (metalocenos) por su actividad citotóxica. Sin embargo, las importantes propiedades anticancerígenas que presentan ciertos complejos de Pt hacen de ellos los máximos exponentes de estos complejos metálicos terapéuticos.

A.2.1. Cisplatino

Desde el año 1845 se tiene constancia de la formación de complejos de Pt(II) en presencia de amoníaco. La reacción del ion $[\text{PtCl}_4]^{2-}$ con NH_3 en disolución acuosa da lugar a diferentes complejos en función de las condiciones empleadas. Concretamente, en presencia de un exceso de NH_3 la especie predominante es el llamado cloruro de Peyrone o cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino(II), CDDP) (Figura 1).

No fue hasta la década de los sesenta cuando se descubrió de manera fortuita las propiedades de este complejo de Pt(II) para inhibir la replicación celular¹. El descubrimiento se fraguó en el transcurso de un experimento donde B. Rosenberg *et al.*² pretendían estudiar la influencia de los campos eléctricos sobre el desarrollo celular. Sometieron a una población de bacterias *Escherichia coli* a un campo eléctrico generado mediante dos electrodos de platino en un medio tamponado $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$. Los efectos que se observaron fueron sorprendentes. En primer término, la división de las bacterias cesó,

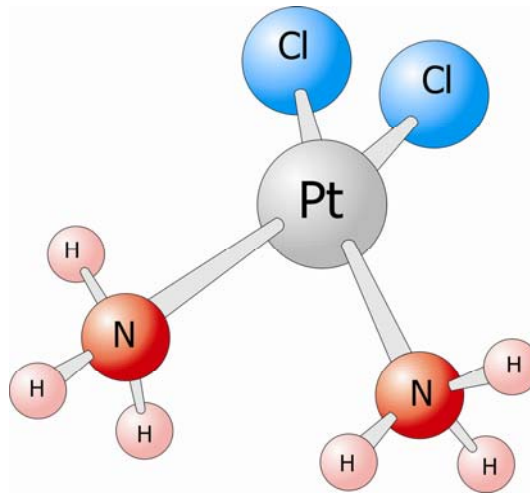


Figura 1. Cisplatino

indicando la posible pérdida de la capacidad para replicar su ADN. Sin embargo, también se observó cómo dichas bacterias crecían y se convertían en largos filamentos, lo cual hacía pensar que la síntesis del ARN y de las proteínas continuaba intacta. Posteriores experimentos y estudios concluyeron que el responsable de tales efectos era el complejo de Pt(II), cisplatino. No se tardó mucho en investigar el efecto de este compuesto sobre células tumorales y los resultados arrojaron grandes esperanzas sobre la potencialidad anticancerígena de dicho complejo³. En el año 1972 se iniciaron los primeros ensayos clínicos. No fue hasta el año 1978 cuando se aprobó el empleo clínico de este fármaco en EE.UU, y más tarde en Japón y en Europa, comercializado con el nombre de *Platinol*. El motivo de este largo periodo de pruebas fue los importantes efectos secundarios que presentaba el cisplatino, principalmente nefrotoxicidad y ototoxicidad, pero también toxicidad hematológica y neuropatologías. Tanto la respuesta del fármaco como sus efectos secundarios demostraron ser dependientes de la dosis, y estos últimos se han relacionado con su acumulación. La nefrotoxicidad ha sido el efecto secundario más estudiado ya que es el más limitante. Aunque su mecanismo molecular no está completamente establecido, se sabe que el cisplatino ocasiona daños estructurales en el riñón. Estas lesiones morfológicas se presentan junto con un incremento de la excreción urinaria de enzimas y electrolitos, y una disminución del filtrado glomerular sólo parcialmente reversible⁴. En cuanto a la ototoxicidad, ha sido mucho menos estudiada

pero hay evidencias de un deterioro de las células ciliadas internas⁵, así como de las células de soporte⁶ presentes en el órgano de Corti.

Se han desarrollado distintas estrategias para paliar estos efectos secundarios tales como el fraccionamiento de la dosis en días consecutivos o las infusiones prolongadas. También desde hace varias décadas se viene estudiando la aplicación de protocolos mucho más cómodos y funcionales para el paciente consistentes en la pre- y post-hidratación, además de diuresis inducida⁷. Infusiones de al menos dos litros de suero salino al 0,9% o suero hipertónico⁸ antes y después del tratamiento, así como manitol⁹ o furosemida¹⁰, junto con suplementos de potasio y magnesio, permiten administraciones de dosis de hasta 100 mg por metro cuadrado de superficie corporal en una hora.

Hoy en día, el cisplatino es considerado como el antineoplásico que más se ha utilizado y el que mayor número de vidas ha salvado. Sin embargo, su toxicidad sigue siendo su principal problema y lo que limita su administración. Por ello, numerosos grupos de investigación trabajan en la reducción de sus efectos tóxicos mediante la administración de los llamados agentes de rescate o protectores. Hasta la fecha ningún compuesto se administra rutinariamente como agente de rescate por falta de ensayos o por toxicidades asociadas. El más prometedor de estos compuestos es la amifostina^{11,12}, pero también presenta importantes efectos secundarios como emesis o hipotensión¹³. Otros agentes de rescate empleados en ensayos preclínicos han sido antioxidantes como el monóxido de carbono¹⁴, derivados del selenio¹⁵, vitamina C¹⁶, aminoácidos¹⁷, etc.

Los tratamientos con cisplatino suelen estar englobados en terapias combinadas donde también se administran otros agentes antitumorales, como vinblastina, bleomicina o dorrubicina, que complementan la acción del cisplatino. Por otro lado, la efectividad del cisplatino no es igual para cualquier tipo de tumor. Así, los cánceres de testículos, ovarios, vejiga, cuello, cabeza, bazo y cérvix, responden de manera especialmente efectiva al tratamiento con este fármaco. Sin embargo, sus propiedades antitumorales ante ciertos tipos de cánceres de mama o pulmón son bastante escasas. Otro factor a discutir, y que más adelante se tratará con mayor profundidad, es la resistencia intrínseca o desarrollada con el tiempo de algunos tumores al tratamiento con cisplatino.

Desde el descubrimiento de las propiedades antitumorales del cisplatino y de sus efectos secundarios asociados, han surgido dos líneas de investigación paralelas que hoy en día aún siguen activas. En primer lugar, se comenzaron a investigar los mecanismos

de acción del fármaco con el objeto de reducir sus efectos secundarios y potenciar su actividad antitumoral. Por otro lado, fueron muchos los grupos de investigación que apostaron por el desarrollo de nuevos fármacos basados en complejos de Pt que mejoraran y/o complementaran las propiedades del cisplatino. De esta manera, nacieron los fármacos llamados de segunda y tercera generación, y cuyo relativo éxito se comentará a continuación.

A.2.2. Otros complejos de Pt con propiedades antitumorales

A.2.2.1. Reglas estructura-actividad

Las investigaciones encaminadas a desarrollar nuevos fármacos antineoplásicos basados en Pt, se apoyaron desde un principio en ciertas reglas estructura-actividad definidas por Cleare y Hoeschele en 1973¹⁸. Estas reglas estructura-actividad enumeraban una serie de requisitos de composición y de estereoquímica que se presumían deseables para que los nuevos fármacos desarrollados tuvieran buenas propiedades antitumorales a la vista de la experiencia obtenida con el cisplatino. Dichas reglas se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Los complejos pueden ser derivados de Pt(II) o Pt(IV) siempre que contengan dos ligandos aminados en posición *cis*- con al menos un enlace N-H. Estos ligandos, también llamados no salientes, se cree permanecen unidos al metal cuando éste interacciona con la molécula diana.
- Los demás ligandos, denominados salientes, deben ser aniones haluros u otro tipo de aniones que se unan al metal con enlaces de fuerza media. En principio, la fuerza de este enlace será inversamente proporcional a su actividad y a su toxicidad.
- Los complejos Pt(IV) suelen ser menos activos que los Pt(II), pero en general son más solubles en agua y posiblemente se activen tras reducirse a Pt(II) por algún tipo de reductor biológico como la cisteína.
- El complejo debe ser neutro para que cruce más eficazmente la membrana celular.

Estas reglas estructura-actividad delimitaron el camino a seguir en las investigaciones sobre la evaluación de nuevos compuestos de Pt como agentes antitumorales. El resultado fueron los fármacos llamados de segunda y tercera generación¹⁹. Sin embargo, tal y como se comprobó más adelante, el desarrollo de complejos de Pt que no cumplieran las reglas estructura-actividad no supuso la desaparición del efecto anticancerígeno. Hoy en día existen dudas acerca de lo acertado que fue el condicionamiento de las investigaciones aplicando estas reglas y de la utilidad de las mismas.

A.2.2.2. Fármacos de segunda y tercera generación

En la Figura 2 se formulan algunos de los fármacos más importantes de segunda y tercera generación. Sin duda, el mayor exponente de los compuestos de Pt de segunda generación es el *carboplatino* (diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II)), cuyo nombre comercial es *Paraplatino*. Junto con el cisplatino, son los dos únicos complejos de Pt cuya aceptación es generalizada. Presenta menor toxicidad que el cisplatino y al igual que él, debe ser administrado por vía intravenosa y es activo frente al mismo tipo de cánceres. Sin embargo, su actividad antitumoral también es muy inferior a la del cisplatino.

Entre los compuestos de tercera generación, cabe destacar el *oxaliplatino* (*trans*-L-1,2-diaminociclohexanooxalatoplatino(II)), complejo derivado del 1,2-diaminociclohexano (DACH). Ha sido aprobado en Francia y en otros países europeos para el tratamiento de cáncer colorrectal metastático, sobre el que presenta una excelente eficacia. Además de presentar menor toxicidad que el cisplatino, es activo frente a tumores resistentes a este fármaco.

A pesar de los sucesivos fracasos en la evaluación de complejos de Pt(IV), se ha seguido insistiendo en su estudio ya que la idea de disponer de compuestos activos acuosolubles capaces de resistir la acidez del estómago y por tanto, administrables por vía oral, supone un gran avance en cuanto a la calidad de vida de los pacientes. Un derivado DACH de Pt(IV) es el *tetraplatino* u *ormaplatino* pero su estudio ha sido

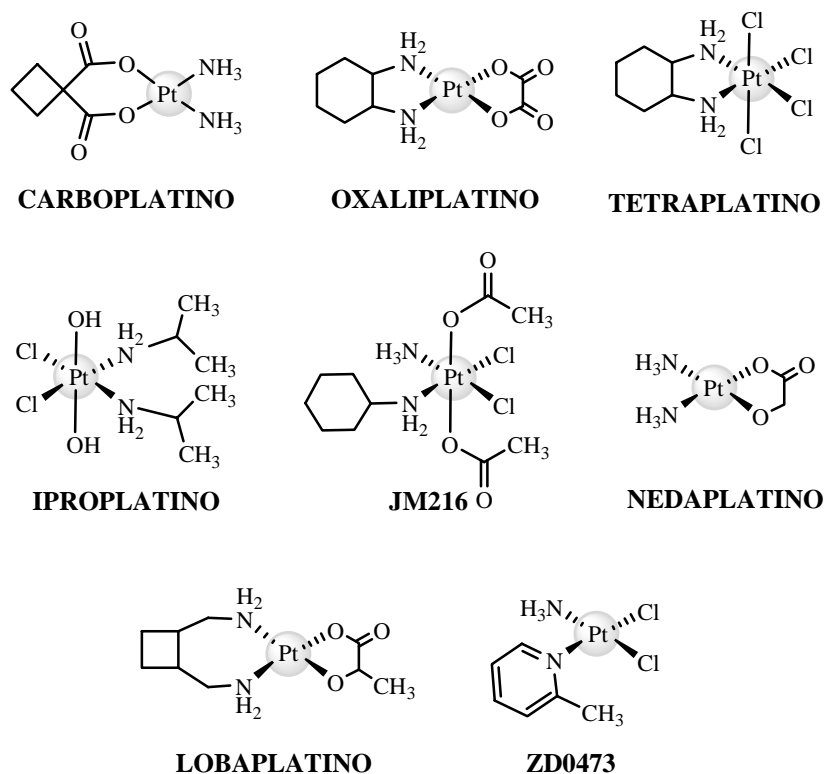


Figura 2. Fármacos de segunda y tercera generación

abandonado al comprobarse una severa neurotoxicidad en los ensayos clínicos. El *iproplatino* o CHIP (*cis,trans*-diclorodihidroxi-*bis*(isopropilamina)platino(IV)), ha presentado actividad frente al cáncer de mama pero su estudio también fue abandonado debido a que no mejoró significativamente los resultados del cisplatino. Sin embargo, los compuestos de Pt(IV) no han sido olvidados del todo gracias a un reciente compuesto llamado JM216, el cual se encuentra en fase clínica II y se puede administrar por vía oral.

Por último cabe destacar tres compuesto de Pt(II) que ofrecen prometedores comportamientos. El *nedaplatino* (*cis*-diaminoglicolato-*O,O'*-platino(II)), aprobado para uso clínico en Japón, el *lobaplatino* (*cis*-1,2-diaminociclobutanoglicolato-*O,O'*-platino(II)), autorizado en China y el *ZD0473* (*cis*-aminodicloro(2-metilpiridina)platino(II)), en fase I de ensayos clínicos.

A.2.2.3. Nuevas generaciones de fármacos

Tal y como se comentó anteriormente, las reglas estructura-actividad han tenido un dudoso beneficio sobre el avance en la evaluación de compuestos de Pt con actividad antitumoral. Muchos son los que cuestionan la eficacia de estas reglas y abogan por reconsiderarlas e incluso abandonarlas²⁰. Lo cierto es que hoy en día están naciendo nuevos y prometedores compuestos de Pt que no cumplen dichas reglas¹⁹.

A continuación, se citan algunos ejemplos de compuestos de Pt que no cumplen las reglas estructura-actividad y que sin embargo, ofrecen interesantes perspectivas dado que muestran cierto grado de actividad. Los derivados *cis*-[Pt(NH₃)₂(guanósina)]²⁺ y [PtCl₃(NH₃)]⁻, incumplen la regla de ser complejos neutros. Los derivados *trans*²¹ que se muestran en la Figura 3, incumplen la regla de tener ligandos aminados en posición *cis*. Ejemplos de este tipo de derivados son los complejos tipo *trans*-[PtCl₂L₂], siendo “L” un tiazol, imidazol, piridina, isoquinolina o iminoéter, o el complejo de Pt(IV) JM335 (*trans,trans,trans*-amino(ciclohexilamino)diclorodihidroxoplatino(IV)), éste último con mayor actividad que el cisplatino. Por último, cabe mencionar una nueva generación de compuestos *trans*-polinucleares cuyo máximo exponente es el complejo BBR3464 que está en fase clínica I.

A.2.3. Problemática sobre los fármacos antitumorales basados en complejos de Pt

Desde que el cisplatino entra en el torrente sanguíneo tras su administración intravenosa, hasta que penetra en la célula y causa el efecto citotóxico, el fármaco interacciona con multitud de biomoléculas. Estas interacciones tienen que ver con fenómenos de transporte, de traspaso de la membrana celular, fenómenos de resistencia inducida e incluso con disfuncionalidades en ciertas biomoléculas que conducen a toxicidades. Durante las primeras décadas tras el descubrimiento del cisplatino como fármaco antitumoral se invirtieron grandes esfuerzos en la comprensión de su mecanismo

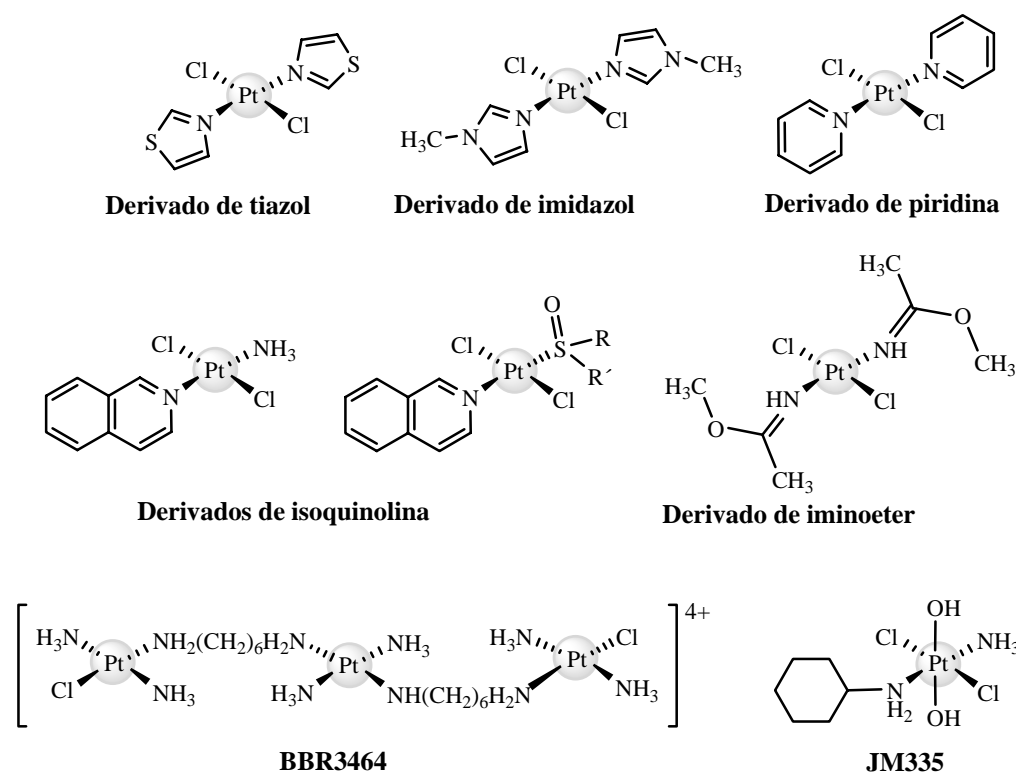


Figura 3. Isómeros trans de complejos de Pt con actividad anticancerígena

citotóxico. No se tardó mucho en asociar sus propiedades antitumorales con su interacción con el ADN. Por ello, multitud de trabajos se desarrollaron con el objetivo de caracterizar la acción citotóxica en el ADN, y hoy en día probablemente sea la parte más conocida de su acción. Basados en estudios de este tipo, se formularon las reglas estructura-actividad que debían cumplir los potenciales fármacos de Pt para interaccionar adecuadamente con el ADN. Como ya se ha mencionado, el éxito de estas reglas fue muy relativo, y de hecho hoy en día los únicos complejos de Pt que tienen aprobación mundial para su uso como antitumorales son el cisplatino y el carboplatino. La posible razón de este fracaso se puede encontrar en la consideración aislada de la interacción del fármaco con el ADN sin tener en cuenta que el entorno de esta acción es un sistema biológico dinámico que puede afectarle de diversas maneras.

Actualmente las tendencias en el estudio del comportamiento del cisplatino y de otros compuestos de Pt, se encaminan hacia la comprensión global de las interacciones del fármaco en su recorrido por el organismo. Por ello, en los últimos años se han

publicado una gran cantidad de trabajos enfocados a caracterizar la interacción del fármaco con biomoléculas diana distintas al ADN, presentes en el plasma sanguíneo, en el citosol celular, en el citoesqueleto, en las membranas o en vesículas celulares²².

Por lo tanto, es de vital importancia revisar los conocimientos hasta ahora adquiridos sobre estos fármacos, sus mecanismos de acción y las incógnitas que aún esconden, para poder sugerir nuevas líneas de investigación que aporten nueva información, bien para aplicar los actuales fármacos de forma más adecuada, o bien para diseñar nuevos fármacos que mejoren las propiedades antitumorales y reduzcan los efectos secundarios.

A.3. Antecedentes bibliográficos del análisis bioinorgánico de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

A lo largo de este apartado se va a hacer un recorrido por los principales trabajos publicados acerca del análisis bioinorgánico de los fármacos cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Como ya se ha mencionado anteriormente, estos tres fármacos antitumorales de Pt son los de mayor aplicación mundial.

Son muchas las disciplinas de la ciencia que han contribuido a profundizar en el conocimiento del comportamiento de estos fármacos en los seres vivos. Sin embargo, en esta memoria se prestará especial atención a los trabajos relacionados con la Química Analítica y a la contribución de esta disciplina a los avances logrados en los últimos años. Las aplicaciones de mayor interés quedan recogidas en las tablas correspondientes al Anexo I. Sin embargo, sería injusto atribuir únicamente a la Química Analítica el extraordinario desarrollo que está experimentando la investigación sobre los fármacos antitumorales basados en Pt. A pesar de ser fármacos conocidos desde hace varias décadas, es ahora cuando el número de trabajos publicados relacionados con el estudio de su comportamiento y propiedades ha experimentado un mayor incremento. Basta fijarse en el número de trabajos publicados²³ en los últimos años sobre cisplatino, carboplatino y oxaliplatino (Figuras 4, 5 y 6).

Con la mejora en las técnicas analíticas y el avance en el conocimiento del comportamiento de los fármacos antitumorales basados en Pt, los objetivos fijados para el desarrollo de nuevos estudios en este campo han ido variando. De esta manera, en un primer momento fue primordial la determinación del Pt total acumulado en distintos órganos diana así como la distribución del fármaco en el organismo. Enseguida se comprobó la poca estabilidad de algunos de estos fármacos en disolución acuosa y se constató la distinta efectividad citotóxica y/o toxicidad que presentaban sus distintas especies. De este modo, cobraron importancia los estudios de especiación²⁴ para evaluar la estabilidad de los fármacos en distintas condiciones así como para determinar la eficacia antitumoral o los efectos secundarios producidos por los distintos derivados.

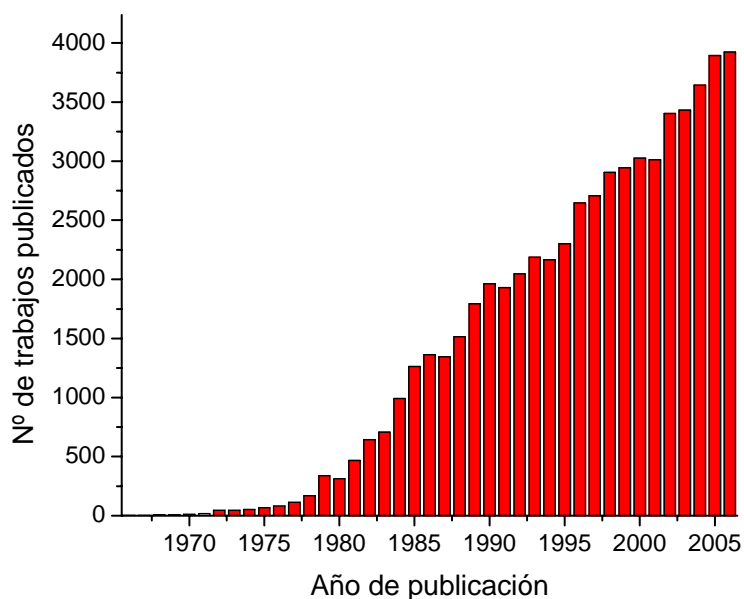


Figura 4. Histograma del número de publicaciones relacionadas con el análisis de cisplatino entre los años 1966 y 2006

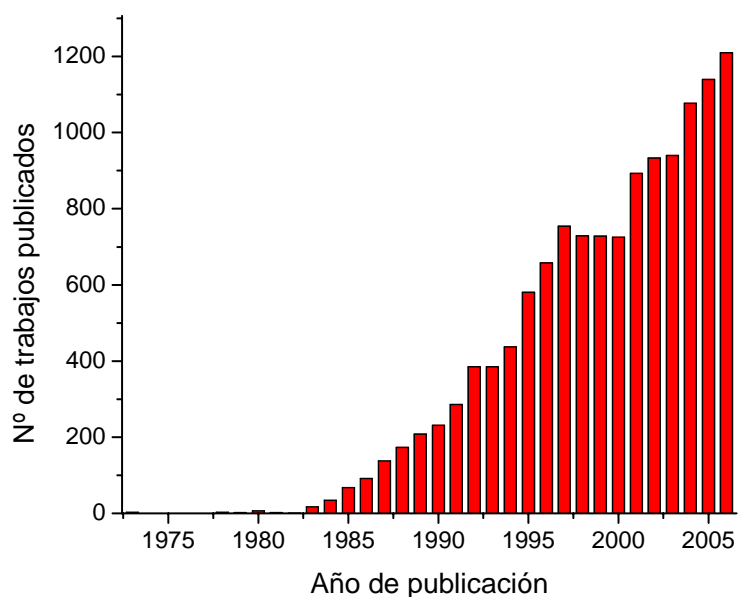


Figura 5. Histograma del número de publicaciones relacionadas con el análisis de carboplatino entre los años 1973 y 2006

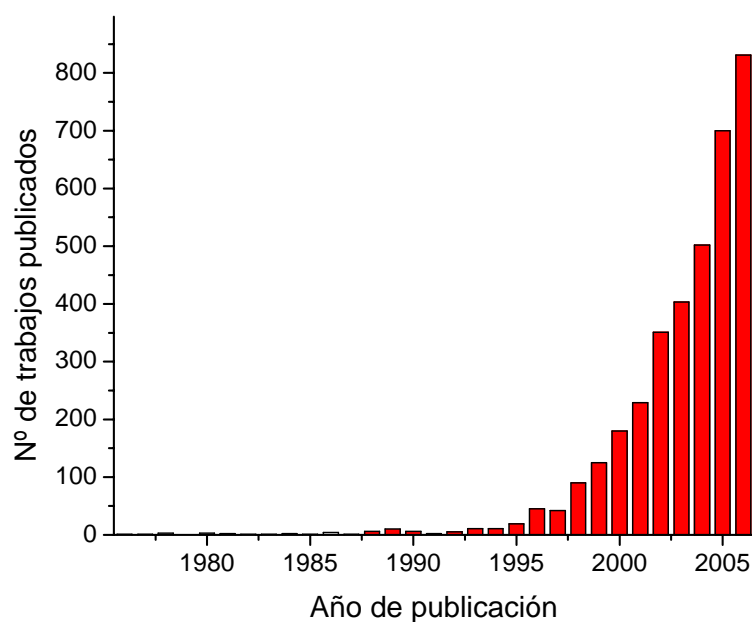


Figura 6. Histograma del número de publicaciones relacionadas con el análisis de oxaliplatino entre los años 1976 y 2006

A.3.1. Evolución del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en medio acuoso

Cisplatino

Como primer fármaco antitumoral de Pt descubierto, el cisplatino ha sido el más estudiado y desde hace unas dos décadas están caracterizadas sus distintas formas hidrolizadas derivadas de su evolución en medio acuoso ^{25 - 30} (Figura 7). Sin embargo, muy distinta es la detección e identificación de estos derivados en medios y concentraciones fisiológicas. Por ello, en los últimos años se han desarrollado metodologías analíticas para poder abordar dicho fin.

Andersson *et al.*³¹ propusieron a mediados de los años noventa la separación de cisplatino y el monoacuoso derivado mediante una cromatografía bidimensional en línea empleando una columna de intercambio aniónico fuerte y una columna de intercambio catiónico fuerte. La detección UV a 344 nm se llevó a cabo tras una derivatización post-columna con DDTTC (dietilditiocarbamato) y se estudió la influencia sobre la separación

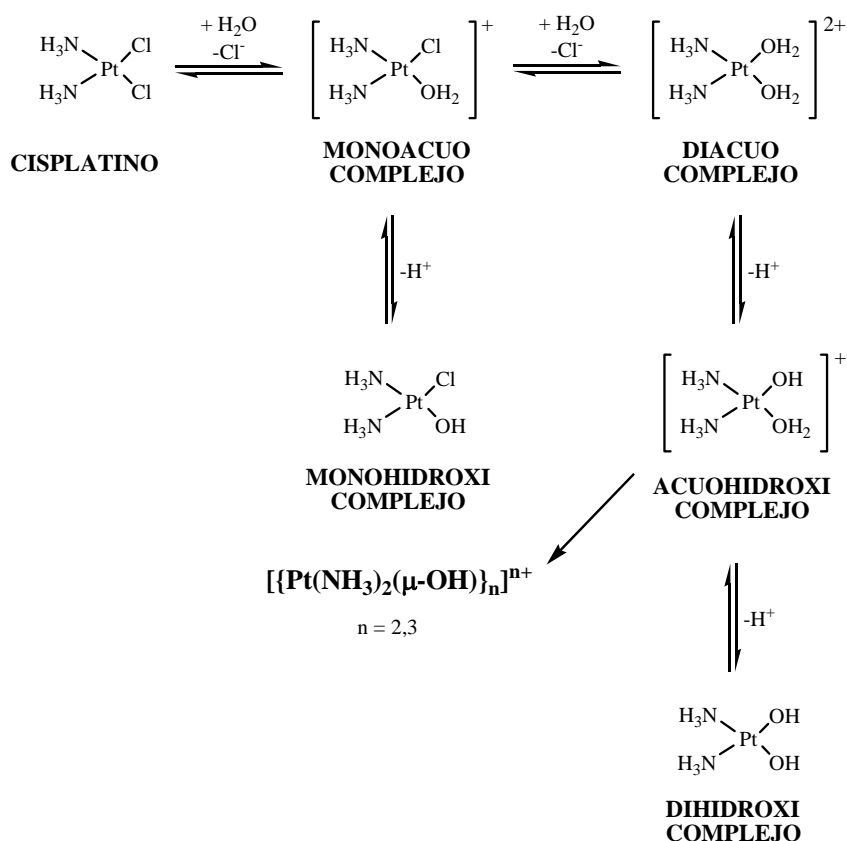


Figura 7. Evolución del cisplatino en medio acuoso

cromatográfica de factores como el pH, la temperatura y el contenido de metanol en la fase móvil. Poco tiempo después, estos mismos autores propusieron nuevas separaciones cromatográficas monodimensionales basadas en columnas rellenas de partículas esféricas de grafito poroso con la misma detección UV tras derivatización con DDTC^{32, 33}, para el estudio de la estabilidad y farmacocinética de las especies en sangre y plasma.

Más recientemente, se han desarrollado metodologías analíticas más sencillas y sensibles para la separación y detección del cisplatino y sus productos de hidrólisis. Verschraagen *et al.*³⁴ emplearon una separación cromatográfica basada en intercambio aniónico fuerte con detección mediante GFAAS en modo discontinuo, con la que consiguieron separar cisplatino de su monoacuo complejo. Además este método fue aplicado con éxito a la separación de estas dos especies en plasma humano. Heudi *et al.*³⁵ en experimentos empleando RP-HPLC-UV o RP-HPLC-ICP-MS no observaron la formación de diacuo complejo ni dímero del cisplatino incubando el fármaco en medio

acuoso y a temperatura ambiente. Estos datos coinciden con lo publicado anteriormente por otros autores²⁸ que sostienen que la formación del diacuo complejo, y por tanto del dímero de cisplatino, sólo se produce significativamente si se eliminan del medio los cloruros disociados, por ejemplo mediante la adición de AgCl. Por el contrario, sí se observa la transformación de un 30% de cisplatino en su monoacuo complejo a las 5 h de incubación. Añadiendo 15 mmoles L⁻¹ de NaCl al medio se reduce drásticamente esta transformación, siendo sólo un 2% del fármaco el que evoluciona a su especie monohidratada. Otros autores habían descrito previamente la estabilidad de cisplatino en medio salino³⁶.

Por el contrario, otro trabajo basado en la técnica híbrida RP-HPLC-ESI-MS³⁷, presenta resultados que difieren sustancialmente de los comentados anteriormente. Así, empleando condiciones de incubación similares a las utilizadas por Heudi *et al.*³⁵, se consigue separar cisplatino, monoacuo y diacuo derivado, y el dímero del fármaco, con una excelente resolución. Todas estas especies fueron identificadas por ESI-MS empleando concentraciones de fármaco de 50 µmoles L⁻¹. Los datos recogidos en este estudio muestran cómo, a las 24 h de incubación en medio acuoso a 37 °C y en ausencia de luz, un 30% del cisplatino inicial ha evolucionado. La máxima intensidad del pico correspondiente al monoacuo derivado se alcanza a las 3-4 h, mientras que el diacuo no alcanza su máxima intensidad hasta las 5 h. El dímero empieza a observarse a las 2 h de incubación y crece durante las 24 h del experimento. En este mismo experimento también se ensayaron los efectos de las condiciones ácidas (pH 3,0) y básicas (pH 8,2) en la evolución. A pH ácido, se favorece la formación del monoacuo complejo, no detectándose el dímero tras 24 h de incubación. En condiciones básicas se favorece la pérdida de Cl, por tanto se forma el diacuo complejo y el dímero más intensamente que en condiciones ácidas y neutras.

El desarrollo de metodologías analíticas de alta sensibilidad para estudiar la evolución de las especies es otro de los objetivos de la investigación de los fármacos basados en Pt. Haciendo uso de HPLC-ICP-MS, Hann *et al.*³⁸ consiguieron límites de detección de entre 0,09 y 0,15 µg L⁻¹ en muestras acuosas, biológicas y medioambientales para cisplatino. Además la separación cromatográfica planteada en este trabajo consigue resolver simultáneamente cisplatino, sus dos especies hidratadas, oxaliplatino, carboplatino y ciertos derivados de este último fármaco, empleando una fase estacionaria con mecanismo mixto de fase inversa e intercambio aniónico. También se

han experimentado mejoras en la sensibilidad de las técnicas estructurales de masas como ESI-MS en lo que se refiere a la detección de cisplatino y sus derivados. El empleo de ESI-FAIMS-IT-MS añadiendo N₂ como tercer gas cortina/carrier del FAIMS (espectrometría asimétrica por movilidad de iones), aumenta la sensibilidad disminuyendo el ruido de la señal y mejorando en dos órdenes de magnitud los límites de detección de ESI-IT-MS para cisplatino, llegando hasta 0.7 ng mL⁻¹ ³⁹. Particularmente en este trabajo se consiguen separaciones de cisplatino, monoacuo y diacuo complejos, sin necesidad de una técnica de separación previa o de algún tipo de derivatización.

Por último, cabe destacar dos interesantes trabajos en los que se evalúan las interacciones del cisplatino y sus productos de hidrólisis con fases móviles de amplio uso. Ambos trabajos tienen un profundo enfoque analítico ya que se cuestionan hasta qué punto la especie que se detecta o identifica por distintas técnicas analíticas está presente en la muestra o es un artefacto que surge por la interacción de la especie real con algún compuesto empleado en el análisis. El-Khateeb *et al.*⁴⁰ utilizaron RP-HPLC-UV para el análisis de cisplatino y sus derivados, e hicieron un exhaustivo estudio de su reactividad con componentes habituales de las fases móviles, ayudados por resonancia magnética nuclear (NMR). Observaron que el acetonitrilo, usado como modificador orgánico en muchas fases móviles, interacciona intensamente con el monoacuo y el diacuo derivado, mientras que el metanol es mucho menos reactivo. En cuanto a los ácidos usados para el ajuste del pH de la fase móvil, se recomienda el ácido trifluorometanosulfónico, mientras que los ácidos carboxílicos se demuestran reactivos con el analito. El ácido hexanosulfónico y el dodecilsulfato sódico (SDS) no presentan una reactividad significativa con ninguno de los derivados del cisplatino, sin embargo, se prefiere el uso de SDS al ofrecer una mejor separación cromatográfica. En un trabajo que aborda aspectos similares, Heudi *et al.*³⁵ evalúan mediante RP-HPLC-UV y RP-HPLC-ICP-MS, la idoneidad de ácido fórmico o fórmico como componentes de la fase móvil. La separación cromatográfica de cisplatino y su monoacuo derivado empleando ácido fórmico resuelve dos picos con Pt, mientras que empleando fosfórico se generan dos picos platinados adicionales, posiblemente como consecuencia de la interacción del ácido fosfórico con las especies. Por lo tanto, se concluye que el ácido fórmico es más adecuado que el fosfórico para la separación cromatográfica por fase inversa de derivados de cisplatino.

Carboplatino

Aunque la estabilidad del carboplatino tanto en medio acuoso como en medio salino, ha sido constatada con anterioridad³⁸, recientes trabajos demuestran la existencia de diversos productos de hidrólisis o degradación en medio acuoso⁴¹, si bien es cierto que el porcentaje de fármaco hidrolizado es muy pequeño en comparación con el fármaco que permanece en su forma original. Hasta 8 formas derivadas del carboplatino se han detectado mediante RP-HPLC-UV y 3 de ellas se han identificado mediante ESI-MS. La Figura 8 muestra un esquema del mecanismo propuesto en el mencionado trabajo acerca de la degradación e interconversión del carboplatino, siendo CP-I, CP-II y CP-IV las especies identificadas por ESI-MS.

En un trabajo anterior, Burns *et al.*⁴² detectaron mediante RP-HPLC-UV-ESI-MS la formación del dímero de carboplatino (CP-IV) en disolución acuosa, sin embargo, no fueron capaces de separarlo cromatográficamente del fármaco intacto ni de detectar otros productos de degradación. La adición de un 0,02% de ácido fórmico a la fase móvil empleada mejoró la sensibilidad del método previniendo la formación del dímero debido al bajo pH. De esta manera, se consiguen límites de detección para el carboplatino de 35 ng mL⁻¹.

Oxaliplatino

No son muy numerosos ni exhaustivos los trabajos dedicados a la caracterización de los distintos derivados del oxaliplatino. En presencia de medios o fluidos biológicos, el oxaliplatino sufre una serie de transformaciones espontáneas no mediadas enzimáticamente. El grupo saliente oxalato es desplazado por H₂O o nucleófilos presentes en el medio, tales como Cl⁻ o HCO₃⁻. La bibliografía referente al oxaliplatino, ofrece diferentes estructuras hidrolizadas o cloradas procedentes del fármaco^{43,44} que se han encontrado en orina o sangre (Figura 9). Contrariamente al cisplatino, el oxaliplatino ha demostrado ser menos estable a medida que aumenta la concentración de cloruros, siendo el Pt(DACH)Cl₂ el producto mayoritario⁴⁵.

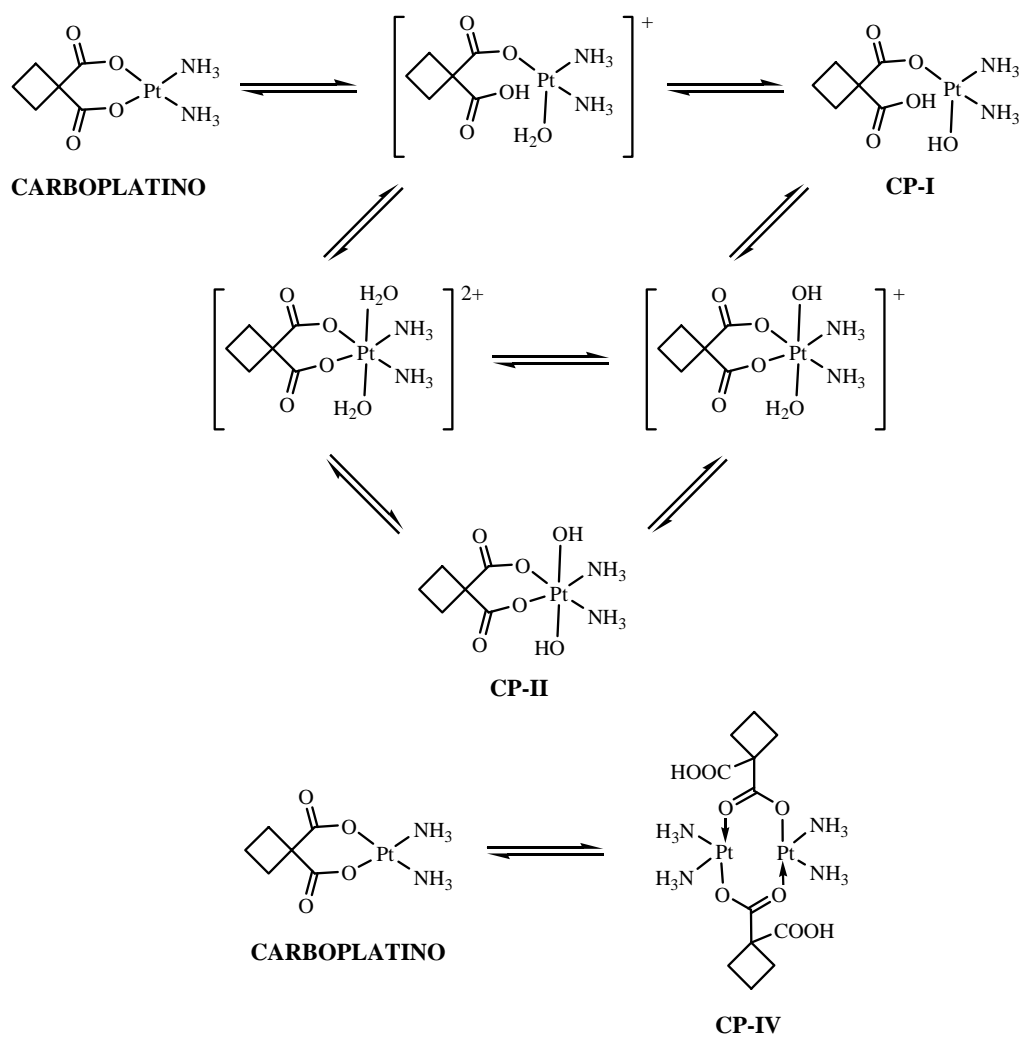


Figura 8. Evolución del carboplatino en medio acuoso

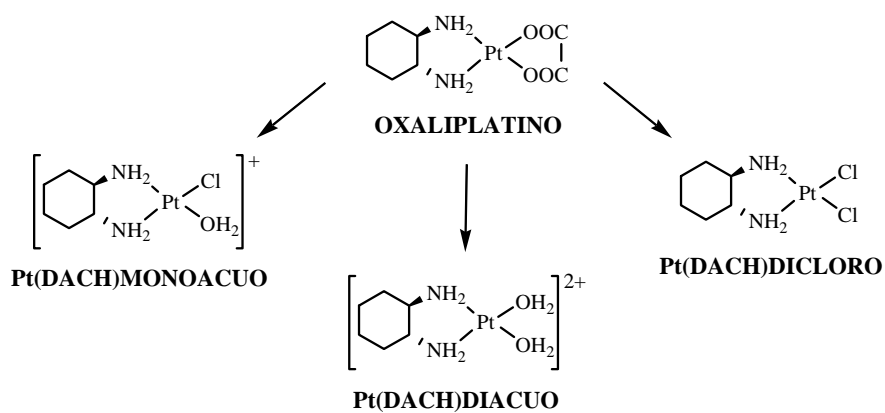


Figura 9. Evolución del oxaliplatino en medio acuoso y salino

A.3.2. Interacción de los fármacos de Pt con las biomoléculas de la sangre

La sangre se puede considerar como una muestra biológica de no muy elevada complejidad, compuesta por plasma (60%) y células sanguíneas (40%)⁴⁶. El plasma es un líquido amarillento y salado más denso que el agua, que a su vez está compuesto por suero y fibrinógeno. El suero sanguíneo es el líquido que permanece tras la coagulación de la sangre y es rico en importantes proteínas como albúmina, transferrina (Tf), inmunoglobulinas, etc. Por otro lado, las células sanguíneas son los glóbulos rojos, también llamados eritrocitos, hematíes o células rojas, los glóbulos blancos o leucocitos y las plaquetas. Una de las más importantes proteínas de las células rojas es la hemoglobina (Hb). Todas las proteínas mencionadas tienen diferentes funciones y pueden estar involucradas en la distribución y excreción del fármaco, así como afectar a su actividad, eficacia y toxicidad.

Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino se administran por vía intravenosa, de ahí la gran importancia que tiene el estudio de la interacción de estos agentes antitumorales con los componentes del torrente sanguíneo⁴⁷. La eficacia y toxicidad de estos fármacos, está notablemente influenciada por la manera de administrar las dosis, el empleo de agentes protectores, la aplicación combinada de otros fármacos y terapias, o la forma química en la que se encuentra el fármaco administrado. Mediante ICP-AES e ICP-MS, se ha cuantificado el Pt total y el Pt libre en plasma sanguíneo, correspondiente al fármaco total y al fármaco no ligado a proteínas, respectivamente. De esta manera, se demostró que se acumulan cantidades muy inferiores de Pt aplicando tratamientos que constan de un cierto número de dosis de concentración reducida, que administrando una sola dosis muy concentrada del fármaco⁴⁸. También se ha comprobado que es beneficiosa para el organismo la administración lenta de las dosis del fármaco en lugar de inyecciones rápidas y puntuales⁴⁹.

Muchos años de experimentación con estos anticancerígenos basados en Pt han servido para aprender a potenciar sus efectos citotóxicos y paliar sus efectos secundarios mediante la administración previa, simultánea o posterior de ciertos agentes. De esta manera, se ha demostrado que hidratando al paciente y administrándole pequeñas cantidades de NaCl o NH₄Cl unas horas antes de cada dosis de cisplatino, se previene en cierta medida la nefrotoxicidad propia de este fármaco⁵⁰. Para prevenir la ototoxicidad producida por el carboplatino en terapias que implican la apertura de la barrera

hematoencefálica durante el tratamiento, se ha comprobado la eficacia del tiosulfato sódico cuando es administrado varias horas después del carboplatino⁵¹. Por otro lado, se pueden administrar como parte del tratamiento terapéutico, los denominados agentes de rescate o protectores. Estos agentes son capaces de formar complejos estables con el Pt plasmático para posteriormente ser excretados. Sin duda, estos agentes de rescate han demostrado ser eficaces en la prevención de la nefrotoxicidad del cisplatino ya que evitan que el fármaco interactúe en el riñón¹¹.

El *cisplatino* interactúa con muchas proteínas presentes en la sangre. En experimentos de fraccionamiento mediante ultrafiltración un gran porcentaje de Pt queda unido a la fracción de alto peso molecular, lo cual no deja de ser interesante sabiendo que únicamente es activo el fármaco que no se une a biomoléculas⁵². Experimentos mediante técnicas híbridas SEC-ICP-MS⁵³, muestran que tras 3 h de incubación en un suero sanguíneo, el 80% del cisplatino permanece libre, mientras que a las 24 h de incubación un 80% del fármaco está unido a biomoléculas. Esta gran afinidad por las biomoléculas de la sangre unido al alto contenido salino del medio, son seguramente las responsables de que el cisplatino no evolucione significativamente hacia su monoacuo complejo. Así lo demuestran Andersson *et al.* al incubar cisplatino en plasma sanguíneo en condiciones fisiológicas de pH y temperatura³², y en experimentos *in vivo* con pacientes tratados con cisplatino³³, donde además se observa que la mayoría del monoacuo complejo detectado proviene de la dosis administrada y no de evolución en el propio torrente sanguíneo. En estos mismos trabajos se ofrecen datos de vidas medias del fármaco y su monoacuo complejo, comprobándose que en ambos casos los valores son muy bajos, oscilando entre 0,26 y 1,43 h. Estudios más recientes dedicados a la separación de cisplatino intacto y del monoacuo complejo en plasma humano⁵⁴, confirman estos mismos resultados mediante análisis HPLC-ICP-MS.

Generalmente se piensa que el fármaco unido a las proteínas de la sangre se excreta, pero hay quien mantiene que también sirve como almacén del complejo de Pt⁵⁵. Dentro de las posibles dianas de los fármacos antitumorales con Pt se ha descrito que el cisplatino interactúa con la Hb más intensamente que con la albúmina y mucho más que con las inmunoglobulinas⁵⁶.

Transcurridos entre 5 y 17 años desde el tratamiento con cisplatino, se han podido detectar en sangre concentraciones de Pt que oscilan entre 31 y 330 ng L⁻¹, lo que supone de 100 a 1000 veces más que los niveles fisiológicos⁵⁷.

En cuanto al *carboplatino*, existen muy pocos trabajos donde se evalúen sus interacciones con las proteínas de la sangre ya que, quizás, éste sea el fármaco menos reactivo de los tres estudiados. Esta escasa reactividad explica que se excrete en gran medida sin transformarse y que traspase fácilmente la barrera hematoencefálica. Haciendo uso de LC-ESI-MS, Guo *et al.*⁵⁸ recuperan intacto entorno al 60% del carboplatino incubado en plasma ultrafiltrado de rata. Aún así, recientemente se han determinado mediante SEC-ICP-MS interacciones del carboplatino con biomoléculas de la sangre con peso molecular cercano al de la HSA y al de las γ -globulinas⁵⁹.

Al igual que el cisplatino, el *oxaliplatino* tiene una intensa interacción con las biomoléculas del torrente sanguíneo⁴³. Al entrar en contacto con la sangre, el oxaliplatino pierde el grupo saliente oxalato dando lugar a especies más reactivas (Figura 9). Entre el 85 y el 88% del fármaco se une a biomoléculas del plasma sanguíneo tras 5 h de incubación con una vida media de 2 h⁶⁰. Uriens *et al.*⁶¹ corroboran estos datos ya que incubando oxaliplatino en suero sanguíneo observaron que entre el 79 y el 87% del Pt se encontraba unido a biomoléculas, en su mayoría covalentemente, alcanzándose el equilibrio a las 6 h. Otros autores aportan nuevos datos sobre la distribución del oxaliplatino en sangre de pacientes tratados con oxaliplatino y en experimentos *in vitro* con plasma^{62,63}. Tras 24 h el 80% del Pt se encuentra unido a biomoléculas del plasma sanguíneo y la relación entre el Pt presente en células rojas de la sangre, plasma sanguíneo y fármaco no unido es 3,1 : 3,7 : 1,0. La irreversibilidad de la unión del oxaliplatino con las células rojas⁶⁰ y la constatación en experimentos *in vitro*⁶⁴ de ausencia de flujos de Pt desde los eritrocitos, hace pensar que éstos no actúan como almacén de oxaliplatino farmacológicamente activo.

Trabajos de especiación mediante SEC-ICP-MS con plasma ultrafiltrado de pacientes tratados con oxaliplatino, permiten asociar pesos moleculares de picos cromatográficos con Pt, con ciertas proteínas de la sangre⁶⁵. De esta manera, se observa que el 40% del Pt eluye en la banda cromatográfica 160-200 KDa, pudiendo deberse a

unión a γ -globulinas, otro 40% eluye a unos 60 KDa, coincidente con el peso de la HSA y menos del 15% eluye por debajo de 2 KDa, pudiéndose atribuir esta señal a diversas especies como oxaliplatino libre, Pt-DACH o unión a metionina, cisteína, etc. También existen trabajos recientes que determinan las constantes de velocidad de reacción entre el oxaliplatino y biomoléculas tales como glutatión, cisteína y metionina⁶⁶. Los resultados confirman que el oxaliplatino reacciona más rápidamente con estas biomoléculas que el cisplatino, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de evaluar sus efectos en la célula.

El cálculo de la vida media terminal del oxaliplatino libre en sangre ofrece datos dispares y oscila entre 27⁶⁷ y 237 h⁶², según los autores y las técnicas empleadas. Los aductos oxaliplatino:proteína presentan vidas medias de alrededor de 10 días⁶⁸. Sendos trabajos *in vivo* tras administraciones de 130 mg m⁻² de oxaliplatino, ofrecen más datos de distribución del oxaliplatino en sangre. En el primero de ellos⁶⁹, 2 h después de la administración del quinto ciclo del tratamiento, un 65% del Pt en sangre se encuentra unido a biomoléculas, un 90% tras 6h y un 98% tras 3 semanas. De la misma manera, en el segundo trabajo⁶⁴ se observa, 2 h después de la primera administración, un 70% del Pt unido a biomoléculas y más del 95% cinco días más tarde. A pesar de ello, no se observa acumulación del fármaco en la sangre al contrario que en el caso del cisplatino, que se acumula tanto libre como unido a biomoléculas. Probablemente por ello el oxaliplatino no presenta nefrotoxicidad y la neurotoxicidad que produce es retardada o reversible⁴³.

A.3.2.1. Interacción de los fármacos de Pt con la albúmina

La albúmina presente en el suero sanguíneo humano (HSA) ha demostrado tener mucha afinidad por los fármacos antitumorales basados en complejos de Pt⁷⁰. De hecho, en incubaciones de HSA con cisplatino no se aprecia saturación de la proteína aunque se empleen grandes excesos de fármaco⁷¹. El transplatino presenta aún mayor reactividad que el cisplatino. El enlace cisplatino:HSA se ve influenciado por una gran cantidad de variables, como la relación fármaco:proteína, el medio y tiempo de incubación, la concentración inicial de la proteína, etc. De esta manera, diversos trabajos basados en filtración en gel ofrecen información sobre la estequiometría y la cinética de esta interacción sin llegar a coincidir completamente en sus resultados. Así, por ejemplo, Trynda-Lemiesz *et al.*⁷¹ publican que tras 14 días de incubación a 37°C con un exceso de

cisplatino de 20 veces, cada mol de HSA une hasta 8 moles de cisplatino. Incubaciones más cortas de entre 2 y 6 días, con exceso de cisplatino de 60 veces, obtienen la unión de entre 3,5 y 10,2 moles de fármaco a cada mol de HSA⁷². En ambos trabajos la cinética de reacción observada es rápida en una fase inicial y más lenta en una segunda fase. Sin embargo, se trabaja muy lejos de las proporciones fármaco:proteína alcanzadas realmente en la sangre de seres vivos tratados con cisplatino, por lo que la interpretación de los resultados de constantes de velocidad es compleja.

Trabajos más recientes basados en CE-ICP-MS estudian la estequiometría y cinética de las interacciones cisplatino:HSA⁷³. Las ventajas de las técnicas electroforéticas radican en el bajo consumo de analito, tiempos de análisis cortos, ausencia de efectos de la técnica sobre el equilibrio fármaco:proteína y compatibilidad con condiciones fisiológicas^{74,75}. Al aumentar la relación fármaco/proteína se observa un aumento en la velocidad de reacción alcanzando su máximo a 50 h con un exceso de cisplatino de 20 veces. La cinética de la reacción fue caracterizada como de pseudo-primer orden con una constante de velocidad k de $5,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, único dato disponible hasta la fecha acerca de cinéticas de reacción entre fármacos basados en Pt y proteínas de la sangre.

Hasta hoy en día, los datos que se tienen acerca de las constantes de enlace entre HSA y fármacos basados en Pt son escasos y parciales. Ciertos estudios por espectroscopía UV/Vis⁷⁶ han calculado constantes de asociación midiendo la absorbancia de la HSA (banda a 270 nm) a concentraciones crecientes de fármaco y asumiendo un solo tipo de sitio de unión en la formación del aducto cisplatino:HSA. Mediante CE se han realizado estudios de constantes de enlace y estequiometrías entre cisplatino u oxaliplatino, y distintas proteínas (HSA y Tf) en condiciones de equilibrio⁷⁷, obteniéndose resultados comparables para ambos fármacos.

Desde hace muchos años se ha pensado que la gran afinidad que presentan los fármacos basados en Pt por la albúmina reside en el grupo cisteína 34. Sin embargo, en la albúmina sólo existe un grupo cisteína, por lo que deben existir otros puntos de enlace que justifiquen la elevada estequiometría que se observa al incubarla con cisplatino. A principios de la década de los 90 se demostró con albúmina de suero bovino (BSA) la ruptura de puentes disulfuro para unir moléculas de cisplatino^{72,78,79} y transplatino⁸⁰, probablemente seguida de enlaces intramoleculares con la consecuente alteración de la estructura secundaria de la proteína y por tanto de su actividad biológica. Sin embargo,

con los puentes disulfuro rotos y la cisteína 34, no se justificaba aún la unión de tantas moléculas de cisplatino, por lo que se pensó en sitios de enlace alternativos como metioninas o histidinas. Reedijk *et al.*^{55, 81} sugieren que los aductos Pt:metionina pueden servir como reservorios de Pt para la platinación del ADN. Por otro lado, hay autores que identifican mediante ensayos de NMR, la metionina-298 como el residuo sulfurado de mayor afinidad por el cisplatino⁸². En este mismo trabajo no se identificó la histidina como un posible N-ligando aunque sí se halló un ligando nitrogenado participante en la formación de un S,N-macroquelato. En esta misma línea se enmarcan los descubrimientos de un trabajo citado con anterioridad⁷⁶, donde mediante FTIR se observan cambios o desplazamientos en grupos amida o tiol de tirosinas y cisteínas, que por tanto, pudieran estar implicados en la unión del cisplatino. Además se vuelven a confirmar cambios estructurales en la HSA inducidos por su interacción con el cisplatino.

El fármaco puede inducir cambios conformacionales en las proteínas al unirse a ellas, bien por pequeños cambios en el entorno del centro de unión o por cambios en la estructura secundaria de la proteína. Un ensayo típico para monitorizar los cambios conformacionales que sufre la HSA en presencia de cisplatino es la medida por fluorescencia del *quenching* del triptófano 214^{71,72,80}. En función de la relación molar fármaco/proteína la intensidad de la señal de fluorescencia puede disminuir entre un 30 y un 75% con respecto al valor inicial. Esto indica un cambio en el bolsillo hidrofóbico del subdominio IIA hacia la creación de un entorno más hidrofóbico. La ruptura de puentes disulfuro de la proteína en presencia de cisplatino, podría ser responsable del cambio en la estructura secundaria, es decir, de la deformación de la hélice α . La HSA intacta posee una estructura compuesta en un 67% por hélice α . Por dicroísmo circular (CD), se evidencia una alteración de las bandas correspondientes al enlace S-S acompañada de un cambio en el contenido estructural de hélice α ⁵⁶. Otros estudios similares basados en la misma técnica revelan disminuciones de aproximadamente el 15% en la estructura hélice α . Otras técnicas se han usado para constatar la disminución de la estructura hélice α . Así por ejemplo, mediante espectroscopía UV/Vis se observa una disminución del 33%⁷⁹ y mediante FTIR de aproximadamente un 45%⁷⁶. La ruptura de los puentes disulfuro en presencia de cisplatino también se ha observado en las γ -globulinas⁸³, generándose agregados insolubles como consecuencia de la interacción.

También existen evidencias de dimerización de la HSA en presencia de cisplatino. Estudios por filtración en gel y detección UV/Vis confirman la dimerización de la HSA, produciéndose especies de peso molecular entorno a 140 KDa⁸². Probablemente la ruptura de puentes disulfuro esté relacionada con los procesos de agregación. De esta manera se podría explicar lo observado por Einhäuser *et al.*⁵² donde tras 24 h de incubación no encuentran Pt en fracciones inferiores a 100 KDa. El transplatino reduce la estructura helicoidal⁸⁰ e induce la dimerización de la HSA⁸² en mayor grado que el cisplatino.

Otro aspecto importante a considerar cuando la HSA interacciona con fármacos antitumorales basados en Pt, es el cambio de afinidad por otros ligandos. Monitorizando mediante espectroscopía UV los aductos HSA:hemo y cisplatino:HSA:hemo⁷¹, se observa la supresión del enlace *hemo* en presencia del fármaco. En este mismo trabajo se ha observado mediante CD que la unión de la bilirrubina a la HSA se altera en presencia de cisplatino.

Por último, cabe citar uno de los pocos trabajos relacionados con la interacción del carboplatino con proteínas de la sangre. En este estudio Ni *et al.*⁸⁴ concluyen que la unión del carboplatino a la HSA puede favorecer el efecto quimioterapéutico del fármaco ya que comprobaron que al administrar conjuntamente 5 mg/Kg de carboplatino y 500 mg/Kg de HSA, aumenta la cantidad de Pt detectado en hígado, estómago, intestino, pulmón, peritoneo y cavidad pélvica, con respecto al grupo control.

A.3.2.2. Interacción de los fármacos de Pt con la transferrina

A pesar de ser una de las proteínas más importantes del suero sanguíneo (2.5 g/L), la Tf no parece interactuar predominantemente con complejos de Pt. Así ha sido demostrado por Rudnev *et al.*⁷⁷, quienes evaluando las constantes de asociación y estequiometrías del cisplatino y oxaliplatino con HSA y Tf, concluyeron que ambos fármacos interactúan más intensamente con HSA. Sin embargo, existen interesantes estudios que profundizan en la interacción de la Tf con cisplatino u oxaliplatino. Los trabajos publicados sobre la interacción cisplatino:apo-Tf sugieren que el fármaco ocupa un lugar de unión singular preferencial aunque, como se demuestra, es posible la unión de más de una molécula de cisplatino⁸⁵. Los espectros ESI-Q-TOF del trabajo de Khalaila

*et al.*⁸⁵ no permiten concluir cómo se une el cisplatino a la apo-Tf, pero parecen indicar la unión del fármaco intacto en primera instancia, para luego perder un cloro en el transcurso de la incubación. Sin embargo, estos resultados no terminan de ser concluyentes, no sólo por los cortos tiempos de incubación (máximo tiempo de incubación 3h), sino también por emplear relaciones molares muy lejanas a las encontradas en pacientes tratados con estos fármacos y por llevar a cabo incubaciones en condiciones de pH y temperatura no fisiológicas.

Mediante estudios de ESI-MS² y modelización molecular se justifica la unión del cisplatino a grupos funcionales hidroxilo de la treonina 457 de la Tf⁸⁶ con pérdida de un cloro por parte del fármaco. Por el contrario, otros experimentos de NMR muestran que la metionina 256 y 499 son los únicos residuos alterados en la formación del aducto del cisplatino con la Tf^{87,88}.

También se han llevado a cabo estudios comparando los efectos del cisplatino libre y el cisplatino ligado a Tf⁸⁹. El empleo del aducto fármaco:Tf en experimentos *in vitro* produjo un descenso en la reactividad de la Tf hacia los receptores de células cancerígenas A 431 (células de carcinoma epidérmico humano) así como una disminución de la citotoxicidad del fármaco. Por el contrario, se observó un retraso en la eliminación del fármaco de la sangre si la forma administrada era el aducto cisplatino:Tf. Los mismos autores demostraron posteriormente⁹⁰ que la citotoxicidad del aducto cisplatino:HSA era alrededor de un orden de magnitud inferior a la del aducto cisplatino:Tf.

El caso del oxaliplatino ha sido estudiado incubándolo con holo-Tf (transferrina saturada con Fe) y detectándolo mediante HPLC-ICP-MS y nanoESI-Q-TOF⁹¹. Los resultados muestran la formación de un aducto no covalente oxaliplatino:holo-Tf donde una molécula intacta del fármaco se une sumando exactamente 397 Da al peso inicial de la proteína. Además gracias al carácter multi-elemental del ICP-MS se ha podido constatar que el Fe presente en la holo-Tf no se ve desplazado por el Pt.

A.3.2.3. Interacción de los fármacos de Pt con la hemoglobina

La interacción de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino con la Hb se ha estudiado mediante SEC-ICP-MS y nanoESI-MS. El orden de reactividad de estos fármacos con la Hb es el siguiente: oxaliplatino > cisplatino > carboplatino⁹². La separación y monitorización mediante SEC-ICP-MS de las incubaciones de cada uno de estos fármacos con Hb, ha permitido separar al menos tres especies diferentes Pt:Hb para cada fármaco. La monitorización simultánea de ⁵⁷Fe y ¹⁹⁵Pt en experimentos *in vitro* donde se incubaron muestras de sangre de voluntarios sanos con cada uno de los fármacos, ha permitido saber que de las tres especies sólo una contenía Fe, seguramente correspondiente a la Hb intacta unida al fármaco. Las otras dos no mostraron señal de ⁵⁷Fe por pérdida del grupo *hemo*. La pérdida del grupo *hemo* se confirmó con experimentos nanoESI-MS donde se encontraron residuos m/z 616.5. Este dato es de suma importancia por los posibles efectos secundarios que puede producir el fármaco al mermar la capacidad de Hb para unir oxígeno.

También se han hecho estudios para conocer la especie de cisplatino que interacciona con la Hb. En incubaciones de Hb con cisplatino, Mandal *et al.*⁹³ encontraron fragmentos de masas por nanoESI-MS con desplazamientos de 227 Da con respecto a los fragmentos de la Hb intacta. Esta diferencia se puede explicar por la unión de (Pt(NH₃)₂)²⁺ (229 Da) y la pérdida de dos protones, no siendo por tanto el cisplatino intacto el que se encuentra unido a la Hb. También se ha estudiado la influencia de factores como la temperatura y la concentración en las incubaciones de cisplatino con la Hb⁹³. Como cabía esperar, a 37°C se obtienen velocidades de interacción mayores que a temperatura ambiente. De la misma manera, mayores concentraciones de cisplatino potencian la formación de los complejos cisplatino:Hb y también la pérdida del grupo *hemo*. Cabe destacar que aun empleando concentraciones clínicamente relevantes de cisplatino (0,05 μmoles L⁻¹), la formación de complejos cisplatino:Hb tiene lugar, aumentando según se incrementa la concentración de Hb (1-8 μM)⁹⁴.

Recientemente se ha publicado un interesante trabajo donde se profundiza en la naturaleza de la unión oxaliplatino:Hb⁹⁵. En este trabajo se identifican mediante nanoESI-Q-TOF aductos oxaliplatino:Hb, siendo éstos [(αhβh)₂-oxaliplatino] y [(αhβh)₂-Pt-DACH]. La formación de estos aductos puede ir acompañada de pérdidas del grupo *hemo* como se puntualizó anteriormente⁹².

Varios autores han descrito como irreversibles las interacciones del oxaliplatino con las proteínas de los eritrocitos^{60,68}. Determinar la extensión en la que este fármaco interacciona con la Hb es de suma importancia para conocer la cantidad de fármaco que está disponible para alcanzar el ADN y ejercer el efecto citotóxico deseado. Por ello no es de extrañar que algunos autores propongan el aducto oxaliplatino:Hb como biomarcador para conocer la dosis efectiva de Pt administrada⁹⁵. Sin embargo, los mecanismos por los que el oxaliplatino y otros fármacos antitumorales basados en Pt son transportados dentro de los eritrocitos para formar los aductos fármaco:Hb, siguen siendo desconocidos.

A.3.3. Interacción de los fármacos de Pt con la orina

Los niveles basales de Pt en orina son extremadamente bajos como demostraron Begerow *et al.*⁹⁶ en un trabajo donde se empleó ICP-MS de doble enfoque (DF-ICP-MS) como detector. La combinación de la fotólisis sobre la muestra de orina para eliminar efectos matriz, con una técnica de alta sensibilidad como el DF-ICP-MS, permitió obtener límites de detección de 0,24 ng L⁻¹, siendo los valores de concentración de Pt basal en personas no expuestas de 0,48 a 7,65 ng L⁻¹. Estas reducidas concentraciones fisiológicas de Pt en orina permiten detectar con facilidad pequeñas alteraciones en la concentración de Pt como consecuencia de tratamientos antitumorales con complejos de Pt. De esta manera, se han podido detectar mediante voltamperometría concentraciones de Pt en orina de 180 ng L⁻¹ en pacientes tratados con cisplatino hace 17 años⁵⁷.

Las cantidades y la forma química en la que el fármaco es excretado, bien por la orina o bien por las heces, tienen mucho que ver con su reactividad y por lo tanto con su toxicidad. Los datos recogidos de la bibliografía muestran cómo el carboplatino, el fármaco menos tóxico de los tres estudiados a lo largo de esta memoria, es el que se excreta más rápidamente.

Excreción del cisplatino

La administración de dosis de cisplatino de entre 40 y 140 mg m⁻², inyectado puntualmente o mediante infusiones en periodos de 1 a 24 h de duración, producen la eliminación por la orina del 10 al 40% del fármaco en las primeras 24 h⁹⁷. A los 5 días de la administración de dosis de 40 a 100 mg m⁻² mediante infusiones en periodos de 2 a 8 h, del 35 al 51% del Pt ha sido excretado por la orina. Alrededor de un 13 a un 17% del Pt excretado en la orina al cabo de 1 h tras la administración de una dosis de 50 mg m⁻², lo hace en forma de fármaco intacto. La mayoría del Pt administrado se excreta en las primeras horas y sólo un pequeño porcentaje del Pt se excreta más allá de las 24 h. El hecho de que más del 50% del cisplatino administrado persista durante largo tiempo en el organismo se debe a su elevada reactividad con biomoléculas de la sangre o del interior celular. A pesar de haberse encontrado Pt en bilis e intestino grueso, la eliminación del cisplatino a través de las heces es insignificante.

Tang *et al.*⁹⁸ trabajaron en la identificación de especies platinadas en orina de pacientes tratados con cisplatino y estudiaron las diferencias entre las especies encontradas en la orina de ratas control y diabéticas. Para ello utilizaron las técnicas RP-HPLC-ICP-MS, NMR de ¹H y ¹³C y FAB-MS. Las especies metabolizadas *in vitro* fueron caracterizadas mediante sus tiempos de retención e identificadas por masas. Haciendo uso de estos datos fue posible la identificación en muestras reales de orina humana de cisplatino intacto (C), su monoacuo complejo (H₁) y el complejo *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl(Creatinina)]⁺ (R₁) (Figura 10 a). De la misma manera, se identificaron especies como el aducto cisplatino:urea, que no se resuelve totalmente de la especie H₁, y el cisplatino:ácido úrico, que eluye justo después del fármaco intacto. Tres o cuatro semanas después del tratamiento, aún quedan en la orina 50-100 µg L⁻¹ de Pt mientras que justo después de la infusión del fármaco se detectaron 30-50 mg L⁻¹. En los cromatogramas correspondientes a la tercera semana tras el tratamiento (Figura 10 b), se observa una gran biotransformación de las especies que se encontraron con anterioridad. Excepto las especies minoritarias que eluyen a tiempos de retención inferiores a 300 s, las demás especies platinadas detectadas en estas separaciones no coinciden con las citadas anteriormente, por lo que no pudieron ser identificadas.

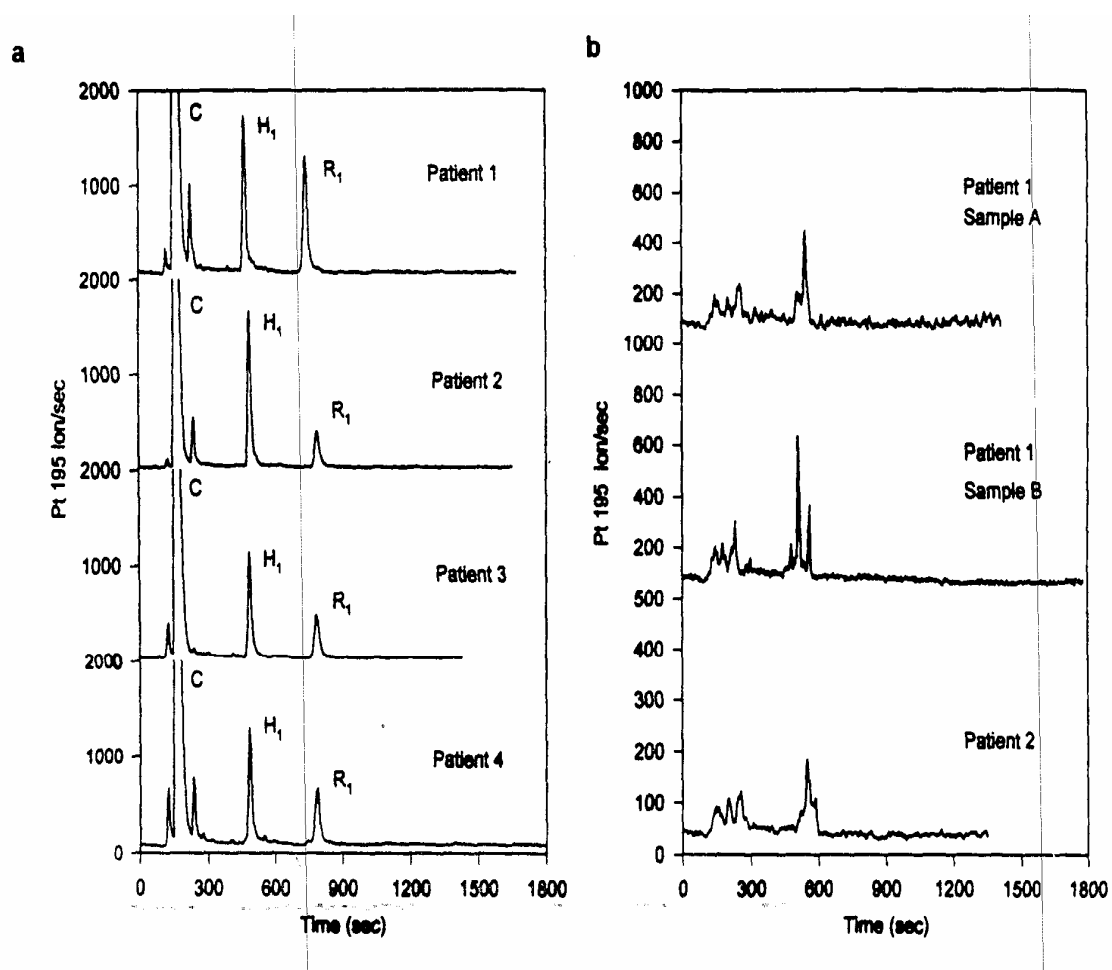


Figura 10. Cromatogramas (^{195}Pt) de muestras de orina procedente de pacientes tratados con cisplatino⁹⁸ recogidas a) inmediatamente después de la administración y b) tres semanas después

Por último, cabe destacar el estudio que se realizó en este mismo trabajo con ratas control y diabéticas. Se conoce que las ratas diabéticas son resistentes a la nefrotoxicidad⁹⁹ del cisplatino. El experimento consistió en la inducción de diabetes a un grupo de ratas para posteriormente comparar las especies con Pt detectadas mediante HPLC-ICP-MS en muestras de orina. La mayoría de las especies coincidieron tanto cuantitativa como cualitativamente, con la excepción de un pico minoritario que no fue posible identificar.

Excreción del carboplatino

Al igual que en el caso del cisplatino, el riñón es la principal ruta para la eliminación del fármaco¹⁰⁰. También de la misma manera, la mayoría del fármaco se excreta en las 6 primeras horas, eliminándose entre el 50 y el 70% de fármaco en las primeras 24 h tras la administración. Estos datos comparados con los del cisplatino muestran una primera diferencia importante que está relacionada con la reactividad de ambos fármacos. Más de la mitad del carboplatino administrado se excreta en las primeras 24 h, mientras que el cisplatino ni siquiera en el peor de los casos alcanza el 40% de eliminación. Además el 32% de la dosis se excreta como fármaco intacto. Esto coincide con los datos ofrecidos por Tang *et al.*⁹⁸ (Figura 11 a) donde se aprecia que justo después de la administración del carboplatino el compuesto platinado mayoritario en la orina humana es el fármaco intacto. Tres semanas después del tratamiento, aún se aprecian grandes cantidades de Pt en la orina, sin embargo el carboplatino ha sufrido una gran biotransformación en múltiples especies (Figura 11 b). En uno de los pacientes estudiados se observan especies platinadas con tiempos de retención iguales al cisplatino y a su monoacuo complejo, lo que vendría a confirmar la posibilidad de que el carboplatino pudiera convertirse *in vivo* en cisplatino¹⁰¹.

En cuanto al carboplatino que no es eliminado tras 24 h, la mayoría (85-89%) se encuentra ligado irreversiblemente a proteínas del plasma y es eliminado lentamente ya que su vida media en el plasma es de al menos 5 días.

Excreción del oxaliplatino

La elevada reactividad del oxaliplatino se aprecia tanto en la cantidad de fármaco excretada tras su administración, como en la cantidad de especies platinadas que se encuentran en la orina de pacientes tratados con este fármaco⁴³. Allen *et al.*¹⁰² estudiaron la excreción de oxaliplatino en pacientes tratados con dosis simples de 130 mg m⁻². Las muestras de orina y heces recogidas durante 5 días a 5 pacientes, permitieron demostrar que, al igual que para cisplatino y carboplatino, la eliminación principal del oxaliplatino se produce a través de la orina. Durante los cinco días posteriores al tratamiento el 53,8%

del Pt administrado fue eliminado por la orina y sólo un 2,1% por las heces. Otros autores obtuvieron resultados parecidos en ensayos similares^{69,103}.

Más allá de la cuantificación del Pt excretado, se han llevado a cabo estudios acerca de las especies de Pt que se encuentran en la orina. Experimentos *in vitro* de oxaliplatino con orina han mostrado hasta 16 especies con Pt¹⁰⁴. Las especies mayoritarias identificadas por espectrometría de masas fueron los complejos Pt(DACH)-con dicreatinina (24%), metionina (6%), monocloro (2%), monoclorocreatinina (14%), dicloro (7%) y monocreatinina (11%), mientras que el Pt(DACH)diacuo complejo se

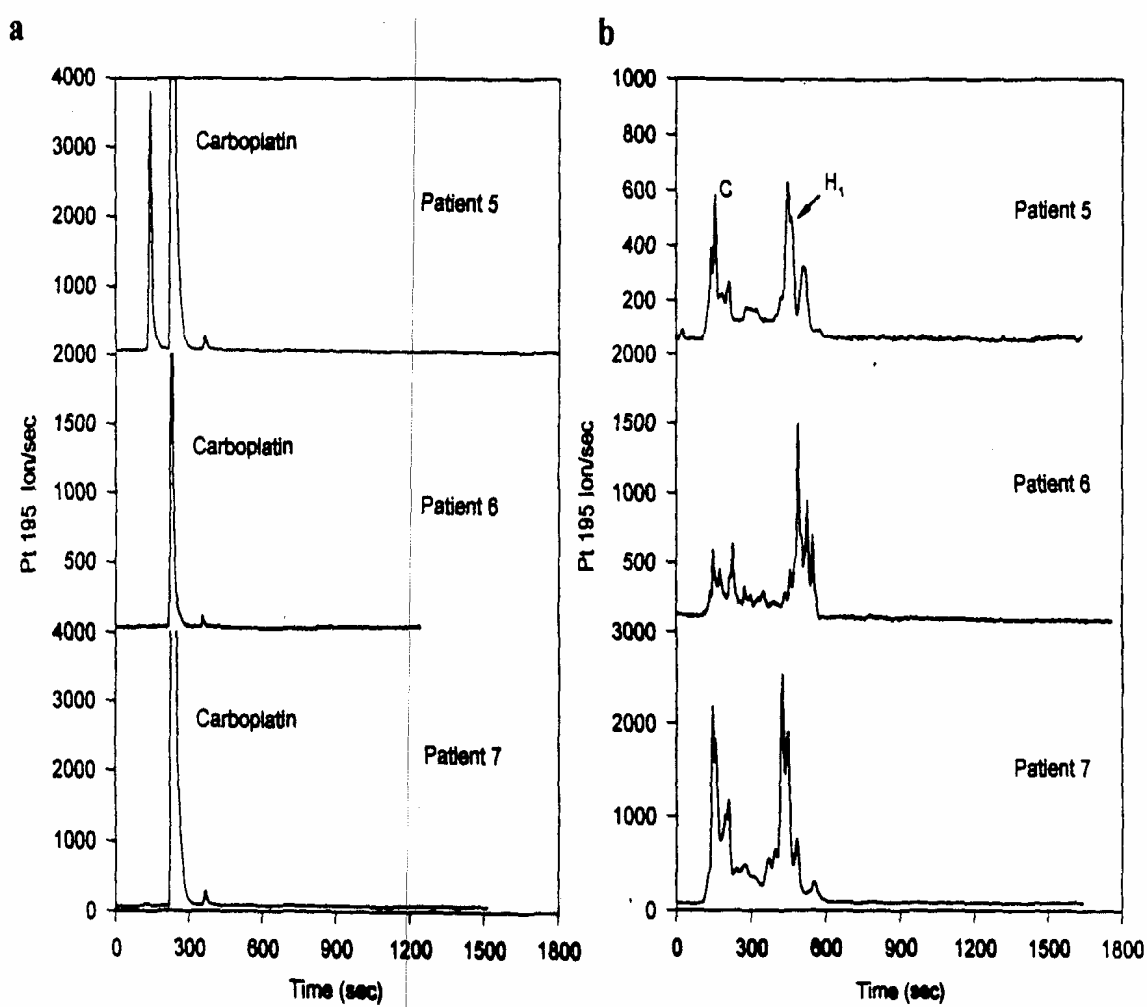


Figura 11. Cromatogramas (¹⁹⁵Pt) de muestras de orina procedente de pacientes tratados con carboplatino⁹⁸ recogidas a) inmediatamente después de la administración y b) tres semanas después

identificó mediante comparación de los tiempos de retención obtenidos por HPLC. Trabajos *in vivo* con cinco pacientes tratados con 130 mg m^{-2} de oxaliplatino confirman los resultados obtenidos *in vitro*. De esta manera, se identificaron por masas los siguientes complejos Pt(DACH)- con dicreatinina (1-4%), metionina (1-7%), monocloro (2%), monoclorocreatinina (1-20%) y monocreatinina (1-10%). Además se identificó la especie Pt(DACH)glutación (2-18%) que es muy significativa desde el punto de vista que confirma la posibilidad de que el glutación intracelular actúe como detoxificador. Existen asimismo, otras especies con Pt resueltas por HPLC que no pudieron ser identificadas. Otros trabajos también han conseguido excelentes separaciones de especies con Pt en muestras de orina de pacientes tratados con 100 mg m^{-2} de oxaliplatino³⁸, sin embargo, no han abordado la identificación de las mismas.

A.3.4. Distribución y acumulación de los fármacos de Pt en tejidos

Tras el descubrimiento del cisplatino como potencial fármaco antitumoral, no tardaron mucho en aparecer los primeros estudios acerca de la distribución del fármaco en organismos vivos. Tothill *et al.*¹⁰⁵ estudiaron la acumulación total del Pt mediante ICP-MS en animales y en humanos tratados con cisplatino y carboplatino. En ratas la acumulación resultó ser de entorno al 4% del Pt administrado al cabo de 3 meses y en cerdos de un 5% transcurridos 11 meses. La acumulación total en humanos a los 11 meses del tratamiento podía exceder el 5% de la cantidad administrada. Concretamente determinaron que el hígado era el órgano que más Pt acumulaba, alcanzándose valores de 0,5 ng de Pt por g de tejido húmedo administrando 1 mg de cisplatino por Kg de peso corporal.

Otros trabajos coinciden en que el hígado es el órgano que alcanza la concentración de Pt más elevada. Mediante fluorescencia de rayos X, Stewart *et al.*¹⁰⁶ confirman que tras la administración de cisplatino el hígado es el órgano que más Pt acumula, seguido de próstata y riñón. Inferiores son los niveles de Pt determinados en vejiga, músculo, testículos, páncreas y bazo, y mucho más reducidos los encontrados en intestino, glándula suprarrenal, corazón, pulmones, cerebro y cerebelo. En la Figura 12 se muestran los datos de 12 pacientes aquejados de diversos tumores, tratados con

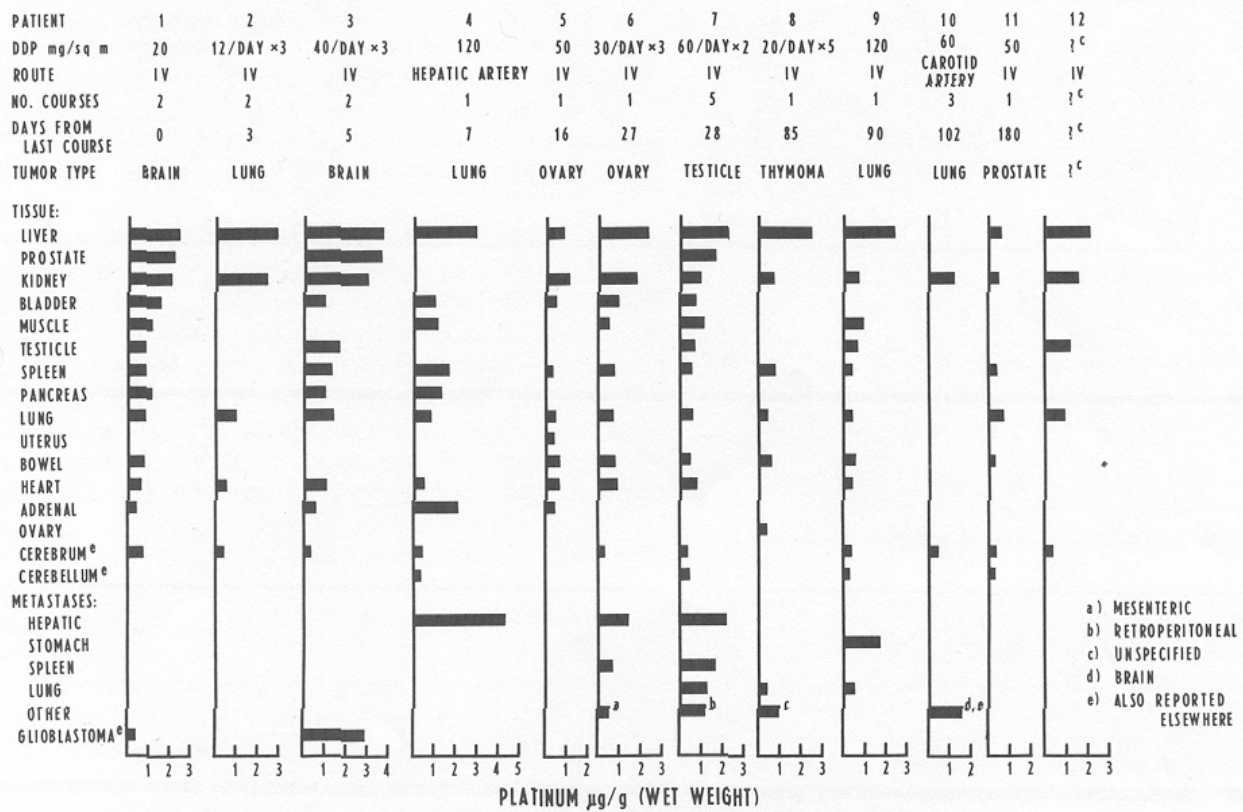


Figura 12. Concentraciones de Pt en tejidos humanos tras una terapia con cisplatino¹⁰⁶. En todos los órganos medidos se detectó Pt. La ausencia de medida de concentración se debe a que ese órgano no pudo ser analizado. Los pacientes 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11 y 12 eran hombres, mientras que los pacientes 4, 5, 6 y 8 eran mujeres.

distintas dosis de cisplatino y cuyos órganos fueron analizados a diferentes tiempos tras la última administración.

Estudios similares¹⁰⁷ mediante análisis por activación neutrónica (NAA) señalan una vez más el hígado como el órgano que más Pt acumula tras una terapia con cisplatino, seguido de riñón y testículos. Por el contrario, los músculos pierden el Pt acumulado más rápidamente que otros tejidos. La imagen obtenida mediante espectroscopía gamma, presentada por Areberg *et al.*¹⁰⁸ (Figura 13), muestra las zonas donde se produce mayor acumulación de ¹⁹¹Pt-cisplatino.

Por último cabe destacar el trabajo de Siddik *et al.*¹⁰⁹, donde se compara la acumulación de Pt experimentada en ratones tratados con cisplatino y con carboplatino.

Se observa como, a pesar de la diferencia de dosis administradas a los ratones (4 mg Kg^{-1} de cisplatino y 80 mg Kg^{-1} de carboplatino), la relación Pt en tejido frente a Pt en plasma sanguíneo se mantiene similar para ambos fármacos durante la fase de administración. Posteriormente, entre el primer y el décimo día, no sólo la mencionada relación, sino también las concentraciones de Pt en la mayoría de los tejidos analizados fueron comparables. Sin embargo, en el caso de bazo, cerebro, músculo, testículos ovarios y bilis, las concentraciones de Pt tras la administración de carboplatino fueron entre 2 y 6 veces superiores a las de cisplatino.

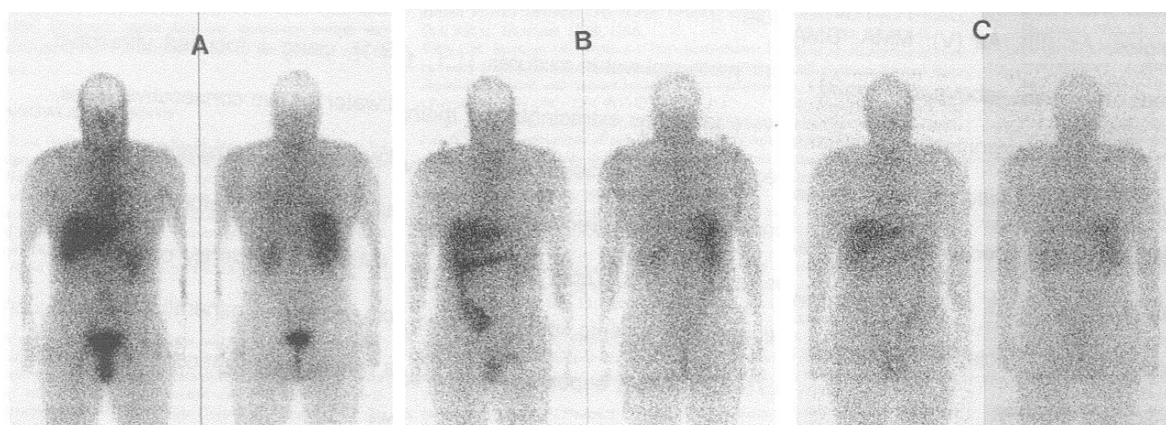


Figura 13. Imágenes de espectroscopía gamma de cuerpos humanos tratados con 5 mg de ^{191}Pt -cisplatino a) 1 h , b) 65 h y c) 163 h después de la administración

A.3.5. Interacción de los fármacos de Pt en el interior celular

El cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, alcanzan el interior de la célula mediante un mecanismo de difusión pasiva como moléculas neutras¹¹⁰. Sin embargo, aunque esta difusión pasiva parece ser el proceso dominante, no se pueden descartar otro tipo de vías de entrada que podrían implicar un transporte mediado por proteínas¹¹¹. Algunos autores proponen un mecanismo mixto¹¹², y aunque existen evidencias bioquímicas y biológicas para soportar dicha hipótesis, aun se está muy lejos de dar una explicación completa del proceso. Una de estas evidencias se presenta en un trabajo enfocado a la identificación de dianas proteicas dentro de un sistema celular completo¹¹³, donde se identifican proteínas de membrana externa en la banda electroforética con mayor contenido en Pt. También se ha descrito la interacción preferencial del cisplatino con las proteínas de

membrana frente a los fosfolípidos¹¹⁴. A pesar de ello, la débil y reversible interacción del fármaco con los fosfolípidos parece provocar un cambio estructural de la membrana con la consiguiente alteración de propiedades como la permeabilidad²². Otra posible ruta de entrada en la célula de los fármacos basados en Pt, es la mediación de proteínas transportadoras de Cu¹¹⁵.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, el cisplatino libre en la sangre se mantiene principalmente en su forma intacta³³. Una vez en el interior de la célula, la baja salinidad del citoplasma (5 mM aprox.), hace que el cisplatino comience a hidrolizarse y se formen diversos acu complejos¹¹⁶ que son más reactivos que el fármaco original (Figura 7). Aunque en la célula existen numerosas biomoléculas que podrían actuar como bioligandos del cisplatino, la principal diana de las formas hidrolizadas del fármaco es el ADN (Figura 14). La interacción del cisplatino con el ADN es la responsable de la muerte celular como así lo confirman las claras correlaciones observadas entre la citotoxicidad y la cantidad de Pt unido al ADN¹¹⁷⁻¹¹⁹.

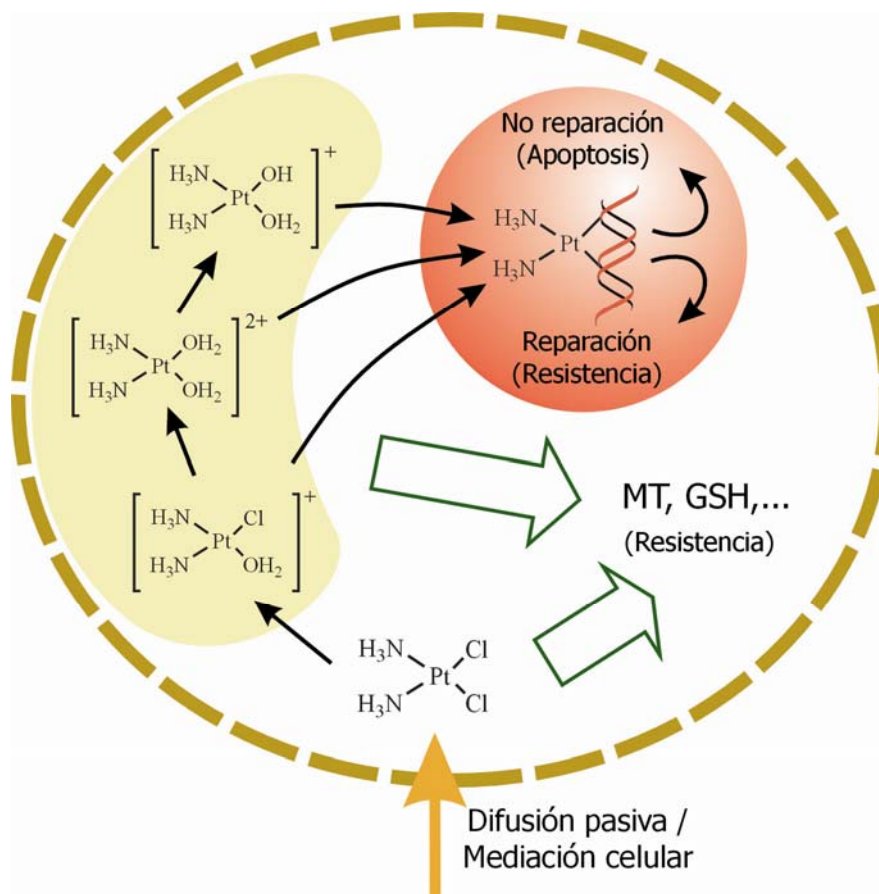


Figura 14. Esquema sobre la interacción del cisplatino en el interior celular

Concretamente, la interacción del cisplatino con el ADN se realiza a través de los nitrógenos de las bases nitrogenadas, y en mayor medida con aquellos que no intervienen en la formación de puentes de hidrógeno entre bases¹. Por ello, los nitrógenos N-7 de la guanina (G) y adenina (A), son los que presentan mayor afinidad por el fármaco (Figura 15). Los aductos covalentes mono y bifuncionales resultantes producen lesiones que afectan a la replicación del ADN. Algunas de las evidencias que corroboran este hecho son la inhibición de la replicación del ADN o la inducción de sus enzimas reparadoras. Dentro de los aductos bifuncionales se pueden dar puentes interhebra o puentes intrahebra, siendo estos últimos los más comunes (Figura 16). El cisplatino también puede formar puentes entre el ADN y proteínas intracelulares, aunque estos aductos platinados son igualmente minoritarios.

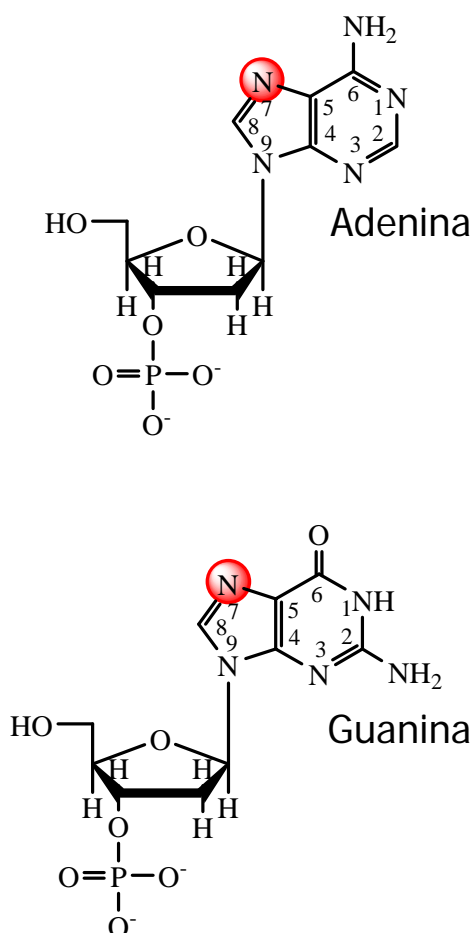


Figura 15. Detalle de los nitrógenos N-7 pertenecientes a adenina y guanina en la cadena de ADN

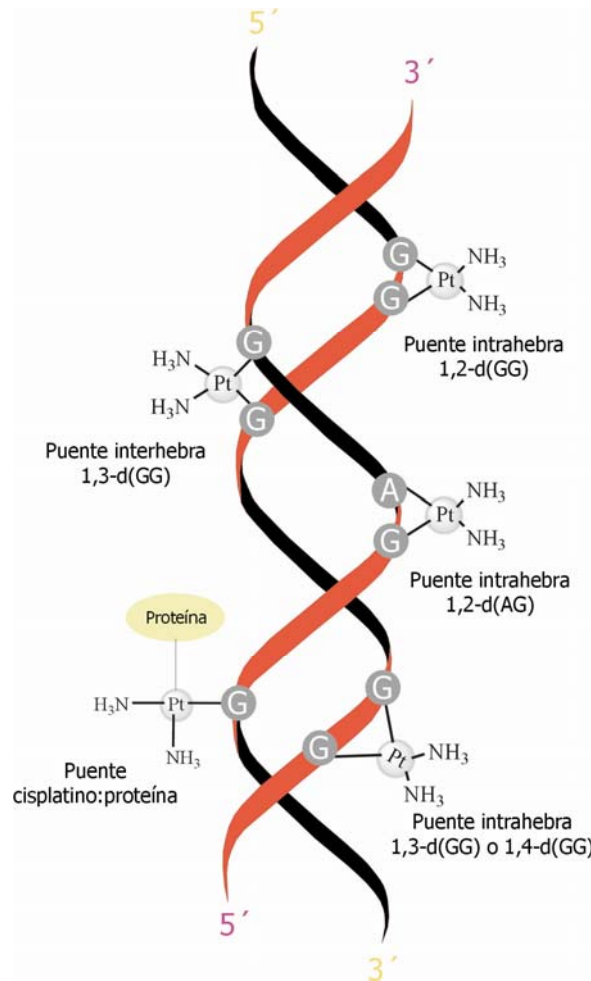


Figura 16. Aductos bifuncionales más comunes en la interacción del cisplatino con el ADN

Algunos trabajos basados en técnicas elementales han estudiado los aductos del cisplatino con oligonucleótidos del ADN¹²⁰ e incluso aductos cisplatino:ADN inducidos en células de la llamada mosca del vinagre¹²¹.

Como se ha mencionado anteriormente, la célula se compone de un gran número de biomoléculas susceptibles de interactuar con el fármaco además del ADN. Estos ligandos biológicos, en su mayoría presentes en el citoplasma celular, pueden ser:

- Aniones fosfato o carboxilato
- Aminoácidos sulfurados como cisteína (Cys) y metionina (Met)
- Oligopéptidos como el glutatión (Glu-Cys-Gly, GSH). La concentración de GSH en la célula es muy elevada, del orden de mmoles L^{-1} . Las bombas dependientes de ATP podrían ser capaces de reconocer estos aductos y expulsarlos de la célula en lo que podríamos denominar mecanismo de detoxificación y que podría ser responsable de las resistencias al fármaco.
- Metalotioneína (MT). Esta proteína es rica en restos cisteínicos y por lo tanto tiene múltiples potenciales puntos de unión con el cisplatino.
- Otras proteínas globulares pertenecientes al citoesqueleto celular como la actina G, la actina F o la tubulina.

La interacción de estos bioligandos citoplasmáticos con el fármaco platinado, puede reducir drásticamente la cantidad de fármaco disponible para interactuar con el ADN, provocando una disminución paralela de su citotoxicidad. Además estos procesos pueden estar relacionados con el desarrollo de resistencia de ciertos tumores y con las distintas toxicidades provocadas por estos fármacos. Por ello, es de suma importancia el estudio de las interacciones de estos fármacos con posibles bioligandos citoplasmáticos. Entre los más destacados se encuentran aquellos bioligandos que contienen grupos tiol, como GSH o MTs¹²². Se ha demostrado que un aumento en la expresión del gen de la MT es capaz de incrementar la resistencia al cisplatino y reducir considerablemente su nefrotoxicidad¹²³. Por el contrario, se ha descrito una disminución de la resistencia celular al fármaco y un aumento de la citotoxicidad al reducir la cantidad de GSH citoplasmático²².

Los procesos de resistencia celular a estos fármacos antitumorales no están sólo relacionados con la interacción del fármaco con bioligandos celulares. Los mecanismos postulados sobre la resistencia celular a estos fármacos se detallan a continuación¹²⁴:

- Disminución de la acumulación intracelular. Si el fármaco no puede acumularse en la célula, no podrá alcanzar el ADN y por tanto no efectuará su acción citotóxica¹²⁵. Aunque no se conocen en profundidad, existen mecanismos por los cuales la célula es capaz de regular la entrada del fármaco a su interior¹²⁶.

- Secuestro y eliminación de los fármacos en el interior celular mediante macromoléculas con azufre. Los mencionados bioligandos con azufre tienen la capacidad de capturar, inactivar y/o eliminar de la célula los complejos platinados.
- Incremento de la reparación del ADN. La célula puede incrementar su capacidad para eliminar los aductos fármaco:ADN y reparar las lesiones inducidas en el ADN mediante ciertas proteínas reparadoras¹²⁶.

A.3.5.1. Interacción de los fármacos de Pt con MT

Las metalotioneínas (MTs) fueron aisladas por primera vez en el año 1957 por Margoshes *et al.*¹²⁷. Su descubrimiento fue consecuencia del estudio de la acumulación natural de Cd en la corteza renal equina. Desde entonces se han descubierto otras proteínas similares derivadas de distintas especies biológicas y que conforman la superfamilia de las MTs. Todas ellas presentan una serie de características comunes como son:

- Proteínas de bajo peso molecular (6000-7000 Da)
- Elevado número de cisteínas
- Ausencia de aminoácidos aromáticos y de histidinas
- Elevado contenido en metales (Cd, Zn, Cu, Hg)
- Ausencia de puentes disulfuro en estado natural
- Termoestable hasta 70°C
- Los principales inductores de su expresión son el Cd y el Zn

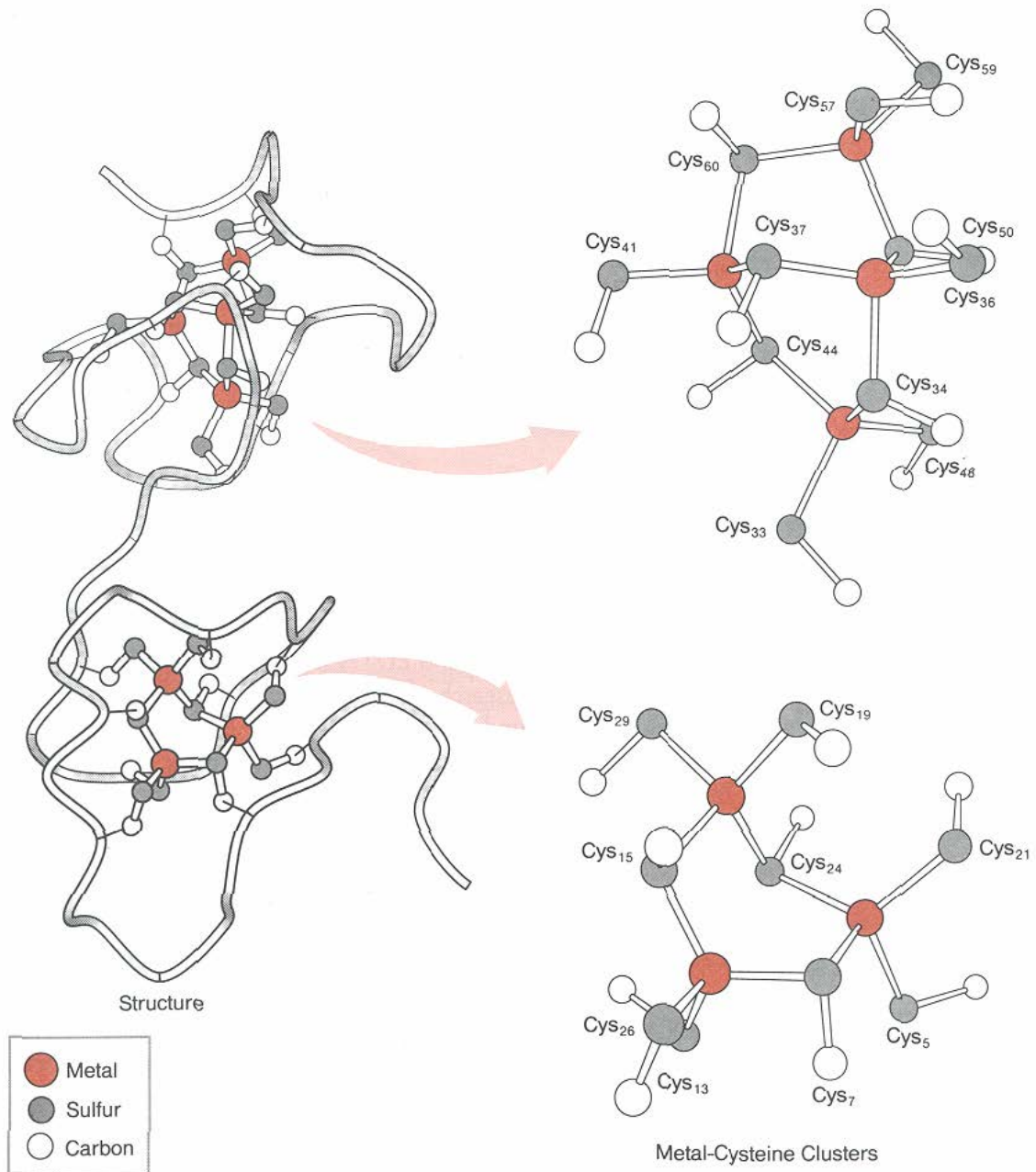
El elevado número de residuos cisteína que poseen las *apo*-MTs (MTs sin metales) les permite complejar un cierto número de metales formando estructuras de *cluster* metal-tiolato. Los 20 residuos cisteína presentes en las *apo*-MTs suponen alrededor de un 30% de los aminoácidos presentes en estas pequeñas proteínas. Concretamente en mamíferos, 14 de las 20 cisteínas se disponen como Cys-X-Cys, aunque también pueden encontrarse configuraciones Cys-Cys o Cys-X-Y-Cys. Todas las cisteínas presentes en la cadena se encuentran en estado reducido predominando el

enlace metálico sobre la formación de puentes disulfuro. La presencia de estos ligandos tiol (-SH) explica la capacidad para unir iones blandos como Cd, Zn, Cu, o Hg. De esta manera, el polipéptido se entrecruza creando una envoltura hidrofílica con núcleo metálico. Las MTs son capaces de unir metales de los grupos 11 y 12 de la tabla periódica, en un dominio simple (levaduras y hongos) o en dos dominios (mamíferos y crustáceos)¹²⁸. En la Figura 17 se representan las uniones de una *apo*-MT de mamífero con 7 átomos metálicos¹²⁹, observándose los *clusters* metal-tiolato M_4S_{11} y M_3S_9 , en los dominios α y β respectivamente. El esquema de esta figura puede aplicarse a Zn, Cd o Hg ya que cada MT puede coordinarse con 7 átomos de estos metales. Por el contrario, el Cu puede coordinarse en una estequiometría metal:proteína 12:1.

La fuerza relativa de los enlaces metal-tiolato para los distintos metales implicados se ordena de la siguiente manera: Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^+ > Cd^{2+} > Zn^{2+} . Por este motivo, el Zn puede verse fácilmente desplazado por un gran número de metales, siendo éste el camino empleado por la MT para coordinar metales potencialmente tóxicos y detoxificar así la célula ante una posible contaminación.

El Pt no pertenece a los grupos 11 o 12 de la tabla periódica, sin embargo se ha constatado que es capaz de coordinarse con la MT. Ciertos estudios demuestran mediante SEC-ICP-MS el desplazamiento que sufre el Zn en presencia de cisplatino, mientras que el Cd permanece ligado a la proteína¹³⁰. Hagrman *et al.*¹¹⁷ por su parte, observaron mediante SEC con detección AAS que no sólo el Zn se desplaza, sino que también el Cd propio de la MT se pierde en presencia de cisplatino. La contradicción entre ambos resultados pudiera deberse a las distintas proporciones cisplatino:MT utilizadas, así como al pH de los análisis realizados. Análisis llevados a cabo mediante ESI-MS¹³¹ constatan la influencia del pH del medio en el enlace de Zn y Cd con las distintas clases de MTs.

Sobre la estequiometría y los sitios de enlace en los aductos cisplatino:MT, existen igualmente discrepancias entre los distintos trabajos publicados. Se han identificado mediante nanoESI-MS aductos Cd_4-Pt_n -MT ($n = 1-7$) a pH neutro incubando cisplatino y MT en exceso del fármaco¹³⁰. De la misma manera, empleando un exceso de cisplatino se ha observado la unión de hasta 10 moléculas de fármaco por cada una de MT¹³². Atendiendo al número de átomos de Pt capaz de unir la MT, parece que no sólo los residuos cisteína intervienen en la unión de los complejos de Pt. Según los resultados obtenidos mediante SEC-UV¹¹⁷, ocurren diversas reacciones en la incubación de



Amino acid sequence

CH₃CONH–Met Asp Pro Asn **Cys** Ser **Cys** Ala Thr Asp Gly Ser **Cys** Ser **Cys** Ala Gly Ser **Cys** Lys **Cys** Lys Gln **Cys** Lys **Cys**
 Thr Ser Cys Lys-Lys Ser **Cys** **Cys** Ser **Cys** **Cys** Pro Val Gly **Cys** Ala Lys **Cys** Ser Gln Gly **Cys** Ile **Cys** Lys Glu Ala Ser Asp Lys
Cys Ser **Cys** **Cys** Ala-COO⁻

Figura 17. Esquema de la interacción de una MT con 7 átomos metálicos formando diversos clusters tetrahédricos metal-tiolato¹²⁹

cisplatino con MT. De estas reacciones sucesivas la primera de ellas parece no conducir a la formación de enlaces Pt-S ya que no se ve alterada la absorbancia correspondiente a estos grupos. En un trabajo anterior Palumaa *et al.*¹³³ describen ligandos N y O dadores que intervienen en el enlace del Pt. Por lo tanto, existen evidencias que indican la implicación de sitios de enlace distintos a los tioles cisteínicos en la interacción de la MT con complejos de Pt. Pocas referencias hay acerca de la especie de cisplatino que se une a la MT. Pattanaik *et al.*¹³² sugieren en sus estudios estructurales por difracción de Rayos X que el cisplatino pierde los dos grupos amino además de sus grupos salientes, indicando esto la presencia de 4 azufres en la primera esfera de coordinación del Pt.

La cinética de la interacción cisplatino:MT también fue estudiada por Hagrman *et al.*¹¹⁷. En condiciones de exceso de cisplatino frente a MT se observan reacciones de primer o segundo orden para el cisplatino. Según las constantes de velocidad calculadas para la reacción de Cd, Zn o cisplatino con MT, el fármaco es capaz de desplazar tanto al Zn como al Cd.

Los trabajos publicados en referencia a los aductos cisplatino:MT, ofrecen pinceladas de las características de esta interacción y en muchos casos aportan información contradictoria. Además, los experimentos desarrollados en este campo se limitan al análisis de aductos procedentes de incubaciones de patrones que en la mayoría de las ocasiones se realizan en proporciones fármaco:MT que no corresponden a las que se encuentran en tejidos de pacientes sometidos a terapias antitumorales. Para llevar a cabo una caracterización más completa de estos aductos, los retos que se plantean pasan por el análisis en medios y concentraciones fisiológicas, así como el trabajo con muestras reales, la extensión de estos estudios a otros fármacos antitumorales basados en Pt y la consideración de las distintas formas químicas a las que pudieran evolucionar los fármacos.

A.3.5.2. Interacción de los fármacos de Pt con GSH

El glutati6n (GSH) es un trip6ptido que se encuentra en el citosol celular en concentraciones de mmoles L⁻¹. Est6 compuesto por los amino6cidos Glu-Cys-Gly y ha sido relacionado con procesos de inducci6n de resistencia celular frente al tratamiento con diversos fármacos antitumorales de Pt como cisplatino^{22,134}, carboplatino e incluso

fármacos polinucleares de Pt de nueva generación¹³⁵, aunque en este último caso en menor medida debido a la muy favorable interacción del fármaco con el ADN.

La interacción de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino con GSH, ha sido estudiada en mayor profundidad que la interacción con MTs. Recientes trabajos acerca de la cinética de la reacción entre estos tres fármacos con el GSH, desvelan que la interacción del cisplatino es más intensa que la de los otros dos fármacos¹³⁶. A pesar de ello, las velocidades de reacción en las primeras etapas, son similares para cisplatino y oxaliplatino, siendo hasta 5 veces mayores que para carboplatino. Las reacciones son de primer orden para los tres fármacos según los resultados obtenidos mediante HPLC-UV monitorizando la formación del enlace Pt-S. Cabe destacar de este trabajo la simulación de las condiciones fisiológicas de pH, temperatura y contenido salino, así como el empleo de relaciones molares cercanas a las que se pueden alcanzar *in vivo*. Igualmente, Dabrowiak *et al.*¹³⁷ también llevaron a cabo sus experimentos sobre la cinética de reacción del cisplatino con GSH en condiciones fisiológicas. Confirmaron mediante HPLC-UV y AAS que la reacción del GSH con cisplatino es de primer orden y concluyeron que la relativa baja velocidad de la reacción está de acuerdo con la eficiente platinación del ADN en presencia de concentraciones citosólicas de GSH del orden de mmoles L^{-1} . Un dato de sumo interés ofrecido en este trabajo es el de la velocidad de reacción de la especie monohidratada del cisplatino, que al pH 7.4 de las incubaciones resulta estar en su forma hidroxilada. Esta especie muestra reacciones mucho más lentas que el fármaco intacto.

Los aductos fármaco:GSH tienen un peso molecular muy inferior al de las MTs, lo que les hace, a priori, más fácilmente caracterizables mediante técnicas estructurales de masas. De esta manera, algunos autores ya han propuesto estructuras para ciertos aductos cisplatino:GSH¹³⁸ detectados mediante ESI-MS (Figura 18), donde dos moléculas de fármaco se unen con una o dos moléculas de GSH a través de sus grupos tiol. Sin embargo, se trata de incubaciones acuosas en medios no fisiológicos y en relaciones molares 1:1, muy alejadas de las proporciones que se alcanzan en la realidad. Además el fármaco que se pone en contacto con el GSH es la forma diacu compleja y no el fármaco intacto. Como hemos mencionado anteriormente este complejo dihidratado no se forma en cantidades significativas en el organismo y por tanto los aductos con GSH formados a partir de él pueden no responder a especies que se formen *in vivo*.

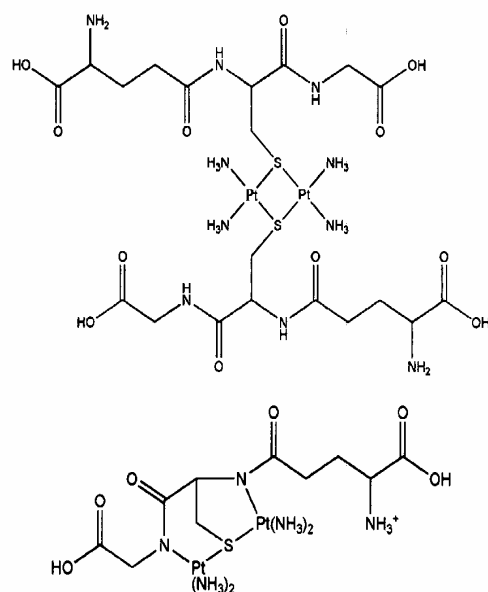


Figura 18. Estructuras propuestas para los aductos cisplatino:GSH identificados mediante ESI-MS¹³⁸

Quizás debido a estas discrepancias entre ensayos *in vitro* e *in vivo*, Bernareggi *et al.*¹³⁹ no consiguieron identificar en las muestras reales lo que sí consiguieron caracterizar en incubaciones 1:1 de cisplatino con GSH a 37°C y pH 7,4. El espectro MS² del aducto cisplatino:GSH detectado por LC-MS de triple cuadrupolo está representado en la Figura 19. Esta estructura difiere sustancialmente de las propuestas por Miao *et al.*¹³⁸ y ponen de manifiesto la necesidad de trabajos que pongan especial atención en el diseño de ensayos *in vitro* en condiciones tales de concentración, salinidad, temperatura, etc, que aporten información real sobre estos aductos y sirvan para su posterior aplicación a muestras procedentes de ensayos *in vivo*.

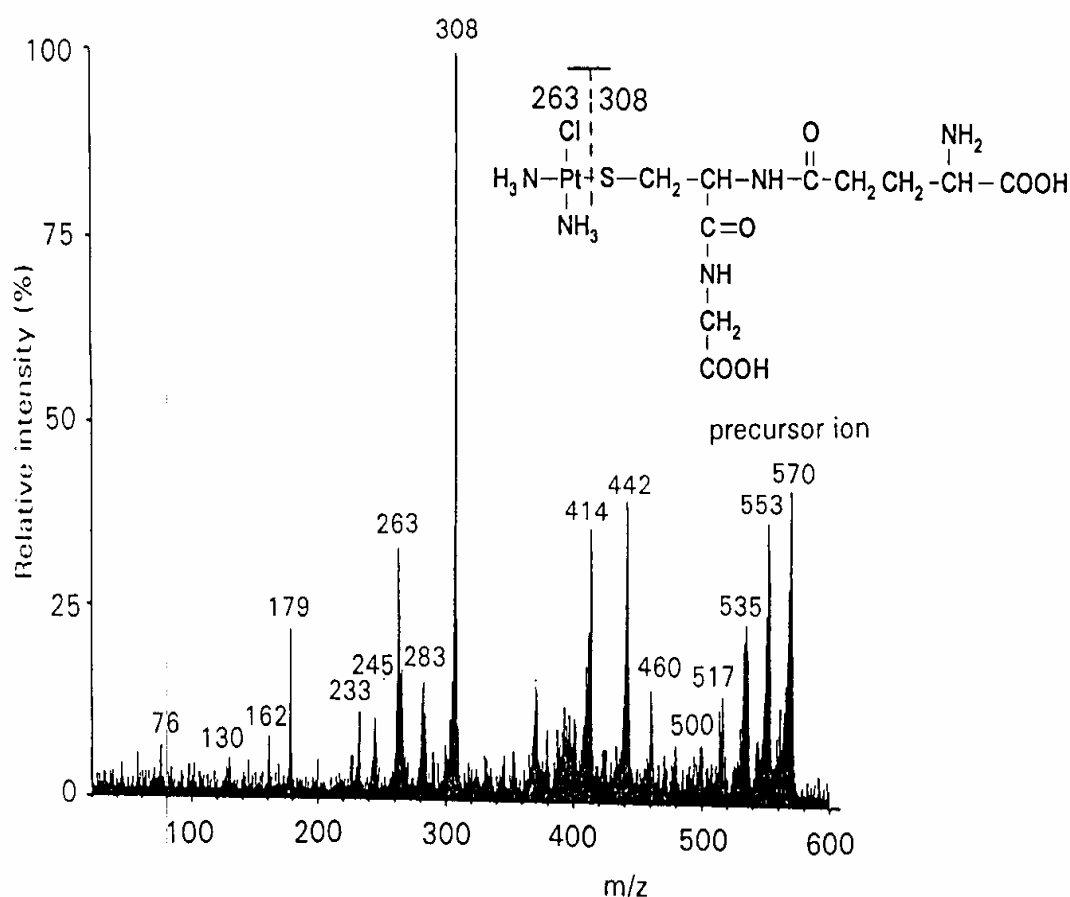


Figura 19. Espectro MS^2 y estructura propuesta para el aducto cisplatino:GSH con m/z 570¹³⁹

A.3.5.3. Interacción de los fármacos de Pt con otras biomoléculas celulares

Sin duda la MT y el GSH, son dos de los bioligandos celulares de mayor interés y que más ampliamente se han estudiado debido a los procesos en los que se cree están involucrados. Sin embargo, existen multitud de potenciales bioligandos en el interior celular que permanecen aún inexplorados. Aunque escasos, los trabajos referentes a estos otros potenciales ligandos son extremadamente interesantes y aportan nueva información sobre el comportamiento de los fármacos en el interior celular.

Tradicionalmente los grupos que contienen azufre se han considerado como los sitios preferentes de unión de los fármacos basados en Pt. Tal es el caso del aminoácido metionina¹⁴⁰. Sin embargo, existen trabajos que evidencian la existencia de otros potenciales sitios de enlace como son los O y N dadores de electrones. El estudio

mediante difracción de Rayos X de la interacción de la superoxodismutasa procedente de eritrocito bovino (beSOD) con un exceso de 10 veces de cisplatino¹⁴¹, presenta al N de la histidina 19 como el sitio preferencial de unión del fármaco frente a residuos Met o Cys, los cuales pueden estar involucrados en la formación de puentes disulfuro o impedidos estéricamente. Miao *et al.*¹³⁸ también ponen de manifiesto la participación de N dadores en la interacción de varios péptidos que contienen azufre con el diacuo complejo del cisplatino. El aducto formado con el péptido Met-Arg-Phe-Ala es el resultado de la ciclación de éste por interacción del derivado del fármaco con su N terminal y el S de la Met. Por otro lado, el péptido Ac-Met-Ala-Ser enlaza el diacuo complejo del cisplatino a través del S de la Met y del N desprotonado de la amida cercana al acetato (Ac).

Una nueva e innovadora estrategia para abordar el estudio de los sitios de unión de los fármacos basados en Pt, se plantea en el trabajo de Yang *et al.*¹⁴² a través del análisis de los fragmentos protéicos resultantes de la interacción del carboplatino con el citocromo C. A pesar del gran exceso de fármaco, la estequiometría fármaco:proteína que se observa en los aductos resultantes es 1:1 y 1:2 a pH 5,0 y 37°C, y únicamente 1:1 en condiciones de pH 7.0 y 37°C, más cercanas a las fisiológicas. Sin embargo, la conclusión más interesante de este trabajo es la observación de que el carboplatino induce la ruptura del citocromo C en condiciones ácidas y elevada temperatura (pH 2,5 y 50°C). El análisis por ESI-MS de los fragmentos del aducto carboplatino:citocromo C, permite identificar de manera más sencilla los puntos de unión del fármaco, que en este caso resultan ser las metioninas 65 y 80.

A.3.5.4. Interacción de los fármacos de Pt en muestras reales

Los estudios hasta ahora mencionados acerca de la interacción de complejos de Pt con potenciales bioligandos del interior celular, han hecho uso de reactivos patrón en distintas condiciones de incubación. Aunque necesarios, estos trabajos deben avanzar hacia su aplicación en muestras reales con el objeto de confirmar con ensayos *in vivo* las hipótesis planteadas *in vitro*. Como se ha visto en el caso de la sangre o la orina, el análisis de estas matrices reales de complejidad no muy elevada, puede abordarse sin grandes dificultades gracias a los conocimientos sobre tratamiento de muestra y a las técnicas analíticas de las que se dispone. Sin embargo, muestras celulares

pertenecientes a tejidos de organismos vivos presentan una mayor complejidad y suponen un nuevo desafío. Por esta razón, los trabajos publicados que analizan estas matrices son tan escasos. Existen especies metal:biomolécula tales como los que contienen Se, que han permitido iniciar el camino del análisis *in vivo*. El enlace covalente entre el Se y las biomoléculas con las que interacciona, facilita notablemente el tratamiento de muestra y el análisis de dichas especies¹⁴³⁻¹⁴⁵. También se han publicado recientemente trabajos de metalómica con As¹⁴⁶, Hg¹⁴⁷ y otros metales¹⁴⁸. Sin embargo, el estudio *in vivo* de los aductos Pt:biomolécula es un territorio poco explorado, y el desconocimiento de la naturaleza de sus enlaces añade un factor más de complejidad al análisis.

Pioneros en este campo son Allardyce *et al.*¹¹³, que identificaron proteínas de membrana externa en una zona electroforética rica en Pt, pudiendo estar involucradas éstas en la toma de cisplatino por parte de la célula. Para ello administraron cisplatino a células de *Escherichia coli* e hicieron una separación parcial de las proteínas de la muestra mediante SDS-PAGE. Finalmente se midió el contenido de Pt en cada banda mediante ablación láser ICP-MS (LA-ICP-MS). Aplicando técnicas de electroforesis en gel en dos dimensiones (2D SDS-PAGE) y MALDI-TOF, Coling *et al.*¹⁴⁹ publicaron recientemente la alteración en la expresión de hasta 22 proteínas de la cóclea comparando ratas tratadas con cisplatino y ratas control. Este trabajo viene a cubrir el vacío existente en el estudio metalómico de la ototoxicidad, una toxicidad no mortal provocada por el cisplatino pero que afecta a un 36% de los pacientes^{6,150} tratados con estos fármacos.

A.4. Metodología analítica para el análisis bioinorgánico

El estudio de los mecanismos de acción de los fármacos anticancerígenos de Pt ha requerido esfuerzos multidisciplinarios de áreas de la ciencia tales como la Biología, la Bioquímica, la Medicina y por supuesto de la Química. En las últimas décadas han sido muchas las nuevas tendencias que han ayudado a orientar las investigaciones sobre las interacciones de estos fármacos antitumorales en el organismo. Concretamente, la Química Analítica ha contribuido decisivamente a la investigación de estos fármacos, y en general a todos los estudios de especiación bioinorgánica, a través del desarrollo de nuevas técnicas y metodologías cada vez más versátiles, sensibles, rápidas, selectivas y sencillas. Hoy en día, no sólo se dispone de herramientas para el análisis de contenidos totales de hetero-átomos en muestras diversas, sino que se puede obtener información sobre la cantidad e identidad de las distintas especies biológicas minoritarias que contienen dichos hetero-átomos y que se encuentran en matrices biológicas de elevada complejidad.

Paralelamente al desarrollo de estas nuevas y potentes herramientas de análisis, y también gracias a ellas, se han abierto nuevos campos aún inexplorados y que han sido objeto, en primer lugar, de una labor de definición y clasificación dentro de las distintas categorías de la ciencia¹⁵¹. Según la IUPAC, la especiación de un elemento se define como la distribución de un elemento entre especies químicas definidas dentro de un sistema, implicando su análisis cualquier actividad analítica encaminada a identificar y/o medir cantidades de una o más especies químicas de la muestra¹⁵². Tomando en consideración esta definición, pero aplicándola a metalo-biomoléculas, la metalómica¹⁵³ podría definirse como el análisis de las especies que contienen un metal o metaloide dentro de un tejido o célula. Este término fue propuesto por Haraguchi y Matsura¹⁵⁴ para dotar a este campo de una entidad científica comparable a la de la proteómica y genómica. El estudio de la interacción de los fármacos antitumorales de Pt con biomoléculas presentes en el organismo, es decir la especiación bioinorgánica del Pt, podría englobarse dentro de la mencionada metalómica. En la Tabla 1 se recogen los principales conceptos y términos empleados en el análisis bioinorgánico.

Tabla 1. Términos y conceptos usados en la especiación bioinorgánica

Término	Definición
Especiación	Distribución de un elemento en especies químicas definidas dentro de un sistema
Análisis de especiación	Cualquier actividad analítica encaminada a identificar y/o cuantificar una o más especies químicas individuales de la muestra
Fraccionamiento	Separación de un analito o grupo de analitos de una muestra de acuerdo con sus propiedades químicas o físicas
Metaloma	Conjunto de las especies que contienen un metal o metaloide en una célula o tejido
Metalómica ¹⁵³	Estudio cualitativo y/o cuantitativo del metaloma
Proteoma	Conjunto de proteínas expresadas a partir de la información contenida en un genoma en un lugar y en unas circunstancias específicas
Proteómica	Estudio del proteoma de un organismo
Metaloproteoma ¹⁵⁵	Conjunto de proteínas asociadas a compuestos metálicos
Fosfoproteoma	La parte del proteoma modificada por fosforilación
Selenoproteoma	La parte del proteoma que incorpora selenoaminoácidos, selenocisteína y selenometionina
Proteómica con marcaje de hetero-átomos	Estudio del proteoma en el que la información analítica se adquiere mediante espectrometría de masas elemental, bien por la presencia natural de hetero-átomos (S, Se, P, I) en las proteínas, o su introducción mediante marcaje (derivatización)
Metaboloma	Conjunto de compuestos químicos que se encuentran en las células, producidos como resultado de reacciones, tanto espontáneas como catalizadas por enzimas
Genoma	Conjunto de genes de un organismo dado
Genómica	Estudio del genoma de un organismo
Ionoma	Contenido de metales libres en una célula

La metodología analítica para el análisis bioinorgánico ha evolucionado, sin duda, gracias al desarrollo instrumental para el análisis elemental y molecular de las especies, y a sus acoplamientos con técnicas de separación que cada vez son más variadas y resolutivas. A pesar de ello, no se debe dejar de prestar atención a una etapa clave en cualquier metodología analítica, la preparación de muestra. Esta etapa suele ser la gran olvidada y sin embargo, de su correcta ejecución depende en gran medida el éxito del análisis planteado. En el caso del análisis bioinorgánico, las técnicas aplicadas en la preparación de muestra han sido adoptadas de la bioquímica o de disciplinas como la proteómica. El factor diferenciador que se introduce en la bioinorgánica es la presencia de un hetero-átomo, como puede ser un metal o metaloide, el cual se encuentra interaccionando con una biomolécula de manera más o menos intensa y que será el objeto del análisis. Preservar esta unión condicionará todos y cada uno de los pasos en la preparación de muestra y más allá, en el posterior análisis.

A.4.1. Preparación de muestra

El análisis del contenido total de un metal en muestras biológicas no suele presentar grandes dificultades dada la gran sensibilidad de las técnicas de las que hoy en día se dispone para el análisis elemental (por ejemplo ICP-MS) y los depurados métodos de digestión y mineralización que ponen en disolución el metal de interés y eliminan la matriz de la muestra de una manera eficaz. Sin embargo, trabajar con matrices biológicas puede acarrear ciertos inconvenientes como la heterogeneidad propia de los sistemas biológicos o la reducida cantidad de muestra de la que se dispone. En ocasiones la compleja preparación de la muestra también puede conducir a una baja reproducibilidad.

La preparación de la muestra para estudiar el contenido total de un metal en fracciones celulares o de fluidos biológicos, conlleva etapas de fraccionamiento que pueden llevarse a cabo mediante procesos como la *ultracentrifugación* y/o la *ultrafiltración*. Cada muestra precisa de un cuidadoso estudio sobre las distintas velocidades de centrifugación o el tamaño de los filtros de corte a emplear, así como de las sucesivas etapas de lavado que nos permiten recuperar cuantitativamente y de manera reproducible las especies de interés.

Por el contrario, cuando se quieren analizar las especies que forma un metal o metaloide con las distintas biomoléculas presentes en la muestra, aparecen dificultades adicionales como:

- La escasa concentración del metal
- Las posibles biotransformaciones de las especies debido a un tratamiento de muestra demasiado agresivo, al almacenamiento a temperaturas o tiempos demasiado elevados, o a la interacción con moléculas presentes en las distintas etapas del proceso analítico.
- La ruptura de la unión metal-biomolécula, tanto en los distintos tratamientos de la muestra, como en el análisis por distintas técnicas analíticas.

La especiación precisa de una separación previa, por lo que la concentración del metal a detectar en cada especie es notablemente más baja. Además, la detección de las especies separadas puede que no sea igual de sensible debido al medio en el que se encuentran tras la separación. Otros problemas de sensibilidad derivan del uso de más de una dimensión en las separaciones y purificaciones de las especies de interés, o del empleo de técnicas estructurales de espectrometría de masas que tienen una sensibilidad muy inferior a las técnicas elementales. Por ello, es necesario en muchas ocasiones el empleo de técnicas de preconcentración, así como el acoplamiento en línea, no sólo de las técnicas de separación y detección, sino también de las distintas dimensiones empleadas en la separación. Entre las distintas maneras de preconcentrar la muestra cabe destacar la *evaporación*, la *liofilización* o la *ultrafiltración*. También se puede recurrir a preconcentraciones en línea como la preconcentración en cabeza de columna, también llamada *focalización*, muy recomendable para preservar la especie a analizar y minimizar las pérdidas derivadas de la excesiva manipulación de la muestra.

Como consecuencia de la necesaria etapa de preconcentración, el contenido salino de las muestras también puede aumentar y suele ser incompatible con muchas de las técnicas de ionización empleadas en la elucidación estructural, tales como ESI o MALDI. Por ello es frecuente el empleo de una etapa de desalado de la muestra. Habitualmente existen varios métodos para desalar este tipo de muestras, como son la *diálisis*, la *ultrafiltración* o los *cartuchos con fase estacionaria*.

El tamaño del poro de las bolsas de diálisis o el tamaño de corte de los filtros para ultrafiltración limitan en gran medida el empleo de estas dos técnicas en el análisis de biomoléculas de bajo peso molecular (por debajo de 3500 Da). Por el contrario, la ultrafiltración puede aplicarse para la limpieza de muestras con biomoléculas de alto peso molecular que puedan interferir en el posterior análisis. Los cartuchos de fase inversa son muy adecuados para purificar y preconcentrar biomoléculas de bajo peso molecular como péptidos o proteínas pequeñas. Al igual que en el caso de los métodos de fraccionamiento, es necesario el estudio individualizado de cada muestra para evaluar posibles pérdidas por interacción irreversible de la biomolécula con la fase estacionaria. A pequeña escala estas fases estacionarias pueden ser incorporadas a puntas de micropipeta (ZipTip) para desalar pequeñas cantidades de muestras que posteriormente serán analizadas por técnicas que precisen poco volumen de muestra como aquellas basadas en fuentes de ionización de MALDI o de nanoESI.

El análisis de las especies que forma el metal en el entorno biológico requiere precauciones encaminadas a preservar las bio-especies formadas. Con el fin de evitar transformaciones de especies y alcanzar el máximo rendimiento en el proceso de extracción, cada muestra biológica debe ser estudiada en profundidad¹⁵⁶. Algunos factores a tener en cuenta para extraer especies de muestras como tejidos, fluidos, fracciones celulares, etc, son, trabajar a baja temperatura, en un medio a pH y contenido salino similar al del medio biológico que las contenía y procurando utilizar inhibidores de proteasas para evitar su acción en el caso de que el procedimiento de extracción pueda conducir a la liberación de estas enzimas. Además su inmediato análisis suele ser recomendable ya que su almacenamiento, aun en condiciones de -80°C , puede provocar transformaciones, agregaciones o denaturalizaciones de las especies de interés. En caso contrario, es preciso comprobar la estabilidad de las especies mediante estudios destinados al efecto en distintas condiciones de tiempo y temperatura.

A.4.2. Técnicas instrumentales híbridas para el análisis de especiación bioinorgánica

Desde hace décadas, las herramientas analíticas disponibles para estudios de bioinorgánica han permitido cuantificar metales, medir cinéticas de reacción, separar, aislar y caracterizar especies de interés, etc. Particularmente para el análisis de Pt en muestras biológicas, se han empleado técnicas como la voltamperometría de adsorción/redisolución (AV)¹⁵⁷, resonancia magnética nuclear (NMR)²⁶, difracción de Rayos-X¹⁴¹, dicroísmo circular (CD)⁵⁶, espectroscopía de absorción (AAS)³⁴ y emisión atómica (AES)⁴⁸, activación neutrónica (NAA)¹⁵⁸ y otras técnicas espectroscópicas¹⁵⁹. El inconveniente de la mayoría de estas técnicas es la necesidad de tener muestras muy puras y/o en grandes cantidades (habitualmente del orden de mg), por lo que únicamente pueden ser aplicadas a las especies mayoritarias presentes en las muestras biológicas y tras un importante proceso de purificación¹⁶⁰. Además, la dificultad para acoplar en línea las técnicas de separación y detección, supone un gran inconveniente metodológico que impide la consecución de análisis rápidos, sencillos y sin pérdida de analito. Sin embargo, en multitud de ocasiones el mayor interés de la investigación bioinorgánica se centra en la especiación de biomoléculas minoritarias englobadas en muestras biológicas complejas, requiriéndose técnicas capaces de purificar y detectar trazas o ultratrazas de estas especies en matrices de alta dificultad.

Las recientes mejoras instrumentales en técnicas atómicas, moleculares, y de separación, han permitido abordar este tipo de análisis y han constituido sin duda, el punto de inflexión que ha hecho que la Química Analítica se convierta en protagonista del avance en el conocimiento de este campo. Concretamente, los avances en técnicas electroforéticas y cromatográficas para la purificación y aislamiento de bio-especies a microescala, así como el aumento de la sensibilidad de los detectores elementales selectivos (ICP-MS), han constituido una revolución en los estudios bioinorgánicos¹⁶¹. También cabe destacar el empleo de técnicas de separación de alta resolución que tradicionalmente han sido usadas en la purificación de proteínas como es la 2D SDS-PAGE, y que en estudios de bioinorgánica son de extraordinaria utilidad desde que se dispone de técnicas capaces de extraer información de estos geles electroforéticos. Por último cabe destacar el empleo en análisis bioinorgánico de técnicas moleculares de espectrometría de masas como ESI-MS o MALDI-MS, capaces de aportar información

estructural¹⁶² con el fin de la identificación final de las especies. No se debe olvidar que el acoplamiento entre las mencionadas técnicas de separación y detección, es la clave de su extraordinario potencial para la aplicación a la especiación bioinorgánica. La Figura 20 muestra las principales técnicas híbridas empleadas en este tipo de estudios.

En el Anexo I se muestran las referencias bibliográficas más relevantes relacionadas con los fármacos cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, especificando el tipo de muestra estudiado y la técnica instrumental empleada para llevar a cabo el análisis bioinorgánico.

A.4.2.1. Técnicas de separación

En esta sección se describen brevemente las técnicas de separación más empleadas en el análisis de especiación bioinorgánica. Se prestará especial atención a las características que hacen que estas técnicas sean adecuadas para el análisis de muestras biológicas y se discutirá su idoneidad para acoplarlas a las técnicas de detección más usadas en este campo.

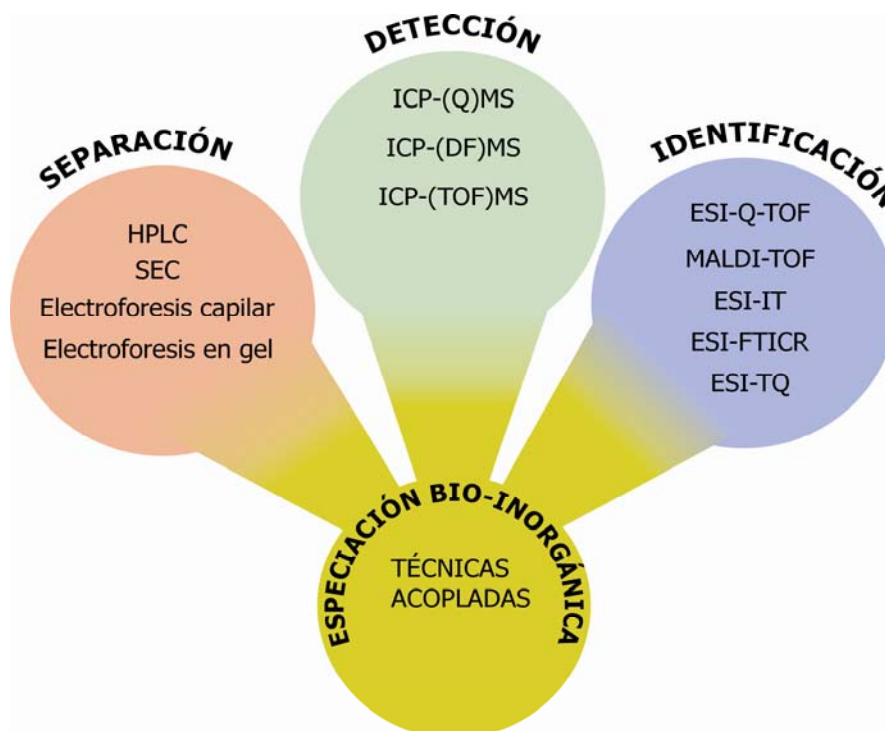


Figura 20. Técnicas híbridas empleadas en los análisis de especiación bioinorgánica

Cromatografía de exclusión por tamaños

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC), se basa en la separación de los analitos de una muestra en función de su tamaño y forma. Estas dos propiedades condicionan el tiempo de residencia del analito en los poros de la fase estacionaria, existiendo habitualmente una relación directa entre el tiempo de retención y el peso molecular del analito. Este mecanismo de separación es adecuado para macromoléculas como proteínas o polisacáridos, sin embargo, las moléculas pequeñas con una relación carga/masa elevada pueden sufrir el efecto de mecanismos secundarios de retención tales como intercambio iónico o adsorción.

Debido a la escasa resolución que suelen presentar estas separaciones, es más adecuado referirse a ellas como procesos de fraccionamiento en vez de procesos cromatográficos. El empleo de esta técnica de separación tiene las siguientes ventajas:

- Alta tolerancia de matrices biológicas de elevada complejidad
- Flujos y fases móviles compatibles con un gran número de técnicas atómicas y moleculares para su acoplamiento en línea
- Posibilidad de evitar el uso de tampones salinos
- Se puede emplear para acondicionar la muestra mediante procesos de desalado o cambio de tampón
- Simplifica la matriz de la muestra eliminando especies o contaminantes de alto y bajo peso molecular
- Aplicable a proteínas lábiles

Su aplicación a muestras biológicas y en concreto a muestras de carácter bioinorgánico, ha sido extensamente documentada. De esta manera, compuestos orgánicos con Se¹⁶³ o As¹⁶⁴ entre otros, han sido separados con esta técnica. Entre sus limitaciones se puede citar la baja resolución⁵³, la dilución de la muestra durante su proceso de fraccionamiento, la participación de mecanismos secundarios de separación o las posibles pérdidas de analitos de la muestra.

Cada una de las fracciones recogidas de una columna SEC puede contener miles de compuestos si se trata de muestras biológicas de elevada complejidad. Por ello, suelen ser necesarias otras técnicas cromatográficas de carácter ortogonal que

complementen la separación¹⁶⁵. Por sus características suele ser empleada como primera dimensión de un proceso cromatográfico multidimensional.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico (IEC), separa los analitos de la muestra de acuerdo con su carga. Se basa en el equilibrio de los iones de la muestra entre la fase móvil y los sitios fijos cargados de la fase estacionaria. En las columnas de intercambio aniónico los grupos con carga positiva están unidos covalentemente a la fase estacionaria y los aniones de la muestra son atraídos hacia ellos. En el caso de intercambio catiónico son los cationes de la muestra los que interaccionan con los sitios de carga negativa presentes en la fase estacionaria. Los parámetros más críticos para optimizar la separación son el pH y la fuerza iónica. Su aplicación a muestras de carácter bioinorgánico ha sido llevada a cabo con éxito en diferentes muestras, como por ejemplo para separar metalotioneínas¹⁶⁶ e incluso isoformas de la transferrina del suero sanguíneo¹⁶⁷, lo cual muestra su notable capacidad de resolución. Entre las ventajas que presenta esta técnica cabe destacar las siguientes:

- Capacidad de separación de muestras complejas
- Alta resolución
- Buena aplicabilidad a proteínas y péptidos
- Puede utilizarse para simplificar la matriz de la muestra por eliminación de especies o contaminantes cargados
- Permite concentrar la muestra en cabeza de columna mediante el empleo de fases móviles con muy baja fuerza iónica

La necesidad de emplear fuertes condiciones ácidas, básicas o salinas para eluir los analitos en un tiempo razonable, es uno de los inconvenientes de esta técnica. El acoplamiento con ICP-MS presenta serios inconvenientes debido a la posible obturación del nebulizador o de los conos, así como a la supresión de la señal por el aporte continuado de concentraciones salinas elevadas. Sin embargo, el empleo de bajas concentraciones salinas o de sales de elevada volatilidad como acetato amónico,

permiten llevar a cabo dicho acoplamiento con las pertinentes precauciones de control del descenso de la sensibilidad.

En un diseño experimental de separación multidimensional, la cromatografía de intercambio aniónico suele ocupar etapas intermedias debido a su buena resolución y a la capacidad para concentrar la muestra.

Cromatografía de fase inversa

La cromatografía de fase inversa (RPC), separa las moléculas de la muestra en función de la hidrofobicidad de las mismas. Tradicionalmente la fase estacionaria se compone de partículas de sílice que tienen unidos covalentemente hidrocarburos de cadena variable ($C_4 - C_{18}$) que aportan hidrofobicidad a la fase. También existen fases estacionarias basadas en polímeros apolares que no aportan una selectividad muy diferente a las fases basadas en sílice pero que permiten trabajar a un pH comprendido entre 2 y 11. Por lo tanto, por encima de pH 7,5 las únicas fases estacionarias inversas que se pueden emplear son las basadas en polímeros. Además, estas fases poliméricas pueden lavarse con bases fuertes, lo que constituye una gran ventaja cuando se trabaja con péptidos o proteínas que pueden ligarse muy fuertemente a la fase estacionaria hidrofóbica. La elución gradual de los analitos retenidos en la fase estacionaria se consigue mediante la disminución de la polaridad de la fase móvil empleando para ello disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. A continuación se citan algunas de las propiedades que hacen de la RPC una técnica adecuada para la separación de muestras biológicas:

- Excelente resolución, lo que la convierte en la técnica ideal para separar especies con diferencias estructurales mínimas como los péptidos obtenidos tras digestión enzimática
- Muy adecuada para la concentración y el desalado de péptidos
- Puede utilizarse para simplificar la matriz de la muestra por eliminación de especies o contaminantes hidrofóbicos

Su aplicación a la separación de proteínas puede presentar más problemas que su uso para el análisis de péptidos. Las proteínas interaccionan de manera más intensa con la fase estacionaria y su elución con eluyentes muy fuertes puede no ser compatible con la estabilidad de la proteína y con el mantenimiento de sus funciones biológicas. Aún así, existen proteínas susceptibles de ser separadas mediante RPC. Por ejemplo, proteínas de bajo peso molecular como las MTs han demostrado ser aptas para este tipo de separaciones¹⁶⁸. De los disolventes orgánicos utilizados en este tipo de cromatografía, el isopropanol y el acetonitrilo son los más recomendados para eluir proteínas, el primero de ellos por su capacidad de preservar estructuras. Por último, cabe destacar que para aplicar la RPC a la separación y/o purificación de proteínas es aconsejable el uso de rellenos con tamaño de poro grande (típicamente 300 Å) para favorecer la transferencia de masa y evitar pérdidas de proteínas por unión de éstas a la fase estacionaria.

Su complementariedad con SEC y IEC hacen de esta técnica una firme candidata a formar parte de separaciones multidimensionales. Además, debido a los componentes que se suelen emplear en las fases móviles para eluir los analitos, la RPC en su versión capilar, es muy adecuada para acoplarla a técnicas de espectrometría de masas como ESI-MS. Su acoplamiento en línea con ICP-MS debe hacerse también con columnas capilares, ya que la cantidad de disolvente orgánico que es capaz de tolerar el plasma es muy pequeña. La utilización de columnas de diámetros normales acopladas a ICP-MS también puede contemplarse siempre y cuando el equipo disponga de elementos como conos de Pt, corriente adicional de oxígeno, unidad de desolvatación o sistema de enfriamiento de la cámara de spray¹⁶⁹.

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad (AC) se fundamenta en la interacción bio-específica de analitos de la muestra por un ligando anclado covalentemente al soporte de la fase estacionaria. Esta especificidad o afinidad, procede de una complementariedad a escala molecular en la que participan fuerzas de enlace débiles de tipo van der Waals, enlace de hidrógeno, hidrofobicidad o interacciones iónicas. Las moléculas que han quedado retenidas en la columna debido a su afinidad por la fase estacionaria se liberan mediante un cambio del medio eluyente que debilite las interacciones analito-ligando. De esta

manera, una variación de pH para cambiar el estado de ionización de las biomoléculas, un cambio en la fuerza iónica, en la polaridad del eluyente o en la temperatura, son las formas más habituales de conseguir eluir el analito retenido. También se puede conseguir eluir el analito retenido desplazándolo con una biomolécula que compita por el ligando de la fase estacionaria o añadiendo un ligando libre de mayor afinidad por el analito que el ligando anclado. Entre las ventajas que presenta la AC se pueden citar las siguientes:

- Técnica de purificación que puede ofrecer purezas superiores al 95% en una sola etapa
- No suele necesitar gradientes de elución, siendo la instrumentación necesaria muy sencilla
- Excelente eliminación de contaminantes específicos o purificación de biomoléculas concretas
- Capacidad de separación de proteínas recombinantes marcadas
- Protocolos de separación muy sencillos.

La dificultad de esta cromatografía radica en encontrar una interacción específica analito-ligando, de tal manera que dicha interacción sea lo suficientemente fuerte como para evitar pérdidas en la etapa de introducción de la muestra, y por otra parte se consiga su total desplazamiento durante la etapa de elución. Se han llevado aplicaciones en el campo de la metalómica empleando AC-ICP-MS, como es el caso de Hinojosa Reyes *et al.*, que realizaron especiación de Se en suero humano¹⁷⁰.

Electroforesis en gel

La electroforesis en gel ha sido utilizada durante muchos años para separar muestras complejas con biomoléculas de elevado peso molecular tales como proteínas o ácidos nucleicos¹⁷¹. Las separaciones se llevan a cabo sobre una capa delgada y plana, o placa, de un gel semisólido y poroso que contiene un tampón acuoso en el interior de sus poros. Las separaciones electroforéticas en gel pueden ser mono- o bi-dimensionales, y se basan en principios tan distintos como el tamaño de la proteína o su punto isoeléctrico. Para su aplicación a la proteómica, y por tanto a la metaloproteómica, las técnicas más

empleadas son la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), la electroforesis por isoelectroenfoque (IEF) y la inmunoelectroforesis. Estas técnicas electroforéticas permiten separar biomoléculas de alto peso molecular con una alta resolución y a una escala micropreparativa. Combinando dos de estas separaciones electroforéticas en una técnica bidimensional se pueden resolver cientos de proteínas en un solo análisis.

El análisis mediante SDS-PAGE viene precedido por un tratamiento de muestra que desnatura las proteínas y las confiere una relación carga/masa uniforme. En primer lugar se rompen los puentes disulfuro con ditioneitol (DTT) o β -mercaptoetanol (BME). Posteriormente, se emplea un detergente aniónico como el SDS para desnaturar las proteínas y dotarlas de una carga negativa proporcional a su masa. Todas las proteínas tratadas se convierten en estructuras abiertas y sin plegamientos con una relación carga/masa similar. La aplicación del campo eléctrico propio del proceso electroforético hará que las proteínas migren únicamente en función de su tamaño, avanzando más lentamente las proteínas de mayor tamaño debido a la mayor resistencia a la migración ofrecida por la matriz del gel de poliacrilamida. De esta manera, se consigue una separación muy reproducible y de alta resolución no dependiente de los plegamientos moleculares propios de cada proteína, pudiéndose calibrar la separación mediante patrones proteicos de distinto peso molecular.

En muchas ocasiones, la SDS-PAGE no es suficiente para resolver proteínas con pesos moleculares muy cercanos. En muestras complejas tales como tejidos, se pueden encontrar muchas proteínas con velocidades de elución similares que no pueden ser resueltas con esta técnica electroforética. Por ello, es necesario emplear separaciones ortogonales que mejoren la resolución electroforética. La técnica más empleada como dimensión electroforética complementaria a la SDS-PAGE es el IEF. Mediante tiras de gel en las que se ha inmovilizado un gradiente de pH, se consiguen separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico. Son escasos los trabajos de metalómica donde se hayan empleado separaciones electroforéticas bidimensionales del tipo SDS-PAGE x IEF^{172,173}. Menos habitual aún es el empleo de una segunda dimensión basada en inmunoelectroforesis¹⁷⁴.

El empleo de agentes desnaturantes o que producen la ruptura de los puentes disulfuro, pueden afectar a las interacciones metal:proteína. Por ello, para su aplicación a metaloproteómica, se debe estudiar la estabilidad del enlace metal:proteína en cada

caso. La separación de proteínas que incorporan algún tipo de hetero-átomo puede llevarse a cabo sin dificultades con los protocolos existentes, siempre y cuando la unión sea de tipo covalente. Los aductos con enlaces no covalentes pueden requerir condiciones no desnaturizantes ya que la presencia de SDS o los campos eléctricos aplicados pueden romper el enlace metal:biomolécula. Una alternativa menos agresiva con la muestra es la electroforesis en gel de las especies nativas, que mantiene intacta la estructura de las proteínas pero alcanza resoluciones mucho más pobres. Una solución de compromiso o intermedia es la que se plantea en ciertos trabajos donde se usan cantidades de SDS tan pequeñas que se trabaja en condiciones no desnaturizantes^{172,175}.

Algunas de las ventajas de las que goza esta técnica separativa para el empleo en estudios bioinorgánicos son las siguientes:

- Alta resolución de muestras biológicas muy complejas
- Técnica semipreparativa que permite extraer o digerir las proteínas separadas de interés con el objeto de su identificación final mediante otras técnicas
- Posibilidad de usar la variante con proteínas nativas que preserva las uniones metal:proteína existentes en la muestra

Por el contrario, se pueden destacar ciertas desventajas claras como la complejidad del análisis, particularmente en la versión de doble dimensión, la imposibilidad de acoplamiento en línea con técnicas de detección o la agresividad del tratamiento de muestra que pone en peligro la unión metal:proteína.

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se basa en la diferente movilidad de especies cargadas y neutras en un medio electroforético contenido en un capilar al que se aplica un campo eléctrico. Entre sus múltiples campos de aplicación se encuentra la especiación bioinorgánica desde hace muchos años¹⁷⁶, si bien hoy en día presenta aún mayor interés gracias a su cada vez más perfeccionado acoplamiento a detectores basados en la espectrometría de masas¹⁷⁷.

La versatilidad de esta técnica se pone de manifiesto en las distintas modalidades de CE que se han desarrollado en función de los compuestos a separar, como por ejemplo la electroforesis capilar en zona (CZE), la cromatografía electrocinética micelar (MECC), la electroforesis de isoelectroenfoque (IEF), la isotacoforesis (ITP) o la electroforesis capilar en gel (CGE). De las citadas modalidades, la CZE es la más ampliamente utilizada en bioinorgánica debido a su versatilidad, simplicidad y compatibilidad con detectores de masas tales como ICP-MS¹⁷⁸ o ESI-MS¹⁷⁷.

Las principales ventajas de esta técnica derivan de la elevada relación superficie / volumen de los capilares empleados en CE, que permite una eficiente disipación del calor generado al aplicar el campo eléctrico. De este modo, se pueden aplicar potenciales de hasta 30 kV, lo que conlleva cortos tiempos de análisis y una excelente eficacia de separación (hasta un millón de platos teóricos). La ausencia de fase estacionaria reduce las pérdidas de analito durante la separación y ayuda a mantener la integridad de las especies separadas, y además la CE es capaz de separar en un solo análisis especies neutras y cargadas¹⁷⁷. Por último cabe destacar la baja cantidad de muestra que se requiere para hacer una separación electroforética. Entre 5 y 50 nL son valores típicos empleados en CE. Este minúsculo volumen supone una ventaja debido a que se precisa de poca muestra para llevar a cabo un análisis. En comparación con la electroforesis en gel convencional, la CE puede ser fácilmente automatizada y acoplada a detectores varios para la realización de análisis cuantitativos y cualitativos.

Las ventajas hasta ahora enumeradas hacen albergar grandes expectativas en esta técnica de separación para su aplicación a la especiación bioinorgánica. Sin embargo, existen otras características de esta técnica que limitan su empleo. Tal es el caso de la sensibilidad, que es de especial interés en muestras biológicas, y que se ve afectada en gran medida por el reducido volumen de muestra analizada y el bajo caudal al que se trabaja. El uso combinado de la CE con detectores de elevada sensibilidad y las mejoras experimentadas en los últimos años en las interfases que intervienen en estos acoplamientos, se vislumbran como soluciones para este problema. Otras desventajas son la falta de reproducibilidad en los tiempos de migración, también debido a la pequeña cantidad de muestra analizada, la posible inestabilidad de las especies analizadas como consecuencia de la interacción con los tampones y aditivos, y la pérdida de analito en las paredes del capilar¹⁷⁹.

A.4.2.2. Técnicas de detección

Técnicas elementales (ICP-MS)

El empleo del ICP-MS como detector selectivo elemental ha supuesto una revolución en diversos campos, entre ellos en la especiación bioinorgánica. Su carácter multi-elemental y su elevada sensibilidad, son las características más destacables de este detector de masas¹⁸⁰. La introducción de la muestra puede hacerse por nebulización directa en el caso de que sea líquida, por ablación láser (LA) sobre una muestra sólida o acoplando técnicas de separación tales como GC, LC, SFC o CE. La detección selectiva multi-elemental permite distinguir entre especies de distintos elementos no resueltas completamente por las técnicas cromatográficas o electroforéticas. Dado que el objeto de este apartado no es la descripción minuciosa de la técnica y sus fundamentos, se remite al lector a un excelente libro de texto¹⁸¹ que profundiza en el tema.

Algunas de las desventajas de esta técnica son la presencia de interferencias en la monitorización de ciertos isótopos, la incompatibilidad del plasma con ciertas fases móviles empleadas en las separaciones cromatográficas o el alto costo del instrumento y de su mantenimiento.

Los nuevos desarrollos instrumentales tratan de solucionar estos problemas y aportan nuevas prestaciones para aplicaciones de extrema complejidad como la especiación bioinorgánica. La tecnología de celda de colisión/reacción, es una solución para minimizar las interferencias poliatómicas^{182,183} en instrumentos con analizador cuadrupolar (Q-ICP-MS). Los instrumentos con analizador de alta resolución de doble enfoque (DF-ICP-MS), solucionan en gran medida los problemas de interferencias poliatómicas, isobáricas y de iones doblemente cargados, mediante la medida exacta de la masa. La posibilidad de monitorizar libres de interferencias, isótopos de elementos característicos de biomoléculas como S¹⁸⁴ o P¹⁸⁵, tiene un enorme interés en aplicaciones metalómicas tales como la cuantificación de proteínas. Además estos instrumentos mejoran ostensiblemente la sensibilidad de la detección y por ello son adecuados para su empleo en aplicaciones donde se requiera la medida de ultratrazas o en acoplamientos con separación previa donde la sensibilidad del método se vea comprometida, tal es el caso de la CE-ICP-MS¹⁸⁶. El sistema multicolector en DF-ICP-MS incrementa aún más la sensibilidad de la técnica y aporta una gran ventaja para análisis de especiación ya que

es la única configuración no secuencial y, por tanto, detecta continuamente el eluyente de las separaciones cromatográficas o electroforéticas acopladas. En este sentido el Q-ICP-MS resulta en ocasiones demasiado lento si se pretende medir simultáneamente un gran número de isótopos, pudiéndose perder parte de los picos procedentes de la técnica de separación. Una alternativa de reciente comercialización es el TOF-ICP-MS, que es un instrumento secuencial de mucha mayor rapidez que un Q-ICP-MS y que además presenta una excelente resolución.

El desarrollo de interfases eficaces para el acoplamiento del ICP-MS a técnicas de separación, es sin duda una de las características más atractivas de esta técnica. A continuación se detallan brevemente los acoplamientos más empleados en metalómica entre técnicas de separación e ICP-MS.

HPLC-ICP-MS

Sin lugar a dudas, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es la técnica híbrida más empleada en el estudio de aductos metal:biomolécula y en general en la especiación bioinorgánica. El fácil acoplamiento entre ambas técnicas es uno de sus atractivos. Los nebulizadores empleados en ICP-MS son compatibles con los flujos que habitualmente se emplean en HPLC convencional.

Sus principales inconvenientes están relacionados con la incompatibilidad de la técnica con el uso de ciertas fases móviles comúnmente empleadas en separaciones por cromatografía de líquidos. Tal es el caso de fases móviles con alto contenido en sales o en disolventes orgánicos. El acoplamiento SEC-ICP-MS resulta más adecuado que el IEC-ICP-MS debido al menor contenido salino que habitualmente tienen las fases móviles, si bien ambas son empleadas ampliamente en la bibliografía. El ICP-MS admite concentraciones salinas de hasta 50 mM sin peligro de colapso del plasma u obturación de los conos y/o nebulizador. El empleo de sales de alta volatilidad como el acetato amónico permite elevar las concentraciones salinas hasta al menos 400 mM.

La introducción continuada de elevadas cantidades de disolventes orgánicos afecta de forma negativa a la sensibilidad del equipo e incluso puede llegar a provocar la extinción del plasma. En el acoplamiento RPC-ICP-MS se emplean altas concentraciones de disolventes orgánicos para eluir los analitos. Las soluciones a este problema suponen el uso de sistemas de enfriamiento de la cámara de spray o desolvatadores de membrana para reducir la cantidad de vapor del disolvente que alcanza el plasma.

Además es necesario el empleo de una corriente adicional de oxígeno así como conos de Pt. La cromatografía capilar (flujos entorno a $4 \mu\text{L min}^{-1}$) o nano (flujos entorno a 200 nL min^{-1}), se presentan como alternativa en separaciones ricas en fases orgánicas ya que permiten la introducción directa de hasta un 100% de disolvente orgánico sin el empleo de corriente adicional de oxígeno o enfriamiento de la cámara de spray¹⁸⁷. Sin embargo también en estos casos existe una importante pérdida de sensibilidad en función del porcentaje de modificador orgánico empleado y por lo tanto en separaciones con gradientes se requiere la calibración individualizada de la respuesta¹⁸⁸. Además, la cromatografía capilar y nano presentan otras ventajas en sus diferentes variantes¹⁸⁹, como el reducido volumen de muestra que precisa, característica ésta de extraordinario interés para analizar muestras de biopsias humanas, digeridos de geles bidimensionales, compartimentos de células individuales, etc. Por otra parte, ofrece una excelente resolución y sensibilidad manteniendo la posibilidad de acoplamientos cromatográficos multidimensionales.

Montes-Bayón *et al.*¹⁹⁰ presentan un interesante trabajo donde se recogen las aplicaciones más importantes sobre especiación elemental realizadas con la técnica híbrida HPLC-ICP-MS en muestras de carácter biológico, clínico o medioambiental.

CE-ICP-MS

La inmensa mayoría de las aplicaciones exitosas del acoplamiento CE-ICP-MS se han basado en la interfase desarrollada por Schaumlöffel *et al.*¹⁹¹, aunque otras interfases viables también han sido publicadas^{192,193}. La citada interfase ha solucionado tres problemas fundamentales que aparecen cuando se acopla CE con ICP-MS:

- La introducción eficiente de un flujo nano al ICP-MS mediante un micronebulizador y una cámara de spray con un bajo volumen muerto
- El cierre del circuito eléctrico mediante la inserción de un electrodo
- La prevención del flujo laminar mediante la optimización de la dinámica de fluidos

Las ventajas propias de la CE, tales como tiempos de análisis cortos o alta capacidad de separación, se unen a las que derivan del uso del ICP-MS como detector, resultando una técnica sensible y selectiva. No suponen un problema los tampones y los

modificadores orgánicos utilizados en la CE ya que llegan al plasma en cantidades de nL o μL y por lo tanto no afectan a la estabilidad del plasma¹⁹⁴.

La estabilidad de las especies de la muestra puede verse comprometida por condiciones erróneas en la CE, a saber, electrolitos complejantes o pH inadecuado¹⁹⁵. También son usuales las variaciones en los tiempos de migración debido a interacciones con el capilar e incluso a la fuerza iónica de los tampones. La monitorización de demasiados isótopos cuando se emplea un analizador secuencial tipo cuadrupolo hace que puedan perderse picos electroforéticos por la rápida migración. Por ello, y por la falta de sensibilidad en ciertas aplicaciones con muestras reales, el acoplamiento CE-DF-ICP-MS¹⁹¹ es notablemente ventajoso.

Diversos trabajos publicados en los últimos años sobre la especiación de Se¹⁹⁶, As¹⁹⁷, Hg¹⁹⁸ o metales presentes en MTs^{199,200}, ponen de manifiesto la potencialidad de la CE acoplada con ICP-MS para su aplicación en especiación bioinorgánica. Incluso se encuentran en la bibliografía aplicaciones relacionadas con la separación y detección de especies de Pt mediante CE-ICP-MS^{73,175,201}.

Técnicas estructurales (ESI-MS y MALDI-TOF)

Las técnicas atómicas miden la señal que genera un átomo o un ion elemental. La identificación de las especies que contienen estos átomos se basa en la disponibilidad de patrones que permitan calibrar mediante tiempos de retención o migración, el tiempo que tardan en llegar los analitos a la fuente de ionización. En los análisis de especiación bioinorgánica es imposible en la mayoría de las ocasiones la identificación de las especies de interés mediante el citado método. Por ello, surge la necesidad de técnicas que ofrezcan señales características de las especies y no de los elementos, es decir, se precisa de técnicas que aporten información estructural.

ESI y MALDI son sistemas de ionización de los denominados “blandos”. Preservan la estructura de las biomoléculas y cuidan los enlaces metal-biomolécula objeto de los estudios de metalómica, por lo que son las fuentes de ionización más empleadas²⁰². La Tabla 2 muestra las principales características de estas fuentes de ionización. Los analizadores de masas asociados pueden ser de distinto tipo en función de las necesidades específicas de cada laboratorio. De esta manera, son comunes los

instrumentos MALDI-TOF, MALDI-TOF-TOF, ESI-IT, ESI-Q-IT, ESI-Q-TOF, ESI-FT-ICR o ESI-IT-FT-ICR. La determinación del peso molecular de las biomoléculas o fragmentos de éstas, así como la huella natural que supone su perfil isotópico, son herramientas de inestimable ayuda en la elucidación de la naturaleza de las especies de interés²⁰³.

Tabla 2 Principales características de las fuentes de ionización MALDI y ESI

MALDI	ESI
Generación discreta de iones	Generación continua de iones
Produce iones con carga +1	Genera iones con carga múltiple
Relativamente tolerante con el medio	Poco tolerante con el medio
Cristalización heterogénea	Ionización homogénea
Respuesta no cuantificable	Respuesta cuantificable
Señal dependiente de la masa depositada y de su superficie	Señal dependiente de la concentración

MALDI-TOF es una técnica de amplio uso en proteómica. Las razones de su aplicación en especiación bioinorgánica son su fácil manejo así como la suave ionización que provoca y que preserva en gran medida las uniones metal-biomolécula objeto de estudio. Posee un amplio rango de masas y una elevada resolución para moléculas de peso molecular bajo o medio donde se pueden englobar aminoácidos, péptidos y multitud de biomoléculas. La presencia de sales o detergentes en la muestra depositada en la placa MALDI puede provocar la supresión de la ionización, por lo que se suelen emplear micro-columnas (ZipTip) para el desalado de la muestra. Los instrumentos MALDI-TOF-TOF incorporan un sistema de fragmentación entre los dos analizadores de tiempo de vuelo y por lo tanto son muy adecuados para llevar a cabo secuenciaciones peptídicas de manera rápida y eficaz.

Las técnicas basadas en ESI producen una suave ionización de la muestra, por lo que son ampliamente utilizadas en proteómica funcional así como en la determinación de interacciones no covalentes como aquellas que tienen lugar entre metales o metaloides con biomoléculas tales como aminoácidos, proteínas, péptidos o carbohidratos. Uno de

los inconvenientes de esta técnica es la poca tolerancia a sales poco volátiles o agentes solubilizantes tales como detergentes, que usualmente se incorporan en la muestra con el objeto de estabilizar la bio-especie de interés. Por lo tanto, suele ser necesaria una etapa de desalado que con frecuencia se aprovecha para preconcentrar la muestra, ya que se ha de tener en cuenta que estas técnicas no disponen de una sensibilidad tan elevada como la de ICP-MS. El desalado mediante ZipTip se puede emplear cuando se precisa de cantidades de muestra muy pequeñas como en el caso del uso de nanoESI. La infusión mediante nanoESI ofrece claras ventajas como la poca cantidad de muestra requerida, la alta sensibilidad o los largos tiempos de análisis que se pueden conseguir con unos pocos microlitros de muestra.

Otra ventaja del ESI frente a otras técnicas de ionización suave, es el fácil acoplamiento con técnicas de separación. Así, son comunes hoy en día los acoplamientos HPLC-ESI-MS o CE-ESI-MS¹⁷⁷. Estos acoplamientos no sólo ofrecen una separación de las especies de la muestra, sino que también preparan la muestra antes de ser ionizada en la fuente ESI desalándola o preconcentrándola, como es el caso de las cromatografías SEC o RPC.

La combinación de ESI con analizadores TOF ofrece excelentes resoluciones como se ha comentado anteriormente con la técnica MALDI-TOF. Los analizadores de trampa iónica (IT) también han sido ampliamente empleados en proteómica y recientemente en especiación bioinorgánica. Las nuevas generaciones de trampas lineales (LIT) ofrecen una excelente sensibilidad junto con una resolución similar a la de los analizadores TOF cuando se trabaja en el modo "Zoom". Además su capacidad para llevar a cabo fragmentaciones de las especies de interés mediante diversas técnicas de fragmentación, confiere a este analizador un notable potencial para la elucidación estructural. Por último cabe destacar el analizador de FT-ICR. Estos analizadores tienen una resolución en trabajo rutinario por encima de 100.000, y pueden llegar fácilmente a 10^6 , siendo capaces de realizar determinaciones estructurales mediante la medición de la masa exacta de la biomolécula.

B. Objetivos



Los fármacos antitumorales basados en Pt han sido objeto de una intensa labor investigadora durante los últimos años. Aunque fruto de dicho empeño se ha avanzado en la comprensión de sus mecanismos de acción, aún son muchas las incógnitas que permanecen e incluso otras nuevas las que se han planteado. Sin olvidar que se trata de una problemática multidisciplinar, el estudio de la acción tóxica y efectividad citotóxica de estos fármacos a través de las herramientas que hoy en día proporciona la Química Analítica, es una de las maneras más interesantes de abordar el tema.

Tan importante como la comprensión de la acción antitumoral de los fármacos de Pt, es la elucidación de los mecanismos responsables de fenómenos de resistencia a los mismos o de los efectos secundarios que provocan, y que son, en última instancia, los factores que limitan su aplicación. Para su estudio, es de extrema importancia el conocimiento de la distribución del fármaco, así como las posibles interacciones con las biomoléculas con las que se encuentra en su recorrido por el organismo. No sólo es importante el desarrollo de herramientas que nos permitan monitorizar, cuantificar e identificar las especies de interés, sino que también es preciso que sean eficaces en medios y concentraciones reales. La información extraída de estos estudios puede ser de extraordinario interés para conocer en profundidad los mecanismos de acción de estos fármacos y poder así paliar su toxicidad, potenciar su efectividad o diseñar nuevos fármacos con mejores propiedades. Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral es:

El desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de contenidos totales y especiación bioinorgánica de Pt, en muestras biológicas afectadas por la acción de fármacos antitumorales de Pt.

Para desarrollar este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo metodológico para el análisis total de Pt en órganos diana de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, así como en sus distintas fracciones celulares y citosólicas, con el fin de estudiar sistemáticamente sus acumulaciones y distribuciones en distintos diseños terapéuticos.

- Evaluación de la fortaleza de enlace de las bio-especies con Pt encontradas en las muestras biológicas utilizadas.
- Desarrollo de la metodología analítica necesaria para abordar la separación cromatográfica multidimensional de las bio-especies de Pt encontradas en órganos de ratas tratadas con fármacos antitumorales de Pt.
- Caracterización estructural de los derivados hidrolizados del cisplatino en medios que simulen las condiciones fisiológicas del organismo.
- Desarrollo de la metodología analítica necesaria para abordar la caracterización estructural de los aductos resultantes de la interacción de los fármacos antitumorales de Pt con biomoléculas del citosol celular como el GSH o la MT, y su aplicación a muestras reales.
- Desarrollo de la metodología analítica necesaria para abordar la separación y caracterización estructural de los aductos resultantes de la interacción de los fármacos antitumorales de Pt con biomoléculas del suero sanguíneo como la Tf o la HSA, y su aplicación a muestras reales.

C. Parte experimental



C.1. Capítulo I:
Caracterización del problema



C.1. Capítulo I: Caracterización del problema

Uno de los principales problemas que se plantean en los tratamientos oncológicos con complejos de Pt, deriva de que la fracción del complejo que no alcanza el ADN, se distribuye por el organismo del sujeto pudiendo desencadenar efectos secundarios graves como nefrotoxicidad, mielosupresión u ototoxicidad, entre otros.

Los estudios sobre la distribución de estos fármacos en el organismo, son indispensables para abordar con éxito posteriores trabajos relacionados con los mecanismos de actuación y los efectos secundarios. En la bibliografía recopilada en la *Introducción*, se presentan algunos trabajos de este tipo, sin embargo, hasta la fecha, se observa una ausencia de publicaciones basadas en experiencias sistemáticas con poblaciones o muestras controladas, excepto en el caso de muestras sanguíneas⁴⁸. Por el contrario, abundan los datos de Pt total determinado en distintos órganos de individuos con características muy diferentes, y sometidos a distintas terapias^{105,106,108}. De la misma manera, existe una carencia de trabajos relacionados con el estudio de la distribución de los fármacos a nivel celular y la localización de las fracciones más ricas en Pt.

Por ello, el objetivo de este capítulo ha sido el estudio de la distribución y acumulación del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, en muestras biológicas obtenidas de una población homogénea de ratas Wistar sometidas a tratamientos controlados. Para cumplir este objetivo se ha desarrollado una metodología analítica sensible y reproducible para la cuantificación de Pt total en diversos tejidos. El estudio de la distribución de los fármacos en los distintos órganos diana y en las fracciones celulares más significativas de cada órgano, han permitido localizar las fracciones biológicas de mayor interés para el estudio de los mecanismos de acción del fármaco. Otras metas de este capítulo son el desarrollo de una metodología sencilla para especiación de Pt, que sea capaz de aportar información sobre el fármaco libre presente en las muestras y hacer una evaluación preliminar de la robustez de la interacción fármaco:biomolécula.

C.1.1. Trabajo 1: Accumulation, fractionation and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration (*J. Anal. Toxicol.*, 32(2) (2008) 140-146)

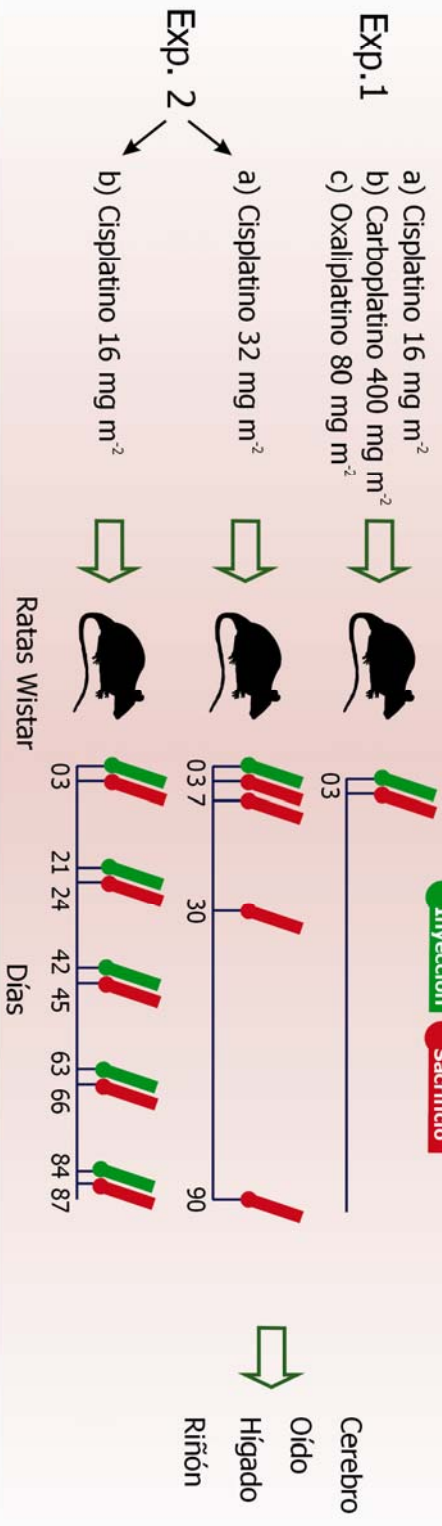
Los objetivos planteados en este primer capítulo se abordaron en el Trabajo 1. En el Esquema Experimental 1, se muestran las poblaciones de ratas Wistar con las que se llevó a cabo el estudio, la toma y el tratamiento de muestra empleados, así como la metodología analítica que se aplicó.

Se administraron cada uno de los fármacos bajo estudio, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, a una población homogénea de ratas Wistar bajo condiciones experimentales controladas. Se reprodujeron ciclos de administración monodosis y multidosis empleados en terapias con humanos. Se determinaron los contenidos de Pt en cerebro, oído, hígado y riñón, y en distintas fracciones celulares y citosólicas de los tres últimos órganos, obtenidas mediante ultracentrifugación y ultrafiltración. La cuantificación del Pt directamente en las fracciones o tras mineralización de las muestras en horno microondas, se realizó mediante ICP-MS por nebulización directa.

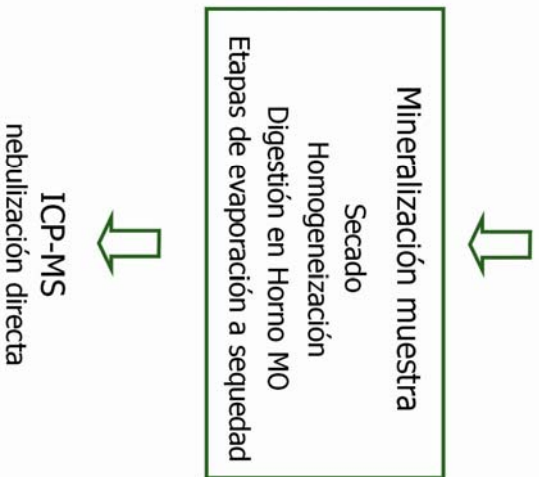
Una vez localizada la fracción celular de interés por su contenido en Pt y por su posible relación con la toxicidad del fármaco, se estudió la forma química en la que se encuentra el fármaco, así como la fortaleza del enlace fármaco:biomolécula. La aplicación de una metodología analítica básica basada en SEC-ICP-MS permitió distinguir entre el fármaco que queda libre y el que se une a biomoléculas, demostrándose por primera vez la ausencia de fármaco libre en los citosoles celulares (fracción soluble) de los órganos analizados.

Distintos tratamientos desnaturalizantes con SDS y/o BME, permitieron evaluar posibles transformaciones de las bio-especies de Pt o la ruptura del enlace fármaco:biomolécula, mediante el estudio del perfil cromatográfico. La notable robustez de las interacciones fármaco:biomolécula frente a los mencionados reactivos, permite pensar en futuras experiencias donde se puedan aplicar tratamientos de muestra más agresivos, tales como separaciones electroforéticas o digestiones tripticas.

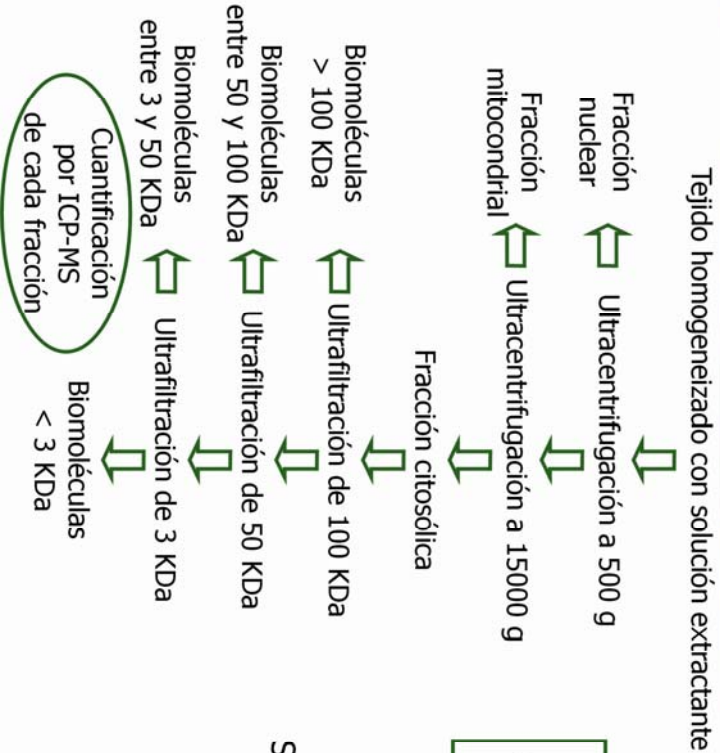
Esquema experimental 1 (Trabajo 1)



Determinación de Pt total en órganos (Experimento 1 y 2)



Determinación de Pt total en fracciones celulares (Experimento 1)



Especiación de Pt en la fracción citosólica (Experimento 2a)



Trabajo 1

Accumulation, fractionation and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin and carboplatin administration

Journal of Analytical Toxicology, 32(2) (2008) 140-146.

Este trabajo formó parte de la Comunicación Oral presentada en el congreso:
“Jornadas de Análisis Instrumental JAI” en noviembre de 2005, Barcelona, España
y de la Comunicación Oral presentada en el congreso:
“Winter Conference 2007” en febrero de 2007, Taormina, Italia

Accumulation, Fractionation, and Analysis of Platinum in Toxicologically Affected Tissues after Cisplatin, Oxaliplatin, and Carboplatin Administration

D. Esteban-Fernández¹, J.M. Verdaguer², R. Ramírez-Camacho², M.A. Palacios¹, and M.M. Gómez-Gómez^{1,*}

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain and ²Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, University Autónoma of Madrid, C/ San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain

Abstract

Antitumoral Pt-containing drugs present side effects like nephrotoxicity and ototoxicity. Several systematic experiments have been carried out with Wistar rats treated with cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin to study Pt-drugs accumulation and elimination, and Pt-biomolecule distribution in the cells and cytosols of ear, kidney, and liver. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis shows a cisplatin accumulation capability between oxaliplatin (the highest) and carboplatin (the lowest). The maximum concentration of Pt in all the organs studied was achieved around the first week after cisplatin treatment. During the first 30 days, the elimination was very fast, decreasing in the subsequent 60 days in all the organs. Analysis of cytosols by liquid chromatography (LC)-ICP-MS showed an analogous behavior. In most samples, the distribution of the three drugs in the cellular and cytosolic fractions was similar for all the tissues. For kidney and ear, approximately 60% and 30%, respectively, of the metal accumulated was present in the cytosol, the cytosolic fractions smaller than 50 kDa being especially important. Cisplatin-biomolecule interaction strength under denaturing conditions was evaluated by LC-ICP-MS and showed a quite strong bond.

Introduction

For several decades, Pt-based drugs have been effectively employed in antitumoral treatments. Cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum(II)) was introduced as a chemotherapeutic drug for the treatment of many cancers such as testicular, ovarian, head and neck, bladder, esophageal, and small cell lung (1), and remains a main antineoplastic drug for the treatment of solid tumors. Severe side-effects, including

nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity, emesis, and bone marrow suppression have been reported (2). In addition, some cancers have intrinsic resistance to cisplatin, and others develop resistance after treatment (3). Because of these drawbacks, other Pt-containing antitumoral compounds were synthesized and tested to increase efficiency and to reduce toxic side-effects. Two of these new-generation drugs are carboplatin [*cis*-diamine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)] and oxaliplatin (*trans*-L-1,2-diaminocyclohexaneoxalatoplatinum(II)). Carboplatin is mainly used to treat ovarian and lung cancers, and oxaliplatin is commonly used to treat large bowel cancer. Compared to cisplatin, carboplatin presents lower toxic side-effects, can be more easily used in combined therapies, and is active against the same types of tumors. Their most important side-effect is myelosuppression (4). Oxaliplatin exhibits no cross-resistance with cisplatin and is more effective in colon cancer treatment (5), but has an important side-effect: neuropathy (6). Patients treated with cisplatin present nephrotoxicity (50–75%) (7) and/or ototoxicity (36%) (8,9).

Pt has been quantified in different tissues and biological fluids from patients treated with Pt-based drugs (10–12); however, few works have been carried out in the field of Pt-biomolecule speciation. Interaction of Pt-containing drugs with target biomolecules like metallothioneins (MTs) (13,14), or sulfur-containing biocompounds (15,16) has been reported. The determination of free cisplatin in spiked human serum (17) or the separation of some Pt-species in spiked human plasma (18), are examples of Pt metallomic studies. However, to our knowledge very few *in vivo* studies concerning Pt biomolecules speciation have been reported (19).

It is necessary to use an accurate and sensitive technique for the quantification and detection of low levels of Pt-biocompounds in biological samples. Sensitivity, operational simplicity, and versatility currently make inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) the most suitable technique for total Pt determination (3). The coupling of ICP-MS

* Author to whom correspondence should be addressed: Dr. M.M. Gómez-Gómez, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mmgomez@quim.ucm.es.

with liquid chromatography or fractionation techniques such as size exclusion chromatography (SEC), allow Pt-biomolecules speciation studies (19) to be tackled.

This work is focused on the development of the necessary analytical methodology to study the accumulation and elimination of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ear (ototoxicity by cisplatin), kidney (nephrotoxicity by cisplatin), liver, and brain (no reported important side-effects by cisplatin) from rats treated with dosages of the drugs equivalent to those used in monodosage or multidosage human treatments. The distribution of the three drugs among the nuclear, mitochondrial, and cytosolic fractions from ear, kidney, and liver and the molecular weight distribution of the Pt-biospecies present in the cytosolic fraction of the three tissues have also been studied. The strength of the Pt-biospecies bond has also been studied. All these studies are of paramount importance to understand the biotransformation of the drug in the tissues, in order to improve the knowledge of the mechanisms related to the side-effects produced by these drugs.

Experimental

Standards, reagents, and materials

The Pt-based drugs used were cisplatin (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO), carboplatin (EBEWE Pharma, Unterach am Attersee, Austria), and oxaliplatin (Sanofi-Synthelabo, Paris, France).

All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, Milford, MA). High-purity nitric and hydrochloric acids were obtained by the distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany) in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany). H₂O₂ (30%, w/v, Panreac Química SA, Barcelona, Spain) was used for sample digestion.

Stock solutions of Pt (1000 mg/L, Spectrosol BDH, Poole, England) and Ir (1000 mg/L, Merck) were diluted with HCl (0.24 mol/L) to prepare standard solutions. Working solutions were prepared daily and diluted with HCl (0.24 mol/L) to final concentration.

Extraction and chromatographic reagents were *tris*-(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) and NaCl (Panreac Química SA). A protease inhibitor cocktail for mammalian cell and tissue extracts (Sigma Aldrich Chemie) was used in cytosol extraction. Protein denaturing reagents were sodium dodecyl sulfate (SDS for molecular biology, 99%, Sigma Aldrich Chemie) and 2-mercaptoethanol (β -mercaptoethanol or BME, 98%, Sigma Aldrich Chemie).

Centricon YM filters of 3000, 50,000, and 100,000 MW cut-off (Millipore) were employed for cytosol fractionation.

Sample treatment and analysis for total Pt determination by ICP-MS

Sample treatments and digestion. Ear, brain, liver, and kidney tissues were dried in a conventional oven up to a constant weight (6 h at 55°C followed by 3 h at 105°C) and ho-

mogenized by agate mortar grinding. Approximately 0.1 g of the dry tissues were placed in PFA Advanced Composite vessels and digested in a microwave oven (CEM MSP 1000, CEM, Matthews, NC) with 2 mL of HNO₃ and 0.6 mL of H₂O₂. The microwave program for 12 vessels was 1 min at 250 W, 1 min at 0 W, 5 min at 400 W, 6 min at 600 W, and 8 min at 750 W.

The digested samples were evaporated to dryness in Teflon vessels. Two more evaporation steps were performed, adding 2 mL of aqua regia and then 1 mL of HCl. The samples were diluted to 5 mL with HCl 0.24 mol/L for ICP-MS analysis. The pellets from the fractionation experiments were also mineralized in the same way.

Pt analysis. A Quadrupole ICP-MS Thermo X-series (Thermo Electron, Winsford, Cheshire, U.K.) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for total Pt determination. ICP-MS operating conditions were the following: forward power 1250 W, plasma gas 15 L/min, auxiliary gas 0.73 L/min, nebulizer gas 0.85 L/min, channels per AMU 10, and integration time 0.6 ms. Total Pt content measures were acquired in continuous mode, monitoring *m/z* 194 (Pt), 195 (Pt), and 191 (Ir). Non-spectral interferences (matrix effects) were not observed; thus, quantification of Pt was carried out by external calibration over the working range (0.25–100 μ g/L) with 200 μ g/L Ir as internal standard (IS). The correlation coefficient of the calibration curve by least-squares linear regression analysis was > 0.999.

It is known that only the presence of ¹⁷⁹Hf¹⁶⁰ and ¹⁷⁸Hf¹⁶⁰ molecules would be considered as important interferences on the Pt determination through its main isotopes (¹⁹⁵Pt and ¹⁹⁴Pt) by Q-ICP-MS (20). However, the analyzed biological samples are free of these isobaric interferences because no detectable amount of Hf has been found in any solution.

The limit of detection of the method for Pt analysis, calculated as three times the standard deviation of the blank (*n* = 10), was 6 μ g/kg for dry samples and 63 ng/L for the cytosolic fractions. The precision of the method was tested for liver from a rat treated with cisplatin. The RSD was 4.2% for six replicates of the same dry sample and 5.0% for seven independent dried samples taken from different parts of the same liver.

Sample treatment for tissues and cytosol fractionation and Pt-biomolecule studies

Cell fractionation by ultracentrifugation. Approximately 0.250 g of kidney and liver was dissected and homogenized in 3 mL of the extractant solution (10mM Tris-HCl, 25mM NaCl, pH 7.4) and 12.5 μ L of protease inhibitor cocktail using a 10-mL Potter homogenizator (Deltalab, Barcelona, Spain). In the case of ear, the entire organ (approximately 0.2–0.4 g) was homogenized in a Polytron PT 1200 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) in the same extractant solution and protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged in a 5804 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 500 $\times g$ for 20 min, and the decanted supernatant was centrifuged again at 15,000 $\times g$ for 30 min. All of the preparative steps were performed at 4°C, and the pellets from each centrifugation were washed with the same extractant solution. The two pellets ob-

tained, corresponding to the nuclear and the mitochondrial fractions, were mineralized and Pt content measured by ICP-MS. The cytosolic supernatant (cytosol) was diluted and directly analyzed for Pt content or fractionated for Pt-biomolecule studies.

Cytosol fractionation by ultrafiltration. Ear, kidney, and liver cytosols (0.3 mL) from rats treated with cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin, were fractionated by consecutive ultrafiltration through 100,000, 50,000, and 3000 MW cut-off filters. After each ultrafiltration, 0.4 mL of the extractant solution was used to wash the filters to ensure maximum recovery. The retentates were extracted from the filter by soft centrifugation at $1000 \times g$ for 2 min. A washing step with 0.1 mL of the extractant solution was applied to each filter for a quantitative recovery of the retentates.

Pt biomolecule determination by CESEC-ICP-MS and Pt biomolecule bond strength studies in the cytosol. SEC fractionation of ear and kidney cytosols impacted with cisplatin was performed by using a Superdex 75 10/300 GL column (Pharmacia, Amersham, Uppsala, Sweden, separation range of 3–70 kDa) coupled to ICP-MS. A high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089) equipped with an injection valve (Rheodine, Cotati, CA) was used. The sample injection volume was 250 μ L, and the same extractant solution was used as the mobile phase, at a flow rate of 1 mL/min. All samples were passed through 0.22 μ m nylon filters before injection.

For Pt-biomolecule bond strength studies, cytosolic fractions of kidney and ear were subjected to several denaturing treatments. The cytosolic fractions were diluted 1:2 with a solution containing 1% (w/v) SDS and 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), both with and without 5% (w/v) BME. The resulting mixtures were heated at 100°C for 5 min, sonicated for 15 min, and centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min. The supernatants were analyzed by SEC-ICP-MS and compared to those obtained for the native cytosolic fractions.

Pt drugs administration

Drug administration and the sacrifice of the rats were carried out under laboratory-controlled conditions by professional expertise at the Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid, Spain). The animals were handled following the guidelines of the National Council for the Care of Laboratory Animals. The drugs were administered by intraperitoneal injections. The weight of the rats was approximately 200 g, and the dosages were related to their corporal area and equivalent to those applied in humans. In all, 84 Wistar rats were treated. Two experiments were designed for the accumulation, elimination, and fractionation studies.

Experiment 1. Monodosage administration of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin for Pt fractionation studies. The experiment was performed with 21 rats. One dosage of cisplatin (16 mg of cisplatin per m^2 of corporal surface), oxaliplatin (80 mg/ m^2), or carboplatin (450 mg/ m^2) was administered to different groups of seven rats each; dosages were 10.4, 39.3, and 236.5 mg/ m^2 of Pt. The sacrifices were carried out the third day after administration.

Experiment 2. Monodosage and multidosage treatments for Pt accumulation/elimination studies versus time. For the

monodosage treatment, 40 rats were treated with 32 mg/ m^2 of cisplatin. Groups of 7 rats were sacrificed at the 3rd, 7th, 30th, and 90th days after administration.

For the multidosage treatment, the experiment was performed with 23 rats. Five cycles of 16 mg/ m^2 of cisplatin were given. The elapsed time between each cycle was 21 days. At least three rats were sacrificed the third day after each cycle of administration.

Results and Discussion

Pt accumulation and fractionation studies in target organs and cytosols after cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin administration

Drug accumulation in brain, kidney, liver, and ear was determined the third day after administration by the analysis of the total Pt content. For data comparison, the results in Figure 1 are given as the Pt concentration found in the dry tissue (mg Pt/kg dry tissue) per milligram of Pt administered with the drug.

Oxaliplatin produced a higher accumulation of Pt than cisplatin in ear, brain, kidney, and liver of approximately 2.9, 1.9, 1.7, and 1.3 times, respectively. Pt accumulation after carboplatin treatment was the lowest for all tissues, being approximately 19%, 35%, 31%, and 17% lower than with cisplatin for ear, brain, kidney, and liver, respectively.

These results are interesting from a pharmacokinetic point of view. The fact that oxaliplatin presents a higher tendency to be accumulated in kidney and ear, but does not produce the same side-effects as cisplatin, suggests that not only could the total Pt content in the organs be responsible for alterations in functionality, but also the interaction of the drug with specific biomolecules of target organs. Therefore, Pt-based drug speciation analysis is important to understand the drug-biomolecule interactions, which are responsible for the adverse effects.

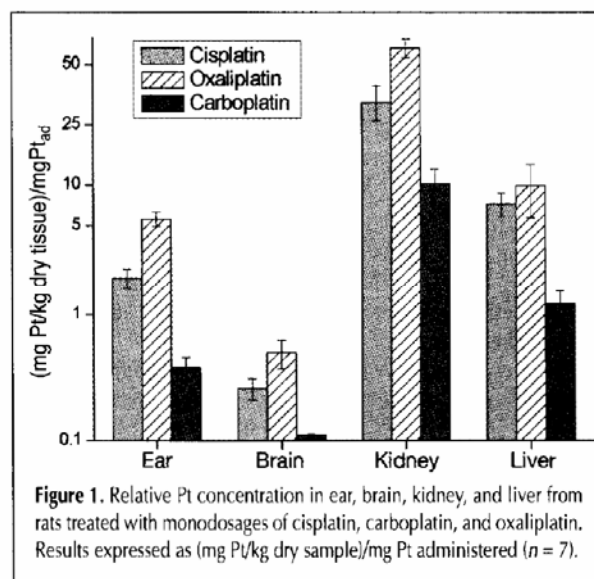


Figure 1. Relative Pt concentration in ear, brain, kidney, and liver from rats treated with monodosages of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. Results expressed as (mg Pt/kg dry sample)/(mg Pt administered) ($n = 7$).

Table I. Percentage of Pt Found in the Nuclear, Mitochondrial, and Cytosolic Fractions of the Ear, Kidney, and Liver from Rats Treated with Cisplatin, Oxaliplatin, and Carboplatin (n = 3)

	Ear			Kidney			Liver		
	Nuclear	Mitochondrial	Cytosolic	Nuclear	Mitochondrial	Cytosolic	Nuclear	Mitochondrial	Cytosolic
Cisplatin	61.9 ± 0.9	1.4 ± 0.2	26.0 ± 1.2	30.8 ± 0.4	20.3 ± 0.6	46.9 ± 0.1	16.8 ± 0.5	19.4 ± 1.1	60.8 ± 1.6
Oxaliplatin	61.2 ± 3	1.7 ± 0.01	31.9 ± 2.9	14.6 ± 0.9	11.2 ± 0.4	60.7 ± 0.5	13.3 ± 2.2	17.5 ± 0.2	54.2 ± 2.0
Carboplatin	61.2 ± 4.7	1.3 ± 0.2	30.5 ± 4.9	19.9 ± 1.4	18.2 ± 0.1	61.9 ± 1.5	22.9 ± 0.2	12.6 ± 1.0	63.5 ± 0.8

In order to determine the distribution of the drugs among the nuclear, mitochondrial, and cytosolic fractions of the cell tissues, ear, kidney, and liver were fractionated as described in the Experimental section. The total Pt concentration was subsequently determined.

Table I shows the Pt content in the different fractions for each tissue for the three drugs. Results are given as the mean percentage of Pt found in each fraction with respect to the total content of the tissue given in Figure 1. The sum of the Pt recovered after fractionation was higher than 85% for all the samples.

The highest Pt content for kidney and liver was found in the cytosolic fraction, which represents approximately 50–60% of the total Pt content in the tissue. For ear, the highest content for the three drugs was found in the nuclear fraction, and only approximately 30% of the Pt was accumulated in the cytosol. Therefore, it appears that the toxic mechanisms responsible for ototoxicity produced by cisplatin are not related to the cellular distribution of the drug.

It is known that Pt-drugs are bound to the cytosolic biomolecules (21). To determine the distribution of the Pt-drug among cytosolic biomolecules with different molecular weight, the cytosols of the ear, kidney, and liver were fractionated by ultrafiltration. This fractionation was performed immediately after the cytosol preparation to avoid species transformation or sample degradation. The MW fractionation (by cut-off filters) of the cytosolic fractions gives reproducible and quantitative results for the Pt-biomolecule distribution (Figure 2). The recoveries were satisfactory, being the sum of the three fractions higher than 95% with respect to total Pt content in the whole cytosol.

As can be seen in Figure 2, the fraction higher than 100 KDa shows the highest Pt content (approximately 45–65%) for all the tissues and drugs. However, this cut-off contains soluble biomolecules and the microsomal fraction with membranes, ribosomes, etc. The fraction that ranges from 50 to 100 KDa presents the lowest Pt content (approximately 5%) for all tissues.

For the two toxicologically affected organs, ear and kidney (Figure 2A and 2B), the Pt content in the two fractions below the 50 KDa represents approximately 50% of the total Pt in cytosol. Particularly for ear, all the drugs interact to a great extent with soluble biomolecules smaller than 3 KDa. Previous work (19) showed that both free drug and free Pt are not present in the cytosol; therefore, the Pt found in the smallest fractions must be bound to biomolecules. Besides, these small MW fractions have intrinsic interest because of the possible presence of biomolecules such as metallothioneins or glutha-

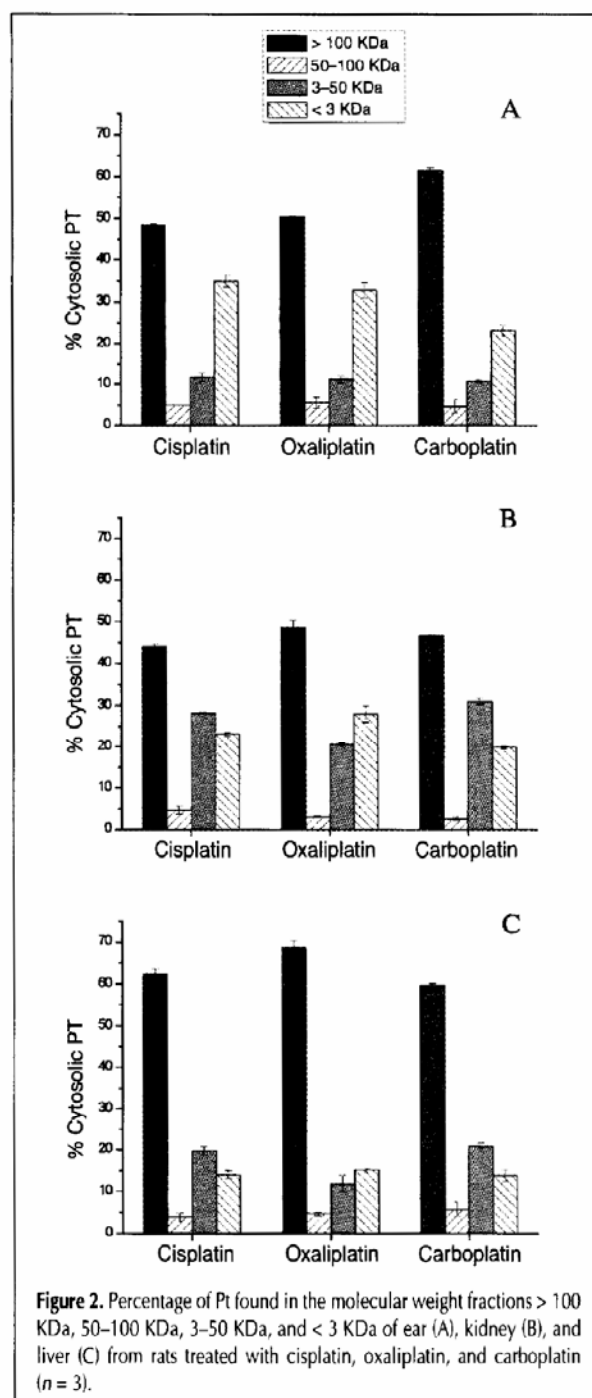


Figure 2. Percentage of Pt found in the molecular weight fractions > 100 KDa, 50–100 KDa, 3–50 KDa, and < 3 KDa of ear (A), kidney (B), and liver (C) from rats treated with cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin (n = 3).

tion that are known to be involved in detoxification processes (13,15).

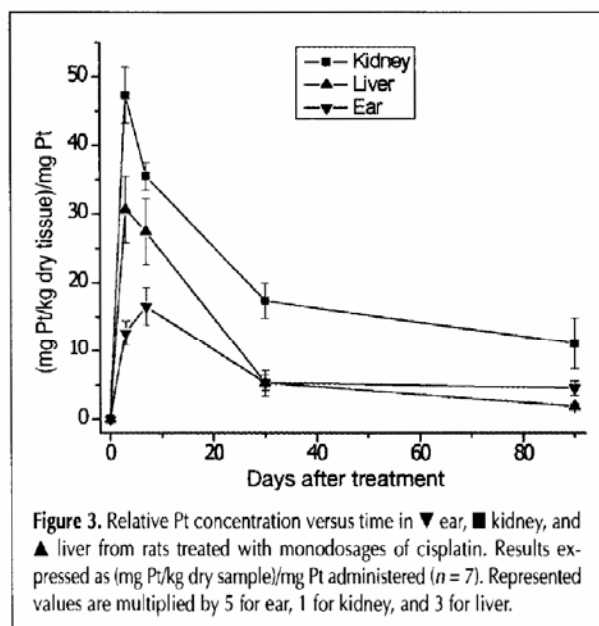
Summarizing, the different capabilities of the three drugs to incorporate into the studied tissues (Figure 1) and the similar behavior with respect to Pt distribution among cell compartments and cytosol biomolecules of the tested tissues (Table I and Figure 2) point out the need for further metallomic studies to understand toxicity mechanisms.

Pt accumulation/elimination studies versus time in target organs and cytosols after cisplatin monodosage and multidosage treatments

To determine the accumulation/elimination kinetics of cisplatin in ear, kidney, and liver, rats were subjected to a monodosage cisplatin administration of 32 mg/m² (Experiment 2) and sacrificed after periods ranging from the 3rd to the 90th day after treatment. Total Pt content in tissues for each period was determined by ICP-MS. In parallel, the elimination of the Pt-biomolecule content from the cytosol of ear and kidney during the same period was tracked by SEC-ICP-MS.

Figure 3 shows the relative total Pt concentration found in the ear, kidney, and liver over time. The maximum concentration of Pt in all organs was achieved within the 3rd–7th days after treatment. Over the first 30 days, the elimination mechanism is very fast. From the 30th to 90th day, the elimination rate is lower for all the organs, achieving probably an almost steady state and remaining approximately 20%, 24%, and 6% of the maximum Pt content in ear, kidney, and liver, respectively.

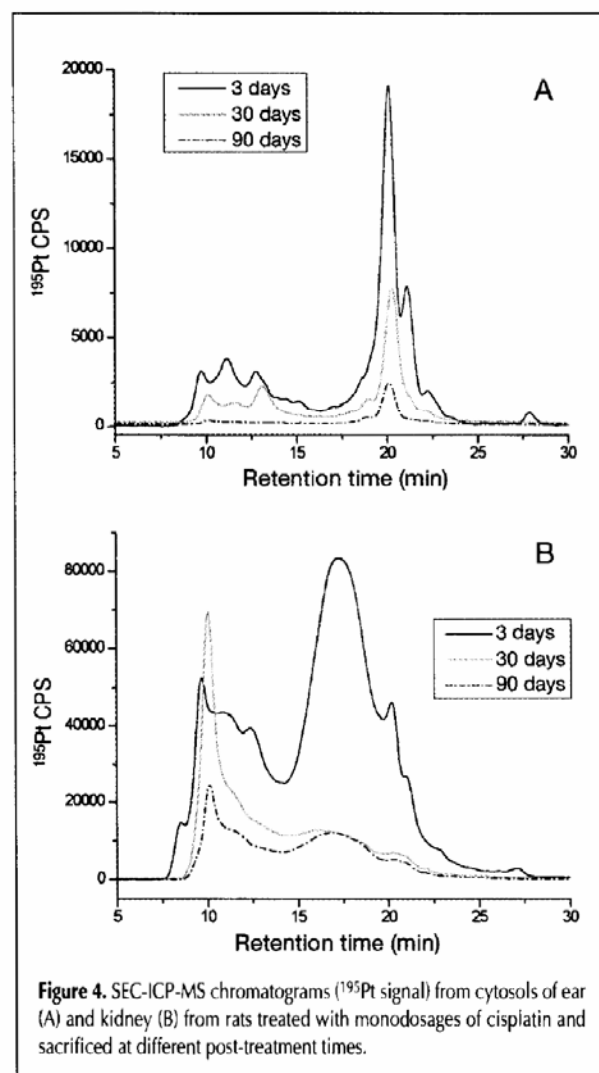
Analogous behavior was observed during the chromatographic analysis of the cytosol. Figure 4 shows the SEC-ICP-MS chromatograms for ear (Figure 4A) and kidney cytosol (Figure 4B) at different times after cisplatin administration. The evolution of the Pt-biomolecule chromatographic profile also reflects the elimination of Pt over time and is probably similar for all the proteins included in this MW range.



This tendency agrees with that reported previously for cisplatin (12,21), where the cell membrane plays the role of a barrier both in uptake and elimination. The kinetics of cisplatin efflux is biphasic in nature with a very rapid initial phase followed by a much slower secondary one.

Finally, in order to prove the accumulation/elimination rate after a multidosage treatment of cisplatin, the Pt accumulated in the different tissues the third day after each administration cycle was determined. Table II shows the results obtained. The relative Pt concentration after the first cycle is in general the highest. Between the first and second cycles, the decrease in the relative Pt concentration ranged between 26 and 50% depending on the organ. From the second to the fifth cycle, the relative Pt concentration in all the tested organs remained almost constant. This fact seems to indicate that some elimination/detoxification mechanisms are very active. After the fifth cycle, a significant increase in the relative Pt concentration was observed, which could be explained by a collapse of the elimination/detoxification mechanisms.

It is remarkable that, although the concentration of the drug administered in each cycle is half of that used in the



monodosage experiment, the concentration found after the first cycle is only approximately 27% lower (50% could be expected). Therefore, it looks as if the detoxification mechanism is not activated to the same extent for lower Pt dosages, resulting in a higher accumulation.

Strength of the bonds between Pt and biomolecules

The cytosolic fractions of kidney and ear impacted by cisplatin were subjected to several denaturing treatments (usual in gel electrophoresis) to evaluate the strength of the bonds between Pt and biomolecules. Figure 5 shows the SEC-ICP-MS profiles for ear and kidney cytosols with and without the application of SDS and a mix of SDS and BME. Pt-biomolecule profile did not change much after SDS treatment. A slight shift in the profiles to lower MW was observed, as could be expected after denaturing treatments, especially for SDS combined with BME, because of the reducing properties of BME disulfide bond cleavage. However, the most important finding is that no free cisplatin (retention time approximately 47 min) was found after these denaturing treatments. Results point out that the interaction of cisplatin with the biomolecules in cytosol is strong enough to resist the sample treatments used in some protein purification steps.

Table II. Relative Pt Concentration in Ear, Kidney, and Liver from Rats Treated with Multidosages of Cisplatin. Results Expressed as (mg Pt/kg Dry Sample)/mg Pt Administered (mean \pm s_{n-1})

Sample	Ear	Kidney	Liver
Control (n = 4)	nd*	nd*	nd*
Cycle 1 (n = 7)	1.96 \pm 0.35	33.3 \pm 6.9	7.29 \pm 1.38
Cycle 2 (n = 3)	1.25 \pm 0.32	21.4 \pm 4.0	3.68 \pm 0.48
Cycle 3 (n = 3)	1.33 \pm 0.44	22.8 \pm 5.7	3.84 \pm 1.29
Cycle 4 (n = 3)	1.09 \pm 0.09	20.8 \pm 9.3	3.03 \pm 0.65
Cycle 5 (n = 3)	2.20 \pm 0.05	28.7 \pm 3.1	5.80 \pm 0.63

* nd: not detected.

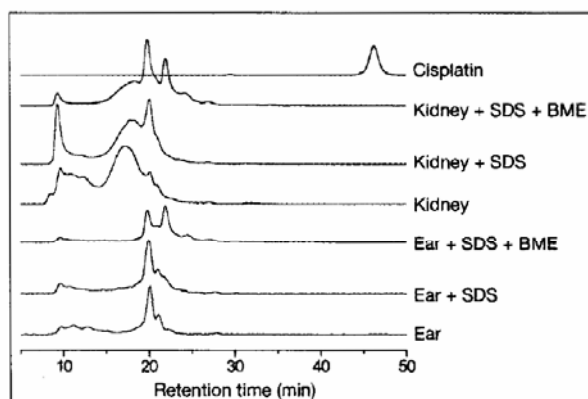


Figure 5. SEC-ICP-MS chromatograms (¹⁹⁵Pt signal) of native cytosols and denatured cytosols after treatments with SDS and 2-mercaptoethanol (BME) of ear and kidney from rats treated with monodosages of cisplatin and sacrificed at the third day.

Conclusions

The analytical methodology developed for total Pt determination and the fractionation studies in cells and cell cytosols allowed the clarification of some aspects of the accumulation/elimination processes and Pt-biomolecule distribution in ear, kidney and liver from rats treated with cisplatin, carboplatin and oxaliplatin.

Global results show that, although all the Pt-based drugs tested present different accumulation rates in the different organs, once they are within the cells, the three drugs show a similar distribution, among both the different cellular and cytosolic fractions for most of the tissues. Results further show that the interaction of cisplatin with cytosol biomolecules is quite strong.

The toxic effects produced by cisplatin in kidney and ear are probably not only related to the Pt accumulation and distribution, but also with the drug-biomolecule interaction. Thus, further metallomic studies are needed to explain the interactions that lead to toxic effects. High Pt-containing cytosolic fractions, with an MW lower than 50 KDa, could be suitable samples for these future studies.

Acknowledgments

This work was financially supported by the CICYT project BQU-2002-01348 and the project CTQ-2005-08593. The authors gratefully acknowledge the Spanish Ministry of Education and Science for the predoctoral fellowship of the PhD student D.E.

References

1. *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, B. Lippert, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1999, p 476.
2. M.J. Zelefsky, D.H. Kraus, D.G. Pfister, A. Raben, J.P. Shah, E.W. Strong, R.H. Spiro, G.J. Bosl, and L.B. Harrison. Combined chemotherapy and radiotherapy versus surgery and postoperative radiotherapy for advanced hypopharyngeal cancer. *Head Neck* **18**: 405-411 (1996).
3. Z. Yang, X. Hou, and B.T. Jones. Determination of platinum in clinical samples. *Appl. Spectrosc. Rev.* **37**: 57-88 (2002).
4. N.D. Doolittle, L.L. Muldoon, R.E. Brummett, R.M. Tyson, C. Lacy, J.S. Bubalo, D.F. Kraemer, M.C. Heinrich, J.A. Henry, and E.A. Neuwelt. Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin. Cancer Res.* **7**: 493-500 (2001).
5. L. Alinari, G. Musuraca, M. Tani, V. Stefoni, A. Gabriele, E. Marchi, M. Fina, A. De Vivo, S. Pileri, M. Baccarani, and P.L. Zinzani. Value of oxaliplatin treatment in the heavily pre-treated patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **46**: 1437-1440 (2005).
6. J. Cassidy. Review of oxaliplatin: an active platinum agent in colorectal cancer. *Int. J. Clinical Pract.* **54**: 399-402 (2000).
7. I. Arany and R.L. Safirstein. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* **23**: 460-464 (2003).
8. P.H. Liberman, C. Schultz, M.V. Gómez, A.L. Carvalho, A.C. Pel-

- lizzon, J.R. Testa, O. Feher, and L.P. Kowalski. Auditory effects after organ preservation protocol for laryngeal/hypopharyngeal carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **130**: 1265–1268 (2004).
9. R. Ramírez-Camacho, J.R. García-Berrocal, J. Buján, A. Martín-Marero, and A. Trinidad. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* **114**: 533–537 (2004).
 10. D.J. Stewart, R.S. Benjamin, M. Luna, L. Feun, R. Caprioli, W. Seifert, and T.L. Loo. Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **10**: 51–54 (1982).
 11. J. Areberg, S. Björkman, L. Einarsson, B. Frankenberg, H. Lundqvist, S. Mattsson, K. Norrgren, O. Scheike, and R. Wallin. Gamma camera imaging of platinum in tumours and tissues of patients after administration of ¹⁹¹Pt-cisplatin. *Acta Oncol.* **38**: 221–228 (1999).
 12. A. Gerl and R. Schierl. Urinary excretion of platinum in chemotherapy-treated long-term survivors of testicular cancer. *Acta Oncol.* **39**: 519–522 (2000).
 13. A. Pattanaik, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, C.F. Shaw, III, D.H. Petering, A. Hitchcock, and L. Saryan. Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein. *J. Biol. Chem.* **267**: 16121–16128 (1992).
 14. D. Hargman, J. Goodisman, J.C. Dabrowiak, and A.K. Souid. Kinetic study on the reaction of cisplatin with metallothionein. *Drug Metab. Dispos.* **31**: 916–923 (2003).
 15. J.C. Dabrowiak, J. Goodisman, and A.K. Souid. Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols. *Drug Metab. Dispos.* **30**: 1378–1384 (2002).
 16. D. Hargman, J. Goodisman, and A.K. Souid. Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**: 658–666 (2004).
 17. J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B.K. Keppler, and R. Lobinski. Investigation of metaldrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal. Chim. Acta* **387**: 135–144 (1999).
 18. V. Vacchina, L. Torti, C. Allievi, and R. Lobinski. Sensitive species-specific monitoring of a new triplatinum anti-cancer drug and its potential related compounds in spiked human plasma by cation-exchange HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **18**: 884–890 (2003).
 19. D. Esteban-Fernández, M.M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J.M. Verdaguer, R. Ramírez, and M.A. Palacios. Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues. *Talanta* **72**: 768–773 (2007).
 20. M.B. Gómez, M.M. Gómez, and M.A. Palacios. Control of the interferences in the determination of Pt, Pd, and Rh in airborne particulate matter by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **404**: 285–294 (2000).
 21. K. Wang, J. Lu, and R. Li. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord. Chem. Rev.* **151**: 53–88 (1996).

Manuscript received May 11, 2007;
revision received August 7, 2007.

C.2. Capítulo II:
Desarrollo de metodologías
analíticas para la especiación
de Pt en muestras biológicas



C.2. Capítulo II: Desarrollo de metodologías analíticas para la especiación de Pt en muestras biológicas

En el Capítulo I se ha podido comprobar que aquellos fármacos que más se acumulan en un tejido no tienen por qué ser los más tóxicos, y por tanto, el estudio de las interacciones fármaco:biomolécula se postula como la clave para el entendimiento de sus mecanismos de acción. De igual modo, a la vista de los resultados obtenidos en el primer trabajo, queda constatada la importancia de la fracción citosólica de los tejidos analizados, ya que ha mostrado una gran capacidad para acumular el fármaco y porque en ella están presentes bioligandos involucrados en procesos de bioacumulación, detoxificación y resistencia al tratamiento, como son la MT y el GSH.

Otro punto de vista desde el cual abordar la problemática derivada de los fármacos antitumorales de Pt, es el estudio de sus interacciones con las biomoléculas presentes en el torrente sanguíneo. Las interacciones que se producen en este fluido son de extrema importancia ya que la mayoría de los fármacos son de administración intravenosa. Por lo tanto, es de gran interés el estudio de la interacción del fármaco con proteínas de la sangre, como las proteínas del suero sanguíneo HSA, Tf o inmunoglobulinas. La capacidad de cada fármaco para interactuar con las biomoléculas de la sangre condicionará su actividad citotóxica, su acumulación en el organismo, la facilidad para penetrar la membrana celular o su participación en efectos secundarios no deseables. En la bibliografía revisada existen interesantes trabajos que estudian la interacción de los distintos fármacos basados en Pt con las proteínas sanguíneas^{53,59,73,86,91,92}. Sin embargo, aún faltan estudios que identifiquen inequívocamente las bio-especies de Pt que se forman y que lo hagan en muestras reales.

Aunque la potencialidad de las técnicas analíticas actuales permite abordar dichos estudios¹⁵¹, las dificultades e inconvenientes para llevarlos a cabo son evidentes, y es necesario el desarrollo de nuevas metodologías que salven obstáculos como la labilidad de los aductos fármaco:biomolécula, la baja concentración de estas especies en muestras reales o las complejas separaciones necesarias para aislar las especies de interés. Si bien, este camino ya se ha iniciado empleando muestras sencillas consistentes en disoluciones de patrones proteicos y patrones de diversas biomoléculas^{94,130}, el gran desafío pendiente es su aplicación a muestras reales.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este capítulo es el desarrollo de metodologías analíticas para abordar trabajos de especiación de Pt en muestras reales tales como tejidos o suero sanguíneo. No sólo se planteará el seguimiento de las especies con Pt, sino el avance en métodos analíticos para la identificación de dichas especies que garanticen la ausencia de biotransformaciones y de rupturas totales o parciales del enlace fármaco:biomolécula. En los trabajos que se adjuntan a continuación se tratan diferentes aspectos de la especiación del Pt en muestras biológicas, como el empleo de varias dimensiones cromatográficas para la separación de las bio-especies de Pt, la evaluación de la conveniencia de diversos métodos de preconcentración previos a la segunda dimensión cromatográfica, el análisis de muestras incubadas en medios fisiológicos de alta salinidad, el seguimiento de la evolución del cisplatino y sus derivados reactivos en dichos medios o las distintas estrategias aplicables a la identificación de las bio-especies de Pt empleando técnicas estructurales de masas.

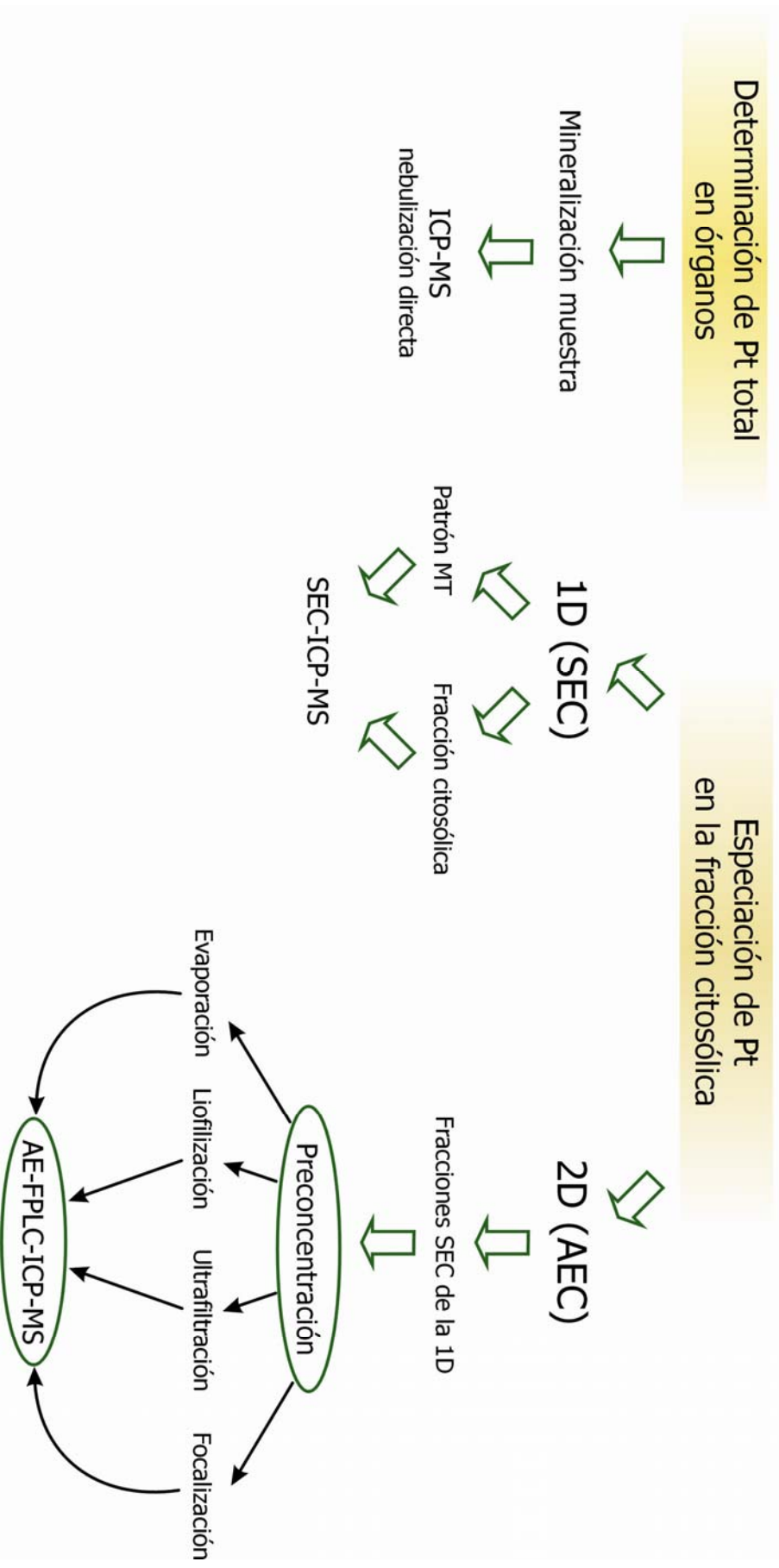
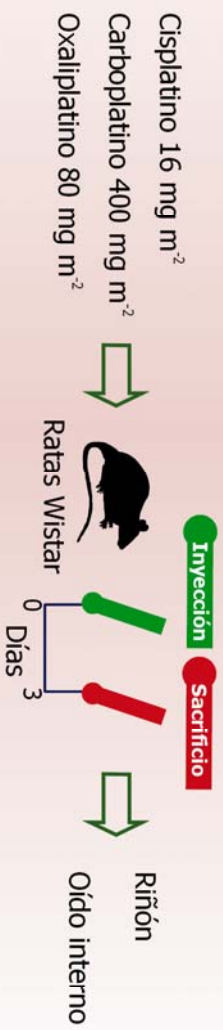
C.2.1. Trabajo 2: Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues (*Talanta*, 72(2) (2007) 768-773)

En este segundo trabajo se ha desarrollado una metodología cromatográfica bidimensional para la separación y preconcentración de las especies de Pt presentes en citosoles de riñón y de oído interno de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino (Esquema experimental 2).

El empleo de una separación de exclusión por tamaños (SEC-ICP-MS) en la primera dimensión del proceso cromatográfico, permitió comparar las especies de Pt presentes en los dos órganos estudiados y para cada uno de los tres fármacos administrados. Los perfiles cromatográficos obtenidos monitorizando el isótopo ^{195}Pt , pusieron de manifiesto notables similitudes entre los distintos fármacos y diferencias entre los tejidos analizados, y permitieron confirmar de nuevo, la ausencia de fármaco libre en todas las muestras. Además, la separación de la MT por el mismo procedimiento y la detección multi-elemental mediante ICP-MS (monitorizando ^{66}Zn y ^{114}Cd), hizo posible localizar regiones de los perfiles cromatográficos de los citosoles donde pudiera estar presente dicha proteína, bien libre o bien ligada al fármaco.

La segunda dimensión cromatográfica se realizó sobre las fracciones de interés obtenidas en la primera dimensión y se basó en un mecanismo de intercambio aniónico (AE-FPLC-ICP-MS) que permitió alcanzar una mayor resolución. Se hizo necesaria una etapa de preconcentración de las fracciones escogidas para asegurar la sensibilidad de la detección en la segunda dimensión. Los métodos evaluados fueron evaporación, liofilización, ultrafiltración y focalización en cabeza de columna. Precisamente este último método fue el que ofreció mejores resultados, siendo ésta la primera vez que una focalización se aplica en trabajos de metalómica.

Esquema experimental 2 (Trabajo 2)



Trabajo 2

Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues

Talanta, 72(2) (2007) 768-773

Este trabajo formó parte de la Comunicación Oral presentada en el congreso:
“Jornadas de Análisis Instrumental JAI” en noviembre de 2005, Barcelona, España



Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues

D. Esteban-Fernández^a, M.M. Gómez-Gómez^{a,*}, B. Cañas^a, J.M. Verdaguer^b,
R. Ramírez^b, M.A. Palacios^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, C/San Martín de Porres 4, 28035 Madrid, Spain

Received 10 July 2006; received in revised form 21 November 2006; accepted 4 December 2006

Available online 8 January 2007

Abstract

Chemical compounds containing platinum have been employed since 1978 as drugs to beat certain type of tumours. Nevertheless, besides of their exceptional antitumoral properties, these drugs also have important deleterious side effects, such as, nephrotoxicity and ototoxicity.

A study of Pt accumulation and a speciation analysis has been performed by ICP-MS in samples from kidney and inner ear in a controlled population of Wistar rats treated with, either, cisplatin, carboplatin or oxaliplatin. The results on Pt accumulation point out to drug structure and not only to Pt content as the responsible for the alteration of organ functionality.

Speciation studies in the samples from kidney and inner ear were performed coupling two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) to ICP-MS. Size exclusion (SEC) and anion exchange fast protein liquid chromatography (FPLC) was employed for 2D orthogonal separation. After these separations, free drug peaks were not observed in any of the samples.

The binding of Pt to biomolecules was demonstrated by SEC and, independently of the drug used, Pt eluted as two main bands with molecular weights of 12 kDa and 25–65 kDa for inner ear samples, and as two different bands with 20 kDa and 50–60 kDa in the samples from kidney. However, the relative band intensity presented important differences for the three drugs. Using the same chromatographic conditions, it was shown that a metallothionein (MT) standard eluted in the same position as some of the cytosolic Pt-biomolecules.

High Pt-containing fractions eluting from the SEC column were analysed by anion exchange FPLC after a preconcentration step. Among the different preconcentration methods tested, sample focusing on the head of the FPLC column shows main advantages. In this way, the separation by 2D chromatography of the high molecular Pt-species has been considerably improved.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pt-based drugs; Rats; LC-ICP-MS; 2D chromatographic separations; Sample focusing; Pt-biomolecules; Kidney and inner ear toxicity

1. Introduction

Since 1978 cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum(II)), is widely used for the treatment of many cancers. Severe side effects like nephrotoxicity, ototoxicity, etc., limit the maximum dosage to 100 mg/(m² 21 days) [1]. Besides, some tumors present an intrinsic resistance to cisplatin, while others develop resistance only when the treatment begins. Because of these drawbacks, other Pt containing antitumoral compounds have been synthesized and tested with the aim of finding a related drug with increased treatment efficacy and reduced toxic side-effects. Higher dosages, of 300 mg/(m² 21 days)

and 135 mg/(m² 15 days), were allowed, respectively, with two of these new generation drugs: carboplatin (*cis*-diamine(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)) and oxaliplatin (*trans*-L-1,2-diaminocyclohexaneoxalatoplatinum(II)) [2,3]. The most important side effects of these drugs were myelo-suppression and neuropathy, respectively.

The study of the accumulation, distribution and biotransformation of a drug in the affected organs is the first step to understand the physiological behaviour that produces organ injury. Previous accumulation and distribution studies carried out with laboratory rats treated with cisplatin revealed a maximum accumulation of Pt around the first week of post-treatment for all the organs under study (kidney, liver, brain and inner ear) [4]. The drug persists longer in the kidney and inner ear. The damage produced in the affected organs is probably due to the

* Corresponding author. Tel.: +34 913945146; fax: +34 913944329.
E-mail address: mmgomez@quim.ucm.es (M.M. Gómez-Gómez).

association of Pt (or the parent drug metabolites) to important proteins of the impacted organ.

The current concept of bioinorganic speciation analysis involves metallomic studies of real samples like plasma, urine or tissues [5,6]. In this way, some interesting elements like selenium have been extensively studied employing hyphenated techniques combining different types of chromatography, like SEC, anion exchange, etc., and powerful detectors, such as ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry) or structural mass spectrometry techniques like ESI-MS (electrospray ionisation mass spectrometry) or MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry) [7]. Few studies have been done in real samples such as, serum or urine for the bioinorganic speciation analysis of Pt-based drugs [8,9]. The coupling of HPLC to ICP-MS is the first essential step to perform these studies [10].

Most of the studies related to speciation of Pt-based drugs are related to cisplatin [11]. The transformation of the drug in different media [12,13], their interaction with HPLC mobile phases [14,15], or their incubation with small biomolecules like aminoacids or thiol compounds [16,17], even with small proteins like metallothioneins (MTs) [18,19], have been studied. Similar speciation studies with other Pt-based drugs, like carboplatin or oxaliplatin, have also been reported [20]. It is known that MTs, a group of small cysteine-rich proteins that form metal-thiolate clusters with metals, have important functions in metal detoxification processes with Cd, Hg and Ag [21]. The synthesis of apo-thionein is induced by high concentrations, within the cells, of heavy metals. Probably, likewise mechanisms may be involved in Pt detoxification after a high uptake [22,23].

Present work is focused on the development of an analytical methodology for the separation and characterization of the different Pt-biomolecules present in kidney and inner ear cells cytosol from rats, which were previously treated with monodoses of, either cisplatin, carboplatin or oxaliplatin equivalent to that used for human disease treatments. Up to our knowledge, it is the first time that this type of speciation studies is performed in tissues. These studies are of paramount importance to improve the understanding of the mechanisms related to the side effects produced by these drugs.

2. Experimental

2.1. Instrumentation and chromatographic materials

For the determination of Pt, a Quadrupole ICP-MS Thermo X-Series (Thermo Electron, Windsford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system, was employed. For total analysis of Pt, sample introduction was performed in continuous mode, and single ion monitoring of m/z 191 (Ir), 194 (Pt) and 195 (Pt), was used to collect data. Quantification of Pt was carried out by external calibration of ^{195}Pt isotope with $200\ \mu\text{g L}^{-1}$ Ir as internal standard.

For speciation studies by chromatographic separations, a high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodine, USA) was used as

Table 1
ICP-MS and LC-ICP-MS operating conditions

ICP-MS operating conditions	
Forward power (W)	1250
Plasma gas (Ar, L min ⁻¹)	15
Auxiliary gas (Ar, L min ⁻¹)	7.3
Nebuliser gas (Ar, L min ⁻¹)	0.76
Spray chamber	Impact bead quartz
Nebuliser	Meinhard
Skimmer cone	Nickel
Sampling cone	Nickel
Acquisition mode	Continuous and transient
Channels per AMU	10
Integration time (ms)	0.6
Internal standard	^{191}Ir 200 $\mu\text{g L}^{-1}$
SEC	
Analytical column	Superdex 75 10/300 GL
Mobile phase	10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl (pH 7.4)
Injection volume (μL)	250
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.8
FPLC	
Analytical column	Mono Q H/R 5/5
Mobile phase	A: 4 mM Tris-HCl (pH 7.4); B: A + 400 mM ammonium acetate (pH 7.4)
Time (min)	B (%)
0	0
10	20
15	50
20	85
25	100
Injection volume (μL)	250 (6 mL for head focusing)
Flow rate (mL min ⁻¹)	0.6

a sample delivery system. Separation of Pt-biomolecules was performed by SEC using a Superdex 75 10/300 GL column (Pharmacia, Amersham, Uppsala, Sweden, separation range of 3–70 kDa) and with a strong anion exchange FPLC column Mono-Q H/R 5/5 (Pharmacia, Amersham, Uppsala, Sweden). The operating conditions used for chromatographic separations and instrumental parameters employed for ICP-MS analysis are summarised in Table 1.

Digestions for total Pt determination were carried out in a high-pressure microwave oven (CEM MSP 1000, Matthews, USA). An acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany) was used for HCl and HNO₃ purification. For Pt-biomolecules speciation analysis the homogenisation of the tissues was performed with a Polytron PT 1200 (Kinematica AG, Switzerland) and a 10 mL Potter (Deltalab, Barcelona, Spain). Samples were centrifuged in a centrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Germany). A Turbo Vap II evaporation system (Caliper Life Science, USA), Centricon centrifugal filters YM-3 (3 kDa NMWL, Millipore, USA) and a freeze-dryer (Lioalfa 6, Tesla, Spain) were used for preconcentration of the samples.

2.2. Standards and reagents

All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA). High-purity nitric

and hydrochloric acids were obtained by distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany). H₂O₂, 30% (w/v) (Panreac Química SA, Barcelona, Spain) was used for sample digestion.

The Pt-based drugs used were cisplatin (Sigma–Aldrich Chemie), carboplatin (EBEWE Pharma, Austria) and oxaliplatin (Sanofi–Synthelabo, France).

Stock solutions of Pt (1000 mg L⁻¹ in HCl 0.5 mol L⁻¹, Spectrosol BDH Limited Poole, England) and Ir (1000 mg L⁻¹ in HCl 8%, Merck, Darmstadt, Germany) were diluted with HCl 0.24 mol L⁻¹ to prepare standard solutions. Working solutions for Pt analysis were prepared daily and then diluted with HCl 0.24 mol L⁻¹ to final concentration.

Extraction reagents for the cytosol preparation were tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Fluka Chemie), NaCl (Panreac Química SA) and Protease Inhibitor Cocktail for mammalian cell and tissue extracts (Sigma–Aldrich Chemie).

Proteins used for SEC calibration were blue dextran (>2000 kDa), bovine albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) and aprotinine (6.5 kDa) (Sigma–Aldrich Chemie). Metallothionein from rabbit liver (Sigma–Aldrich Chemie, around 6 kDa) was also used.

2.3. Drug administration

All drugs administrations and sacrifices of the rats were carried out under laboratory controlled conditions at the Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid). The animals were handled following the guidelines of the National Council for the Care of the Laboratory Animals. The drugs were administered by intraperitoneal injections. The weight of the rats was around 200 g and the dosages were related to their corporal area. The administration guidelines and dosages of the three drugs used in this study are equivalent to those applied in humans and usually employed for laboratory rats under clinical trials. It consisted of the administration of one dosage of cisplatin (16 mg/m²), carboplatin (450 mg/m²) or oxaliplatin (80 mg/m²) to different groups of seven rats each, corresponding to 10.4 mg/m², 236.5 mg/m² and, 39.3 mg/m² as Pt, respectively. The sacrifice was carried out 3 days after administration and kidney and inner ear extracted for analysis.

2.4. Total Pt determination

Inner ear and kidney samples were dried in a conventional oven up to constant weight (6 h at 55 °C followed by 3 h at 105 °C). After that, samples were homogenised by agate mortar grinding. Dried samples (0.1 g) were placed in PFA advanced composite vessels and digested in a microwave oven with 2 mL of HNO₃ and 0.6 mL of H₂O₂ [24]. The microwave digestion program used for 12 vessels was: 1 min at 250 W, 1 min at 0 W, 5 min at 400 W, 6 min at 600 W and 8 min at 750 W.

The digested samples were evaporated to dryness in Teflon vessels. Two more evaporation steps were performed adding 2 mL of aqua regia and 1 mL of HCl, respectively. The samples were diluted to 5 mL with HCl 0.24 mol L⁻¹ for ICP-MS analysis.

2.5. Pt-biomolecules speciation analysis

2.5.1. Cytosol preparation

About 0.250 g of kidney tissue was dissected and homogenised with a Potter homogenisator in 3 mL of a solution (pH 7.4) containing 10 mM Tris–HCl, 25 mM NaCl and an inhibitor protease cocktail. In the case of inner ear, the entire organ (about 0.2–0.4 g) was homogenised with a polytron in the same extraction solution. The homogenates were centrifuged at 15,000 × g for 20 min at 4 °C to minimise the risk of species degradation or transformation. The supernatant cytosol was filtered through a 0.22 μm Nylon filter.

2.5.2. Monodimensional chromatographic separation

Pt-biomolecules separation was performed by injection of the cytosol in the tandem LC–ICP-MS (SEC) under the conditions indicated in Table 1. The SEC column was calibrated with standards of proteins.

2.5.3. Preconcentration for two-dimensional chromatographic analysis

A pool of cytosol sample from five inner ears was prepared and its volume reduced to 2.5 mL by evaporation under N₂ stream. This sample was injected into the SEC column and fractions with high Pt content were collected (1 mL each). The pool of four identical fractions was subjected to the following preconcentration methods:

- *Evaporation*: 1 mL was evaporated under N₂ stream at ambient temperature for 1 h until a final volume of 400 μL.
- *Freeze-drying*: 1 mL was freeze-dried and the final volume was made up with 400 μL of H₂O.
- *Cut-off filters*: 1 mL was filtered through Centricon YM-3 cut-off filters at 6500 g and 4 °C for 1 h. The retentate was made up to 400 μL with H₂O.

In the three preconcentration methods 250 μL of the preconcentrated samples were injected into the FPLC–ICP-MS system under the conditions shown in Table 1.

- *Focusing*: 1 mL were diluted with water to 2 mL to reduce the ionic strength of the sample and preconcentrated by chromatographic focusing in the head of the Mono-Q H/R 5/5 column, using as mobile phase Tris–HCl 4 mM. The low ionic strength of this mobile phase allowed the preconcentration of the sample in a small band around the first section of the column (focusing). The elution of the focused compounds was performed by increasing the ionic strength under the gradient conditions indicated in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Pt accumulation

Three different drugs, cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, have been tested for Pt accumulation and speciation in rat kidney and inner ear. The dosages administered in this study were the

Table 2
Platinum relative concentration in kidney and inner ear from rats treated with monodoses of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin

	Inner ear	Kidney
Cisplatin	5.4 ± 1.5	33 ± 7
Carboplatin	0.26 ± 0.05	10 ± 3
Oxaliplatin	1.7 ± 0.3	57 ± 4

Results expressed as (mg Pt/kg dried sample)/mg Pt administered (mean ± s_{n-1}), $n = 7$.

equivalent to those used for regular human treatments. Therefore, the amount of Pt injected is different depending on the drug. For data comparison, results are given as Pt concentrations found in the tissue (mg Pt/kg dried tissue) per mg of Pt administered. Table 2 shows the mean of the relative Pt concentration in both organs, after 3 days of each drug administration.

These results are interesting from a pharmacokinetic point of view. It is important to highlight that cisplatin produces the highest accumulation of Pt in the inner ear, but not in the kidney. Considering that cisplatin has been reported as strong ototoxic drug, this may indicate that ototoxicity and Pt accumulation could be related. Pt accumulation after carboplatin administration is the lowest for both tissues. Oxaliplatin shows high accumulation capability for kidney (1.7 times) with respect to the values obtained for cisplatin.

The fact that oxaliplatin, a drug structurally similar to cisplatin, presents higher tendency to be accumulated in kidney, but does not produce the same side effect (as reported in the literature), suggests that the particular drug structure more than the Pt content could be the responsible of alterations in the normal functionality of organs. Therefore, the Pt-biomolecule interactions and the different species formed (speciation) have to be studied in order to understand the causes of the adverse effects.

3.2. Pt-biomolecules speciation

3.2.1. Monodimensional chromatographic separation

The Pt-biomolecule complexes formed in the two target organs have been firstly separated by SEC-ICP-MS. Fig. 1 shows the SEC chromatogram of the prepared inner ear cytosol for the three drugs under study. As can be seen, the main chromatographic peaks for the three samples present similar retention times and are grouped around two molecular weight regions of 25–65 kDa and 12 kDa according to the SEC calibration. However, the relative intensity of both groups (mass balance) present important differences among the different drugs. For cisplatin, most species are present in the 12 kDa region, while with carboplatin the species are mostly present in the 25–65 kDa region. When oxaliplatin is administered, species produced are similarly distributed in both molecular weight groups, being observed a third peak of 8 kDa.

Fig. 2 shows the SEC-ICP-MS chromatogram of kidney cytosol from rats treated with each of the three drugs. Most chromatographic peaks for Pt bound molecules present similar retention times in all three samples and the species found are also distributed in two molecular bands in the regions of 50–60 kDa

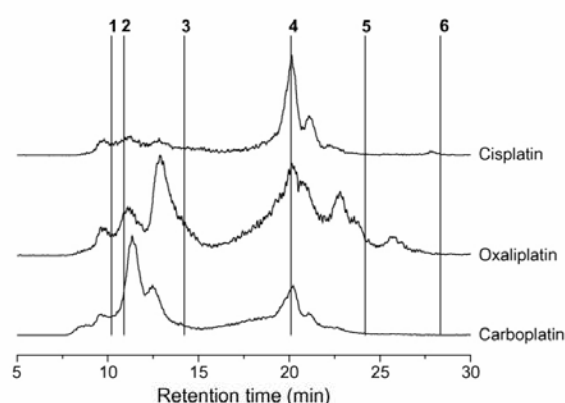


Fig. 1. SEC-ICP-MS chromatograms of inner ear cytosol from rats treated with cisplatin, oxaliplatin or carboplatin. Numbers correspond to molecular weight calibration markers: (1) 70 kDa, (2) 66 kDa, (3) 29 kDa, (4) 12.4 kDa, (5) 6.5 kDa and (6) 3 kDa.

and 20 kDa. However, in this case, the bands present similar relative mass balance profiles for the three drugs, being the intensity for the low molecular weight band higher. In oxaliplatin treated samples, a third peak at 8 kDa appears as described earlier for the inner ear sample (Fig. 1).

To check whether low molecular weight Pt binding proteins could correspond to MTs, a standard solution of rabbit liver MT was injected on the SEC column under the same chromatographic conditions. Fig. 3 shows the comparative chromatograms of the MT standard (^{66}Zn and ^{111}Cd were monitored), and from the inner ear and kidney cytosols from rats treated with cisplatin (^{66}Zn and ^{195}Pt were monitored). In the case of kidney cytosols a wide peak of a Pt-biomolecule elutes in the MT region, however the Zn signal is not present, suggesting the possible replacement of Zn by the Pt drug. In the case of the inner ear cytosols, although a small fraction of Pt could be bound to the MTs, most of the drug is bounded to other biomolecules with a higher molecular weight.

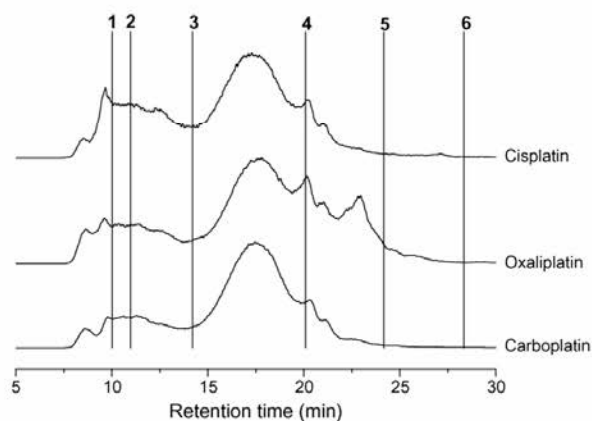


Fig. 2. SEC-ICP-MS chromatograms of kidney cytosol from rats treated with cisplatin, oxaliplatin or carboplatin. Numbers correspond to the molecular weight calibration markers: (1) 70 kDa, (2) 66 kDa, (3) 29 kDa, (4) 12.4 kDa, (5) 6.5 kDa and (6) 3 kDa.

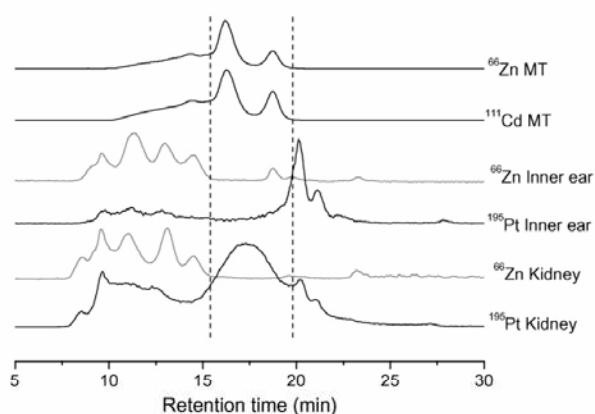


Fig. 3. SEC-ICP-MS chromatograms of rabbit liver MT standard, and inner ear and kidney cytosol from rats treated with cisplatin.

Low amounts of Pt-species have been found above 70 kDa (top of the calibration range) for both tissues. It is important to point out that the chromatograms obtained by SEC fractionation for both organs show the absence of free-drug (elution time about 50 min). This means that the drug present in the cytosol is mostly bound to biomolecules. These results agree with those reported by Szpunar et al. [8], which show that very low amounts of free cisplatin remained in blood after 24 h incubation.

3.2.2. Preconcentration for two-dimensional chromatographic analysis

The poor resolution attained by the SEC column made necessary to resolve the different Pt-species, present in these wide peaks, by a second chromatographic dimension (2D). Before this 2D separation could be performed, a preconcentration step of the SEC fractions of interest was imperative.

A systematic study to check the efficiency of four different methods for Pt-biomolecules preconcentration has been carried out. Established methodologies such as, evaporation, freeze-drying, filtration through cut-off filters [25] and focusing on the head of the ion exchange column were tested.

Identical fractions representative of compounds with high and low molecular weight (fraction 9 and 17 with retention times of 11.25 and 21.25 min, respectively), of inner ear cytosol from rats treated with cisplatin, were subjected to the preconcentration methodology reported in Section 2 and resolved by FPLC-ICP-MS. Fig. 4a shows the comparative ion exchange chromatograms obtained by the four preconcentration methods for the fraction 9. A similar peak distribution is observed for the four methods tested. However, column-head focusing shows the highest sensitivity and also a slight improvement on resolution, probably due to the lower salt content of the sample. In this case, there is a delay on the retention time of the peaks, also due to the different salt content of the focused sample. When cut-off filters were used, an important loss of sensitivity (especially for compounds of low retention time) was observed. This was, probably, due to adsorption of the Pt-biocompounds in the filter, so, it was discarded for further experiments.

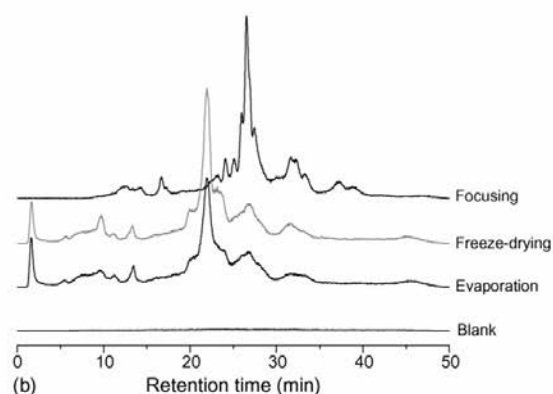
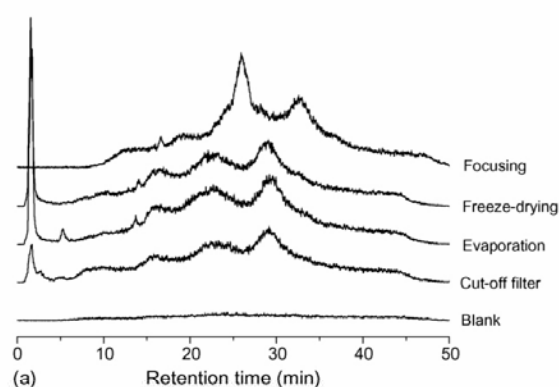


Fig. 4. Two-dimensional FPLC-ICP-MS chromatograms of SEC fractions of inner ear cytosol from rats treated with cisplatin, obtained by four different preconcentration methods: chromatographic focusing, cut-off filters, evaporation and freeze-drying. (a) Fraction 9 (11.25 min retention time) and (b) fraction 17 (21.25 min retention time).

Fig. 4b presents the ion exchange chromatograms obtained for fraction 17 where again head focusing shows the best results.

It was observed that at least three fractions coming from the SEC column could be simultaneously preconcentrated by focusing without over-loading the FPLC ion exchange column used and without producing any peak widening. The main advantages of focusing on the column head are high pre-concentration capacity, simplicity, fast procedure, low sample manipulation and no need of additional instrumentation. Besides, the risk of species transformation involved in this preconcentration technique is significantly reduced in comparison with others. Thus, it was selected for further experiments.

Fig. 5 shows the chromatogram for the second dimension of the highest Pt containing fractions (retention time 20 min, 12 kDa) eluting from the SEC column. After the SEC separation (Fig. 1), three samples from cisplatin treated inner ear cytosol were pooled and focused in the head of the anion exchange column. This chromatogram still presents a high degree of complexity, although the resolution was improved. At least seven well resolved Pt-species were found. Owing to that complexity it is necessary to develop new dimensions to purify these species for further identification.

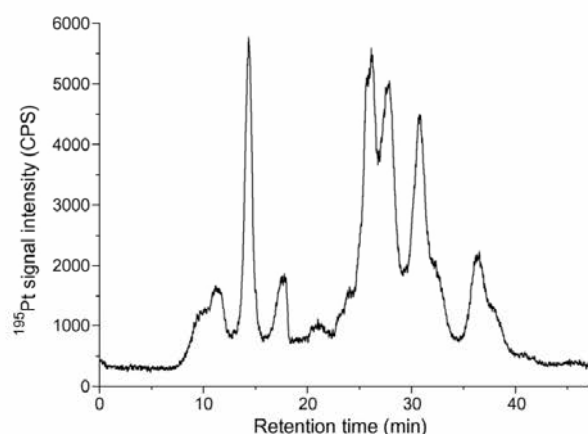


Fig. 5. Two-dimensional FPLC–ICP–MS chromatogram, after sample focusing on the head of the column of the 12 kDa fraction (20 min retention time) of SEC separated inner ear cytosol from rats treated with cisplatin.

There are Pt-compounds which are not retained in the FPLC column used in the second dimension, and therefore were lost in the focusing. These compounds elute all together in the death volume, as it can be observed in Fig. 4a and b for non-focusing preconcentration methods. Different types of chromatographic separations, like cation exchange or reverse phase, will be of use for such compounds.

4. Conclusions

The bioaccumulation studies of Pt-based drugs in rat inner ear and kidney shows a sound difference between these two organs and for the different drugs administrated. The relative accumulation of cisplatin metabolites is higher than that of oxaliplatin metabolites for inner ear, but not for kidney. The establishment of a direct relation between Pt accumulation and toxicity could be true for the inner ear. The relative accumulation of carboplatin is the lowest in both organs. Thus, metallomic studies are necessary to explain the interactions causing the toxic effects of these drugs. In kidney cytosol, MTs seem to be present in the low molecular weight fraction of SEC separated Pt-biomolecules.

The combination of SEC and anion exchange chromatography can highlight the differences between the species found in kidney and inner ear when the rats have been treated with cisplatin. The focusing of the Pt-biocompounds on the head of the anion exchange column has demonstrated several advantages over other preconcentration methods: higher preconcentration capacity, lower sample manipulation and therefore lower risk of species transformation.

The two-dimensional use of LC techniques improved the separation of Pt-biospecies for future identifications. The

identification of target Pt bound biocompounds will be the result of a combination of multidimensional orthogonal separations and structural mass spectrometry techniques using ionization techniques like ESI and MALDI.

Acknowledgements

This work has been financial supported by the CICYT proyect BQU-2002-01348. The authors gratefully acknowledge the Spanish Ministry of Education and Science for the predoctoral fellowship of the PhD student DE.

References

- [1] M.J. Zelefsky, D.H. Kraus, D.G. Pfister, A. Raben, J.P. Shah, E.W. Strong, R.H. Spiro, G.J. Bosl, L.B. Harrison, *Head Neck* 18 (1996) 405.
- [2] N.D. Doolittle, L.L. Muldoon, R.E. Brummett, R.M. Tyson, C. Lacy, J.S. Bubalo, D.F. Kraemer, M.C. Heinrich, J.A. Henry, E.A. Neuwelt, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 493.
- [3] L. Alinari, G. Musuraca, M. Tani, V. Stefoni, A. Gabriele, E. Marchi, M. Fina, A. De Vivo, S. Pileri, M. Baccarani, P.L. Zinzani, *Leuk. Lymphoma* 46 (2005) 1437.
- [4] D. Esteban-Fernández, M.M. Gómez-Gómez, J.M. Verdaguer, R. Ramírez, M.A. Palacios, *J. Anal. Toxicol.*, submitted for publication.
- [5] J. Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 54.
- [6] J. Szpunar, *Analyst* 130 (2005) 442.
- [7] J. Ruiz Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3765.
- [8] J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B.K. Keppler, R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 135.
- [9] V. Vacchina, L. Torti, C. Allievi, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 884.
- [10] J. Szpunar, *Analyst* 125 (2000) 963.
- [11] R.R. Barefoot, *J. Chromatogr. B* 751 (2001) 205.
- [12] M. Verschaagen, K. van der Born, T.H. Ursula Zwiers, W.J.F. van der Vijgh, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 273.
- [13] A. Andersson, H. Ehrsson, *J. Chromatogr. B* 652 (1994) 203.
- [14] O. Heudi, A. Cailleux, P. Allain, *Chromatographia* 44 (1997) 19.
- [15] M. El-Khateeb, T.G. Appleton, B.G. Charles, L.R. Gahan, *J. Pharmacol. Sci.* 88 (1999) 319.
- [16] Z. Zhao, K. Tepperman, J.G. Dorsey, R.C. Elder, *J. Chromatogr. B* 615 (1993) 83.
- [17] J.C. Dabrowiak, J. Goodisman, A. Souid, *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 1378.
- [18] D. Hagrman, J. Goodisman, J.C. Dabrowiak, A. Souid, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 916.
- [19] A. Pattanaik, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, F. Shaw, D.H. Petering, A. Hitchcock, L. Saryan, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16121.
- [20] Y. Zhao, R. Mandal, X. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1956.
- [21] M. Nordberg, *Talanta* 46 (1998) 243.
- [22] K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* 151 (1996) 53.
- [23] R. Lobinski, H. Chassaigne, J. Szpunar, *Talanta* 46 (1998) 271.
- [24] S.V.M. Maharaj, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 84.
- [25] A. Rodríguez-Cea, M.R. Fernández de la Campa, E. Blanco González, B. Andón Fernández, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1357.

C.2.2. Trabajo 3: SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules (J. Anal. At. Spectrom., 22 (2007) 1113-1121)

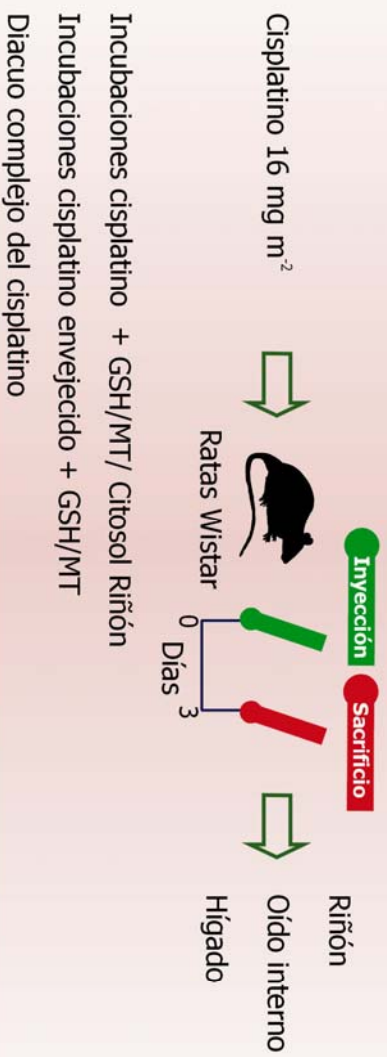
El estudio de la interacción del cisplatino con biomoléculas presentes en el citosol celular, como son la MT y el GSH, fue el objeto de este tercer trabajo. Estas biomoléculas son de extremado interés por su relación con procesos de detoxificación y resistencia al fármaco. Se abordó una estrategia combinada de seguimiento por SEC-ICP-MS e identificación mediante ESI-LIT, de los aductos de Pt formados en incubaciones *in vitro* llevadas a cabo en medios, concentraciones y proporciones cercanas a las fisiológicas (Esquema experimental 3). Finalmente se aplicó la separación puesta a punto, a muestras reales de citosol de hígado, riñón y oído interno.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la identificación de las distintas especies de evolución del cisplatino en el medio citosólico. El bajo contenido salino de este medio permite la hidrólisis del cisplatino. Mediante SEC-ICP-MS se separaron los derivados del cisplatino y se identificaron mediante ESI-LIT. Los derivados identificados constataron la existencia de cisplatino intacto y de su monoacuo complejo, así como un dímero del fármaco que no corresponde a la forma oligomérica descrita en la bibliografía⁴⁰. También se demostró la ausencia del diacuo complejo en el medio de reacción, hecho que entra en contradicción con lo postulado por ciertos autores³⁷.

Los análisis mediante SEC-ICP-MS y ESI-LIT de las incubaciones del fármaco con MT y GSH, mostraron las especies reactivas del cisplatino para ambas biomoléculas. Además la detección multi-elemental propia del ICP-MS permitió demostrar el desplazamiento del Zn presente en la MT, cuando ésta se une al fármaco. Tal comportamiento no fue observado para el Cd de la MT bajo las concentraciones ensayadas.

Por último se aplicaron los desarrollos metodológicos al análisis de citosoles de órganos de ratas tratadas con cisplatino o citosoles blancos incubados *in vitro* con el fármaco. La concordancia en los tiempos de retención obtenidos mediante SEC-ICP-MS y el aumento de la intensidad de ciertos picos al adicionar GSH en los citosoles preparados, permitió plantear la posible existencia de las especies anteriormente caracterizadas en las incubaciones.

Esquema experimental 3 (Trabajo 3)



Incubaciones con GSH y MT



SEC-ICP-MS

Desalado con cartuchos C₁₈

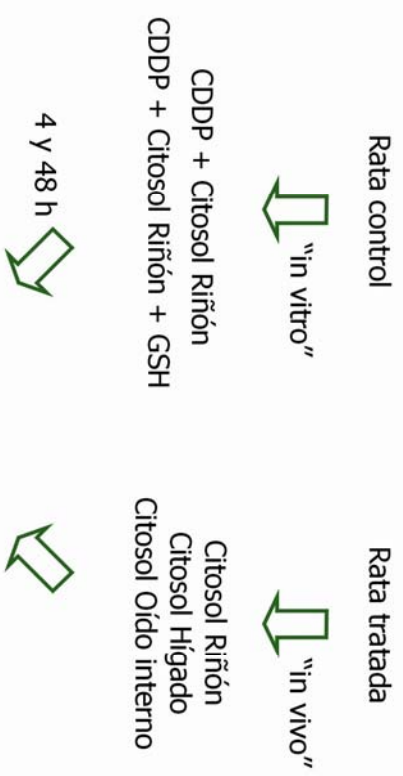


ESI-LIT o FT-ICR-MS

Diacuo complejo del CDDP



Muestras reales



SEC-ICP-MS

Trabajo 3

SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22 (2007) 1113-1121

Este trabajo formó parte de la Comunicación Oral presentada en el congreso:

“Winter Conference 2007” en febrero de 2007, Taormina, Italia

y de la Comunicación Oral presentada en el congreso:

“XIV Reunión nacional de la Sociedad Española de Química Analítica” en septiembre de 2007, Pollensa,

España

SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules†

D. Esteban-Fernández,^{‡a} B. Cañas,^{‡a} I. Pizarro,^b M. A. Palacios^a and M. M. Gómez-Gómez^{*a}

Received 25th April 2007, Accepted 20th June 2007

First published as an Advance Article on the web 6th July 2007

DOI: 10.1039/b706251f

Most of cisplatin's cytotoxic properties are due to the interaction of the drug with DNA. However, other biological molecules present in the cell cytosol, such as MT (metallothionein) and GSH (glutathione), are potential targets for cisplatin and have been related to its side-effects or with the cellular resistance mechanisms to the drug. Experiments simulating physiological conditions have been performed to study the specific cisplatin metabolites which interact with GSH and MT and to characterize the different drug–biomolecule adducts over time. A combination of size exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-ICP-MS) and electrospray ionization–mass spectrometry (ESI-MS) techniques has been used to provide sensible multi-elemental detection and structural information of the species of interest. Time dependent transformation of 10 μ M cisplatin at neutral pH (7.4) produces different concentrations of the mono-aquo and oligomeric derivatives, as could be confirmed by ESI-MS. No di-aquo derivative was seen to be produced under these conditions at any of the incubation times used. Cisplatin and the oligomeric derivative were incubated with GSH and MT at different drug:biomolecule ratios. Adducts from cisplatin–GSH (1:500) and from cisplatin–MT (1:10) incubations were characterized by SEC-ICP-MS. While both GSH and MT reacted with cisplatin producing different compounds, only GSH reacted with the oligomeric derivative of cisplatin. SEC-ICP-MS experiments showed that, under neutral pH conditions, Cd atoms remained bound to the cisplatin:MT adducts, but Zn atoms were lost. Results were compared with those obtained by *in vitro* and *in vivo* experiments with rat kidney, liver and inner ear cytosols.

Introduction

During the last thirty years, cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum(II)) has been widely used in cancer treatments, mainly against ovarian, testicular, head and neck cancers.¹ Nevertheless, side-effects such as nephro-, neuro- and ototoxicity are common, and there are limitations on the dosages allowed.² The study of the accumulation, distribution and biotransformation of the drug in the affected organs³ is necessary to understand the chemical basis of organ injury and the resistance of some tumours to cisplatin treatments. Once cisplatin has been administered by intravenous injection, it remains unaltered in the bloodstream, either free or bound to proteins such as albumin.⁴ The cell uptake consists mainly

of a passive diffusion across the cell membranes into the cytoplasm. Inside the cells, reactive metabolites are formed by hydrolysis of cisplatin, due to the low chloride concentration present in the cytoplasm.⁵ The cytotoxic activity involves these reactive metabolites derived from cisplatin and seems to correlate with the amount bound to DNA.⁶ Covalent adducts can be formed by interaction of hydrolysed cisplatin with the N-7 from guanine (G) or adenine (A) DNA bases. The stable mono- and bi-functional adducts formed produce cytotoxic lesions affecting cell replication.⁷ Although DNA is considered to be the target of cisplatin, thiols in peptides and proteins, including enzymes present in the cytoplasm, can react with the drug due to a preferential binding to S-donor groups.⁸ The reaction of cisplatin with cell endogenous thiols limits the amount of drug available for DNA binding. A decrease in the anticancer activity of the drug has been related to the reaction of cisplatin with GSH (glutathione), MT (metallothionein) and other thiols in proteins.⁹ A continued exposure to cisplatin up-regulates the amount of MT, GSH and other cellular thiols, which increase cell resistance to cisplatin.¹⁰ Moreover, inducing MT expression by metals, such as Zn and Cd, makes cells less sensitive to platinum drugs with a concomitant decrease in drug toxicity. On the contrary, depletion of GSH

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain. E-mail: mmgomez@quim.ucm.es; Fax: +34-91-394-43-29; Tel: +34-91-394-51-46

^b Laboratory of Bioinorganic and Environmental Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, University of Antofagasta, Antofagasta, Chile

† Presented at the 2007 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Taormina, Italy, February 18–23, 2007.

‡ Two authors have contributed equally.

produces lower cellular resistance to the drug and higher cytotoxicity.⁸

Kinetic parameters in the reaction between platinum drugs and GSH have been extensively studied.^{11,12} The reaction with sulfur containing peptides has been studied by ESI-MS (electrospray ionisation mass spectrometry) and the structures of adducts formed between the cisplatin derivatives and GSH¹³ have been postulated. When cisplatin reacts with MT at neutral pH, Cd and Pt may remain simultaneously bound to the protein.¹⁴ Up to 11 metal atoms, 4 Cd plus 7 Pt, were reported to coexist bound to a single MT molecule. It seems that Pt binding is not solely mediated by the 20 cysteine residues localized in the two pockets, a and b, implicated in the binding of seven metal atoms (Zn, Cd, Cu) to MT. N and O donors have also been reported as being implicated in Pt binding,¹⁵ although the structures of the drug metabolites which bind to MT have not been described. The preferential expression of MT in normal cells, when compared with cancer cells, has been previously reported.¹⁴ This fact may have a potential application in cancer chemotherapy by reducing the toxicity of cisplatin in normal cells while maintaining its efficiency against cancer cells.

Different separation procedures have been evaluated for the analysis of the cisplatin metabolites which can be produced inside the cell. Reverse phase¹⁶ has been widely used, although an ion pair is needed for a proper retention of these compounds.¹⁷ Good resolution between cisplatin and the mono-aquo and di-aquo derivatives has been achieved using a new pentafluorophenylpropyl functionalised silica stationary phase which offers a mixed-retention mechanism, reverse phase and ionic exchange.¹⁸

In the present work LC-ICP-MS (liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry) and ESI-MS have been combined to obtain new information on the cisplatin metabolites and on the drug interaction with relevant cytosolic biomolecules. The chromatographic separations have been performed by an SEC (size exclusion chromatography) column, fractionating in the low molecular weight range, coupled to an ICP-MS detector for the multi-elemental monitoring of the cisplatin–biomolecule binding in the $\mu\text{g L}^{-1}$ range. ESI-MS offers structural information on the specific species formed and the characteristics of the cisplatin–biomolecule binding. This information is useful for a better understanding of drug toxicity and cellular resistance.¹⁹

This paper has been focused on (a) the study of the metabolites of cisplatin produced with time under physiological, cell like, pH and $[\text{Cl}^-]$ conditions, (b) the characterization of the products of the *in vitro* incubation of cisplatin with GSH and MT under the same physiological conditions, looking for the drug metabolites reacting with each of these biomolecules, and finally (c) the study of the detected adducts in rats' cytosols from *in vitro* and *in vivo* experiments.

Experimental

Standards and reagents

All solutions were prepared in de-ionised water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA). High-purity nitric

acid, used for pH adjustment of the chromatographic mobile phase, was obtained by distillation of the analytical-grade reagent (Merck).

Extraction, incubation and chromatographic reagents were tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Fluka Chemie) and NaCl (Panreac Quimica S.A.). A protease inhibitor cocktail for mammalian cell and tissue extracts (Sigma–Aldrich Chemie) was used for cytosol extraction. Acetonitrile (Carlo Erba Reactifs-SDS) and formic acid (85%, Panreac Quimica S.A.) were used for ESI-MS analysis.

Cisplatin (Sigma–Aldrich Chemie), methallothionein from rabbit liver (Sigma–Aldrich Chemie, around 6 kDa) and reduced L-glutathione (minimum 99%, Sigma–Aldrich Chemie) were also used.

Instrumentation

For the determination of Pt, a quadrupole ICP-MS Thermo X-Series (Thermo Electron, Winsford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard-type nebulizer, a Fassel torch and an impact bead quartz spray chamber cooled by a Peltier system, was employed. ICP-MS operating conditions were: forward power 1250 W, plasma gas 15 L min^{-1} , auxiliary gas 0.73 L min^{-1} , nebuliser gas 0.85 L min^{-1} , channels per amu 10 and integration time 0.6 ms.

For the chromatographic separations, a high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodyne, USA), was used as the delivery system. Separation of Pt-biomolecules was performed by SEC using a BioBasic SEC-60 column (Thermo Electron Corporation, separation range of 0.1–6 kDa, $300 \times 7.8 \text{ mm id}$). The mobile phase was 25 mM NaCl and 10 mM Tris- NO_3 (pH 7.4), the flow rate 1 mL min^{-1} and the injection volume 100 μL . The ICP-MS transient signal mode was set to chromatographic acquisitions, monitoring m/z 66(Zn), 111(Cd), 194(Pt) and 195(Pt).

MS experiments were performed using a linear ion trap (LTQ) from Thermo Electron (San Jose, CA, USA) equipped with an ESI source. High resolution spectra were taken with a FT-ICR-MS from Bruker (Coventry, UK).

For ESI analysis samples were prepared in 30–70% acetonitrile and 0.1% formic acid. Cisplatin derivatives and GSH containing samples were diluted with the appropriate solvent to a final saline concentration below 200 μM . MT samples were de-salted with C_{18} cartridges (Supelco cartridges Discovery Bio Wide Pore $20 \times 2.1 \text{ mm id}$).

In vitro incubations

GSH and MT were incubated with cisplatin at 37 °C in a buffer containing 4.62 mM NaCl and 10 mM Tris- NO_3 (pH 7.4), to mimic the cytosol conditions. Cisplatin, at concentrations ranging from 1 to 10 μM , was mixed with GSH (10 and 500 μM) and/or MT (10 μM) for 96 h. Aliquots for analysis were taken at 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h. The same conditions were used for the incubations of rat kidney cytosols with 1 μM cisplatin and 500 μM GSH.

Prior to SEC analysis, the incubated solutions were diluted 1:1 with water.

Preparation of “aged” cisplatin

Cisplatin was incubated in 10 mM Tris-NO₃ buffer (pH 7.4) supplemented with 4.62 mM NaCl, at 37 °C. After allowing the evolution of the drug for 96 h, the compound produced (eluting at a higher retention time under the SEC chromatographic conditions described earlier) was called “aged” cisplatin.

Preparation of the di-aquo derivative of cisplatin

The di-aquo derivative of cisplatin was obtained by reacting 50 mM cisplatin, dissolved in water, with two equivalents of AgNO₃.¹³ After overnight stirring of the mixture in the dark, a white AgCl precipitate was formed and removed by centrifugation. The supernatant, containing the di-aquo derivative, was analysed by SEC-ICP-MS and ESI-MS.

Drug administration

Drug administration and sacrifice of the rats were carried out under laboratory controlled conditions at the Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid). The animals were handled following the guidelines of the National Council for the Care of the Laboratory Animals. The weight of the rats was around 200 g and the dosages were related to their corporal area. Drugs were administered by intraperitoneal injection. Cisplatin dosages were those employed for laboratory rats under clinical trials, which are equivalent to those usually applied in human therapeutics. The method consisted in the administration of one dosage of cisplatin (16 mg m⁻²), corresponding to 10.4 mg m⁻² of Pt. The sacrifice was carried out three days after administration and inner ear, kidney and liver were extracted for analysis.

Cytosol preparation

About 0.250 g of kidney and liver tissues were dissected and homogenised in a Potter with 3 mL of a buffer containing 10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl and 12.5 μL of a protease inhibitor cocktail. In the case of the inner ear, the entire organ (about 0.2–0.4 g) was homogenised with a Polytron using the same buffer. The homogenates were centrifuged at 15000g for 40 min. All the preparative steps were performed at 4 °C to minimise the risk of species degradation or transformation. For *in vivo* studies, the cytosolic fraction was heated up to 65 °C for 15 min, centrifuged at 15000g for 30 min, and the supernatant then filtered through a 0.22 μm Nylon filter.

Results and discussion

Time dependent transformation of cisplatin at neutral pH

10 μM cisplatin was incubated at a pH 7.4 for 96 h following the conditions described in the Experimental section. The NaCl concentration was chosen to mimic the one present in the cellular cytoplasm. Aliquots were taken for analysis after 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h. SEC was used for the separation of the produced compounds and platinum selective detection was performed by ICP-MS.

At low chloride concentration, one of the chlorine atoms in cisplatin (peak C-1 in Fig. 1) was gradually substituted by a

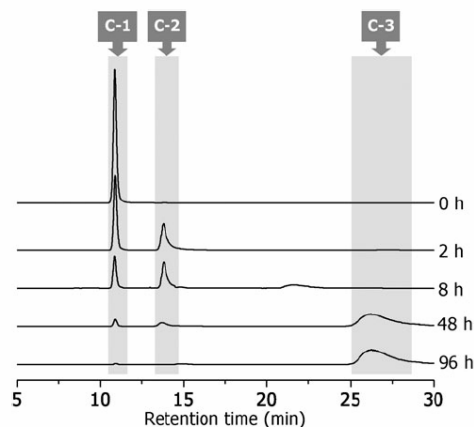


Fig. 1 SEC-ICP-MS (¹⁹⁵Pt) chromatograms for samples of 10 μM cisplatin incubated under cytosolic conditions over time.

water molecule with the formation of the mono-aquo derivative (peak C-2 in Fig. 1). After an incubation time of 2 h 42% of the original cisplatin had disappeared and after 96 h only 0.6% remained. The mono-aquo derivative is visible at very short incubation times, reaching a maximum after 2–8 h. For a period of several hours there is an equilibrium in the formation of compound C-2 and its conversion into an unknown derivative eluting at a longer retention time (peak C-3 in Fig. 1). It must be considered that, in this SEC column, a mixed separation mechanism occurs and hydrophilic interaction greatly contributes to this long retention time.

The structures of the three peaks were studied by mass spectrometry using an ion-trap mass spectrometer provided with an ESI source (Fig. 2(a), 2(b), 2(c) and 2(d)). The theoretical isotopic pattern for the proposed structures appears close to the mass spectrum in each figure. At incubation time 0 h (Fig. 2(a)) the most prominent ion cluster with a Pt isotopic pattern was observed at m/z 419.9–425.9. This cluster was attributed to an adduct of the intact cisplatin with one tris-(hydroxymethyl)aminomethane molecule from the incubation medium, *i.e.*, [(Pt(NH₃)₂Cl₂)(tris)]⁺. The same analysis at an incubation time of 4 h shows a decrease in [(Pt(NH₃)₂Cl₂)(tris)]⁺ and a new ion cluster at m/z 304.00–309.96 (Fig. 2(b)) which probably corresponds to the mono-aquo complex in which the water molecule has been substituted by one molecule of acetonitrile (CH₃CN), *i.e.*, [Pt(NH₃)Cl(CH₃CN)]⁺. After 96 h of incubation, ESI-MS shows the signal of a Pt containing compound corresponding to an oligomeric derivative with an isotopic pattern matching the theoretical pattern of a compound with three Cl and two Pt atoms (Fig. 2(c)), which probably corresponds to peak C-3. Based on the theoretical isotopic patterns and on the CID (collision induced dissociation) experiments (MS² and MS³) from the ion clusters at m/z 681.68–690.64 and 383.96–388.0 (Fig. 2 and data not shown), a structure for the oligomeric compound was proposed: [(Pt(NH₃)₂-Cl(tris))(Pt(NH₃)₂Cl₂)]⁺, corresponding to a dimer of cisplatin and the mono-aquo derivative, with a water molecule substituted by Tris. The predominant ion cluster at m/z 383.96–388.0 in the initial spectrum (Fig. 2(c)) and in the

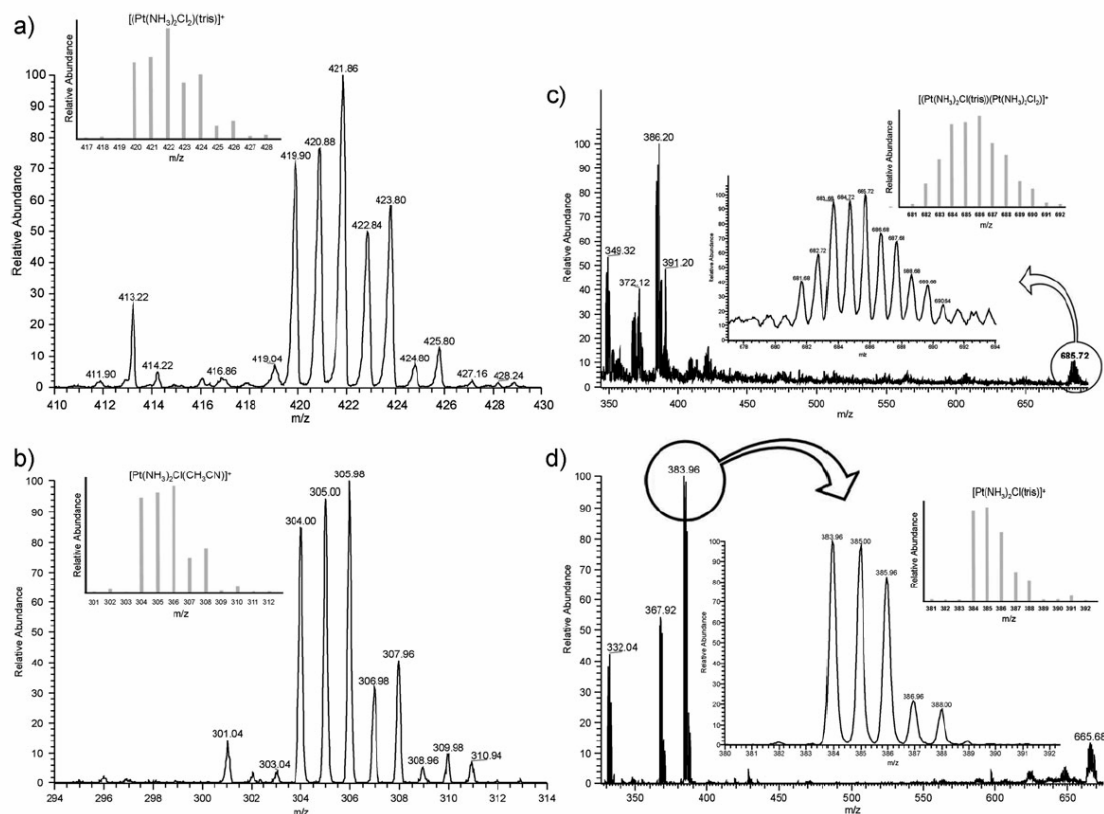


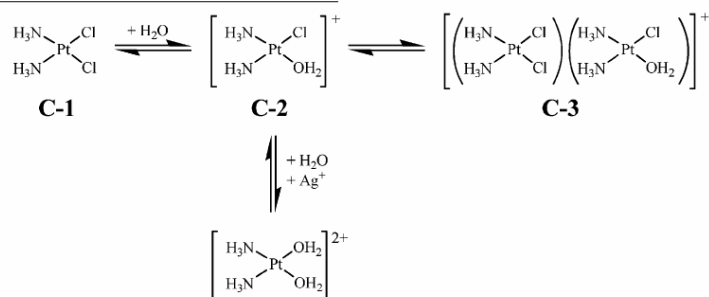
Fig. 2 ESI-MS spectrum of 100 μM cisplatin incubated over (a) 0 h (b) 4 h and (c) 96 h. (d) MS^2 spectrum for the ion cluster at m/z 681.68–690.64 for 96 h.

MS^2 fragmentation spectrum (Fig. 2(d)) was identified as $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{tris})]^+$. After 96 h, most of the platinum was recovered and found incorporated into this oligomeric derivative. Other authors have found oligomeric cisplatin derivatives^{20,21} even at concentrations as low as 1 mM of initial cisplatin.¹⁶

The di-aquo compound is not observed at any incubation time. As was reported earlier, only when the chloride ion is removed with silver is this compound formed.^{13,22} The di-aquo derivative of cisplatin was prepared as described in the Experimental section and analysed by SEC-ICP-MS and by ESI-MS. The retention time of the di-aquo chromatographic peak ($t_R = 11.8$ min) does not correspond to any of the detected peaks in the chromatograms from the

samples produced by the time incubations of cisplatin (data not shown). Fig. 3 shows the most prominent ion cluster for the di-aquo cisplatin species (m/z 308.98–312.96) produced by ESI-MS. In this mass spectrum a chlorine free Pt isotopic pattern is observed. Nevertheless, this pattern was not found in any of the cisplatin solutions after incubation, demonstrating the absence of the di-aquo cisplatin derivative under the incubation conditions used in the present study. These results are in concordance with those published earlier by Dabrowiak *et al.*,¹² who reported that only a small amount of cisplatin was transformed into the di-aquo derivative after a 48 h incubation under similar conditions.

The evolution of cisplatin can be summarized as follows:



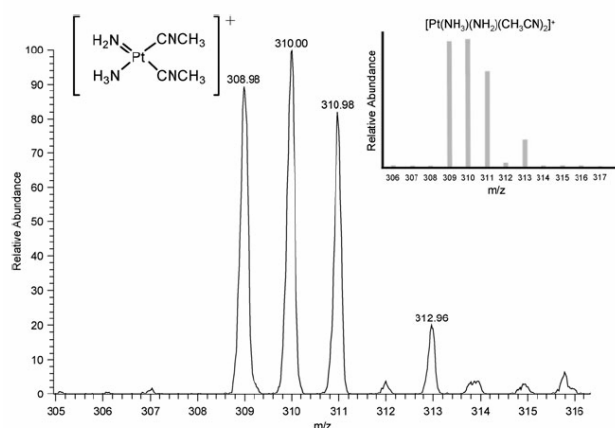


Fig. 3 ESI-MS spectrum of the di-aquo cisplatin derivative at a concentration of 100 μM .

Interaction between cisplatin and GSH

Cisplatin and GSH were incubated under the previously described conditions for intervals of time between 0 and 96 h. The cisplatin concentrations used were between 1 and 10 μM , while GSH concentrations were set between 10 and 500 μM . GSH to cisplatin concentration ratios were in the 1–500 range. Parallel experiments were carried out by incubating “aged” cisplatin with GSH. The species produced were separated and analysed by SEC-ICP-MS. A cisplatin:GSH ratio of about 1:500 was chosen because, approximately, it can be found in cells from treated patients. Nevertheless, the results obtained for different drug:GSH ratios are similar.

Selective detection of GSH-bound cisplatin (Fig. 4) showed several peaks eluting early in the chromatographic system used, the species observed at 6.5 and 9 min being the most relevant. The intensity for peak G-2, eluting at $t_{\text{R}} = 9$ min, increases linearly with the reaction time up to 48 h, decreasing at longer incubation times. On the contrary, the signal for the

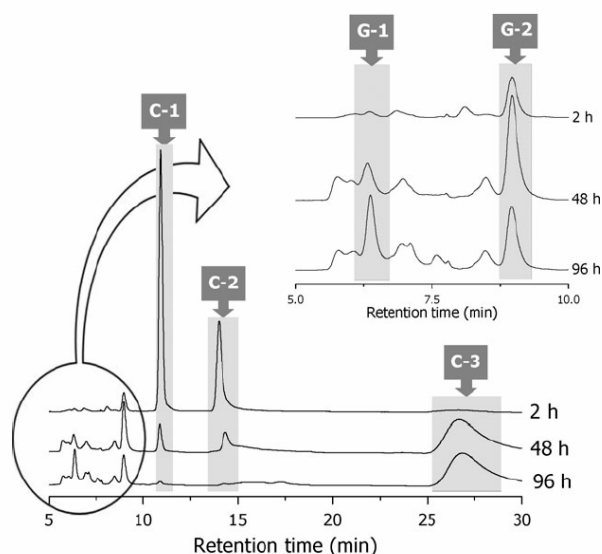


Fig. 4 SEC-ICP-MS (^{195}Pt) chromatograms of 1 μM cisplatin incubated with 500 μM GSH over time.

peak eluting at 6.5 (peak G-1 in Fig. 4) increased at longer reaction times, suggesting that this peak is not formed directly from cisplatin and was, probably, produced from an intermediate.

During the time in which cisplatin and GSH were allowed to react, the former evolved as was previously described, being mainly converted to compound C-3. Even at GSH:cisplatin ratios as high as 500, a high percentage of cisplatin evolved to the above cited peak C-3 and did not react with GSH. The intact drug and the mono-aquo derivative disappeared almost completely after 96 h of incubation.

When GSH was incubated with “aged” cisplatin (C-3 peak), the reaction products, analysed by SEC-ICP-MS, were quite different (data not shown). In this case, most of the Pt was slowly incorporated into the compound G-1, while G-2 was not produced. Ageing converts cisplatin into a form that reacts more slowly with GSH than cisplatin itself. The reaction is a slow process; after 4 h there is still a great percentage of unreacted “aged” cisplatin, while after 48 h the reaction is almost complete.

Cisplatin reacts in water to produce the mono-aquo and di-aquo forms of the drug.²² When the chloride concentration in the medium is not very high, *e.g.* 4.62 mM, cisplatin is transformed to the mono-aquo form at a very slow rate. After 2–4 h of incubation the concentrations of the mono-aquo derivative and the remaining cisplatin are almost similar (Fig. 1). Because the $t_{1/2}$ for the reaction of cisplatin with GSH is approximately 50 min,¹² the major species reacting with GSH is the intact drug (peak C-1 in Fig. 1). As stated earlier, when solutions of cisplatin are incubated for 96 h at low chloride concentration (4.62 mM) before the addition of GSH, it is mainly converted to the oligomeric form plus some remaining mono-aquo specie (C-2). It seems that this oligomeric compound derived from the mono-aquo form of cisplatin reacted with GSH, producing mainly the G-1 derivative. Compound G-2, which is produced in the early steps of the reaction between cisplatin and GSH, is not formed when “aged” cisplatin is used.

Only an ion cluster with a Pt isotopic pattern (m/z 726.18–732.09) could be found in the analysis by ESI-MS of the 48 h incubation mixture of cisplatin with GSH (1:500) (Fig. 5). That ion cluster corresponds to a fragment from the precursor $[\text{GSH-3H} + 2\text{Pt} + 4\text{NH}_3]^+$, described by Miao *et al.*,¹³ under non-physiological conditions in which two NH_3 have been lost, probably by fragmentation in the ESI source. MS^2 fragmentation (Fig. 5) of the ion $[\text{GSH-3H} + 2\text{Pt} + 2\text{NH}_3]^+$ produced losses of NH_3 , 2NH_3 and $\text{NH}_3 + \text{CO}_2$, which corroborated the proposed structure. Therefore, this adduct can also be produced under physiological conditions and corresponds to G-2, the predominant drug–GSH adduct observed at 48 h by SEC-ICP-MS.

Interaction between cisplatin and MT

Cisplatin (between 1 and 10 μM) and 10 μM MT were incubated under physiological conditions for periods of time ranging from 0 to 96 h at cisplatin:MT molar ratios between 1:1 and 1:10. Experiments using SEC-ICP-MS proved the incorporation of Pt into MT (M-1 in

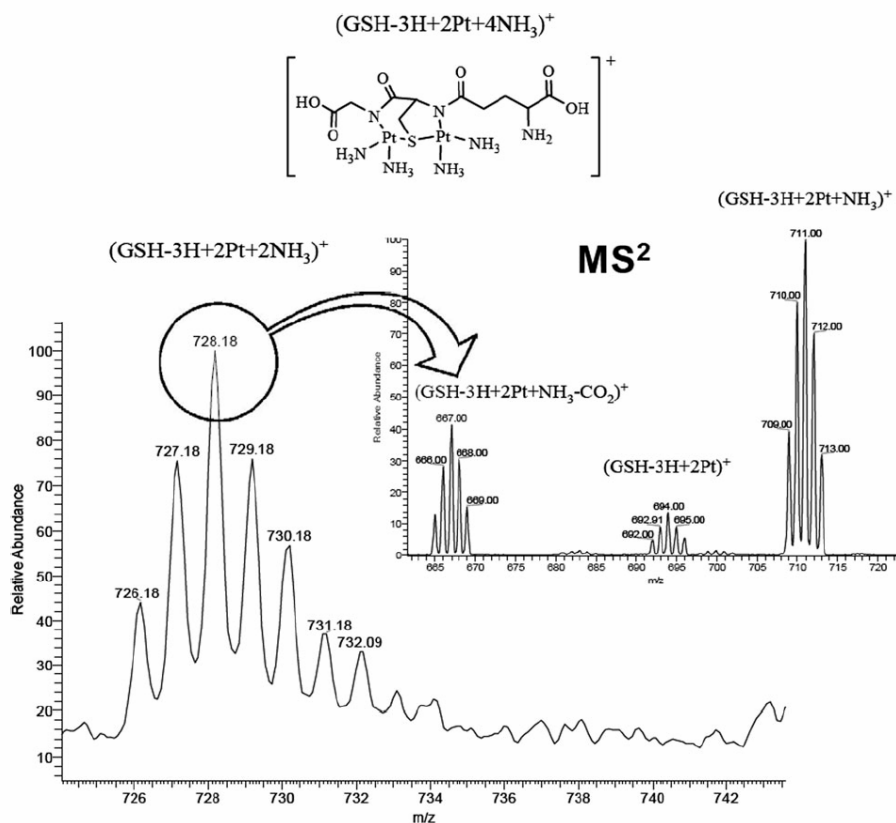


Fig. 5 ESI-MS spectrum of 100 μM cisplatin incubated with 50 mM GSH for 48 h and MS² spectrum of the precursor ion cluster at m/z 726.18–732.09, which corresponds to the proposed structure $[\text{GSH-3H} + 2\text{Pt} + 2\text{NH}_3]^+$.

Fig. 6(a)), which was faster, for all the ratios tested, than the reaction with GSH. The transformation of cisplatin to the oligomeric compound (C-3), previously described, was also observed but in much low amount. Contrary to what happens with GSH, the “aged” form of cisplatin was not able to react with MT.

The commercially available MT used contains about 0.8% of Zn and 6% of Cd.²³ When cisplatin interacted with MT at a 1:1 ratio there was a displacement of Zn (Fig. 6(b)), and after 4 h less than 30% of the original Zn remained bound to MT. Similar results were observed when the cisplatin:MT ratio was 1:2. Nevertheless, for a 1:10 ratio, although some displacement was observed, less than 50% of the original Zn was displaced after 96 h. As could be expected, when “aged” cisplatin was incubated with MT, no displacement of Zn was observed (results not shown). Cd was not displaced from MT when it reacted with either cisplatin or “aged” cisplatin at any of the molar ratios assayed.

The displacement of Zn after cisplatin treatment, while Cd still remains attached to MT, has been described previously¹⁴ using the same rabbit liver MT as is used in this paper. Therefore, at neutral pH, mixed complexes of Cd and Pt with MT were possible, binding one molecule of MT to more than ten metal atoms ($\text{Cd}_4/\text{Pt}_7\text{-MT}$). These results do not agree with other studies stating that Pt atoms are able to displace not only Zn but also Cd from native MT.⁶ The different behaviour observed here could be due to

differences in the reagent concentrations or in the reaction pH. This is in accordance with the results from van Vyncht *et al.*,²³ who analysed the different rabbit liver isoforms of MT in neutral and acidic media. Although the native MT isoforms used in the experiments presented here contained Zn and Cd, as demonstrated by SEC-ICP-MS, when ESI-MS analysis was performed (Fig. 7) the molecular weights obtained correspond to the different isoforms from nude MT. This can be explained taking into account that formic acid was added to the electrospray solution, leaving a pH of around 2. Conclusive ESI spectra from the incubation mixtures of cisplatin with MT were not obtained, probably due to a poor ionization of the adduct cisplatin:MT. However, under these conditions, the peaks for nude MT isoforms disappeared from the spectrum, demonstrating, although indirectly, that the interaction of the drug with MT, observed by the SEC-ICP-MS experiments, is resistant to the ESI-MS acid conditions.

Interaction of cisplatin with a mixture of GSH and MT

Cisplatin (1–10 μM), 10 μM GSH and 10 μM MT were incubated at the following cisplatin–GSH–MT ratios: 1:1:1, 1:2:2, and 1:10:10. Although the reaction of cisplatin with MT was faster than the reaction with GSH, the incubations always produced a signal for the GSH derivative peak G-2. The intensity of this peak rose between 0 and 48 h and was

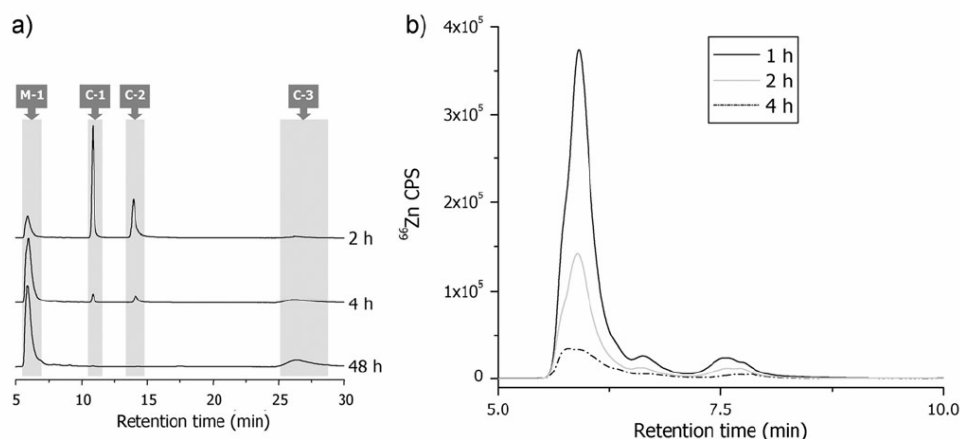


Fig. 6 SEC-ICP-MS chromatograms of 10 μM MT incubated with (a) 1 μM cisplatin (^{195}Pt), and (b) 10 μM cisplatin (^{66}Zn), over time.

proportional to cisplatin concentration. Even for incubation times longer than 48 h, G-1 could be observed, as can be expected by the production of the “aged” cisplatin oligomeric derivative in this ternary reaction. As was observed earlier for the incubations of cisplatin with MT, Zn was displaced from MT by cisplatin. Nevertheless, when the ratio between cisplatin and MT was 1:2 the displacement was very small, in opposition to what had happened previously in the binary reactions. As might be expected, Cd was not displaced from MT at all.

In vitro incubation of cisplatin and rat kidney cytosol

Rat kidney cytosol was prepared according to the procedure described in the Experimental section and was incubated with

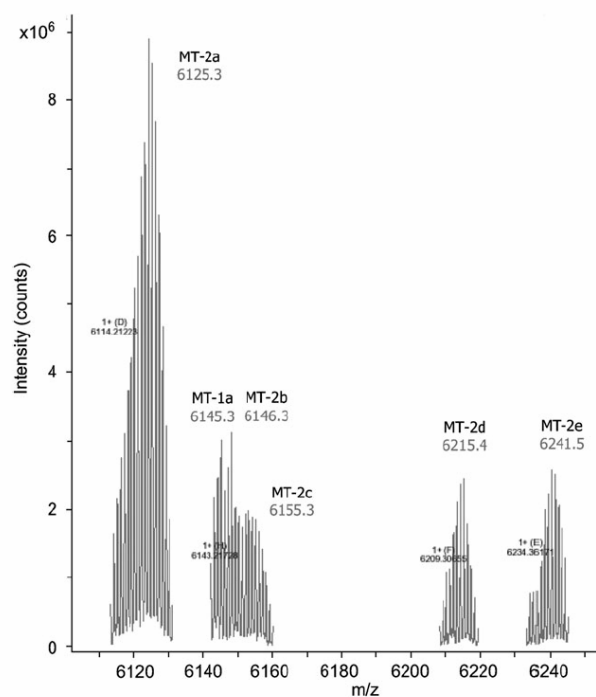


Fig. 7 ESI-FT-ICR spectrum of 100 μM native MT (de-salted), taken at a pH of 2.5.

1 μM cisplatin, which is the concentration level expected in the cytosols of treated rats. After the incubation, the Pt species produced were separated and detected by SEC-ICP-MS. For an incubation time of 4 h, Pt is associated with peaks eluting at the same retention time as M-1, G-1 and G-2 (Fig. 8). Peak G-2 decreased with time and disappeared after 48 h, while the intensity of peak G-1 increased during this time. The intensity of the peak due to the complex between MT and cisplatin decreases also with time. It can also be observed that other compounds are able to capture Pt. One of them, marked as U, increased with time.

When cytosols were incubated with 1 μM cisplatin plus 500 μM GSH, peaks G-1 and G-2 were more intense after 4 h than those corresponding to the sample which was incubated only with cisplatin. As could be expected, after 48 h the compound G-2 disappeared at the expense of an increment in the intensity of G-1. The addition of 500 μM GSH to the cytosol:cisplatin incubation mixtures produced, as well, a less intense peak for M-1 after 4 h. In both cases the intensity of peak M-1 decreased with time up to 48 h.

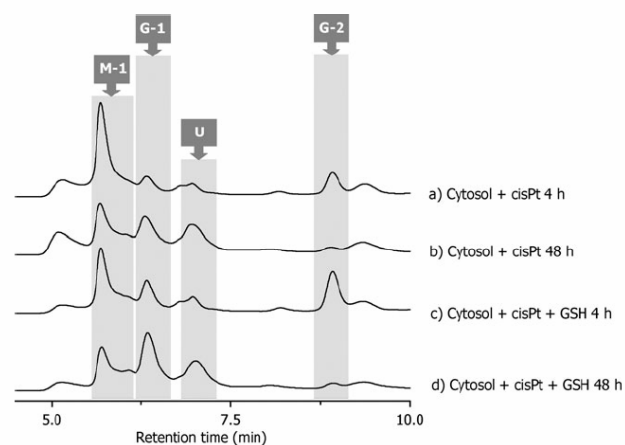


Fig. 8 SEC-ICP-MS (^{195}Pt) chromatograms from *in vitro* incubated kidney cytosols with 1 μM cisplatin, for (a) 4 h and (b) 48 h, 1 μM cisplatin and 500 μM GSH for (c) 4 h and (d) 48 h.

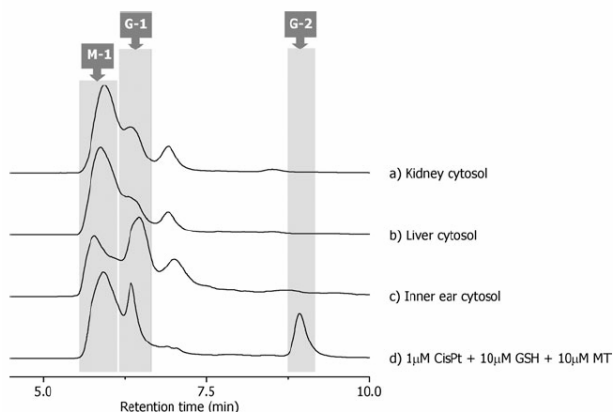


Fig. 9 SEC-ICP-MS (^{195}Pt) chromatograms from cytosols of (a) kidney, (b) liver, (c) inner ear and (d) 1 μM cisplatin: 10 μM GSH and 10 μM MT standards incubated for 96 h.

***In vivo* association of cisplatin with cytosolic heat stable compounds**

Cisplatin was injected intraperitoneally to rats at dosages of 16 mg m^{-2} , as described in the Experimental section. After three days, the rats were sacrificed and the cytosolic fractions of kidney, liver and inner ear were isolated. In order to purify the heat stable fraction, samples were heated for 15 min at 65 $^{\circ}\text{C}$, centrifuged at 15000g and the supernatants analysed by SEC-ICP-MS. MT is stable under these conditions, so it is possible to isolate it from other proteins which denature and precipitate at 65 $^{\circ}\text{C}$. Results are shown in Fig. 9; peaks co-eluting with G-1 and M-1 could be observed whereas there was no signal at the elution time corresponding to G-2. This is in accordance with the results obtained for the *in vitro* incubations. Although the identification in these samples of G-1 is only tentative, it seems that the formation of the complex between Pt and MT is real, as can be proved by the coincidence in the retention time and by the observed stability of this complex under the heating conditions employed in the preparation of the samples. Previously, experiments were carried out using cisplatin and MT standards showing the stability of the produced complexes under the heating experimental conditions used.

Conclusions

The combined use of SEC-ICP-MS and ESI-MS has been successfully employed to obtain relevant information about cisplatin interaction with target sulfur containing biomolecules such as GSH and MT. ICP-MS, after SEC separation, has demonstrated itself to be an excellent technique for detecting cisplatin metabolites and cisplatin-biomolecule adducts at clinical concentrations and under physiological conditions. Also, its multi-elemental ability provides important information to complement ESI-MS structural analysis.

The intact drug evolves over time, under physiological conditions, to the mono-aquo and the oligomeric cisplatin derivatives. The di-aquo metabolite was not detected.

Oligomeric cisplatin derivative reacts with GSH but not with MT. Cisplatin-GSH incubations produced two abundant adducts, one of them being transformed into the other over time. When cisplatin was incubated with MT, the mono-aquo form of the drug could react with MT or evolve to the oligomeric derivative at a similar reaction rate. SEC-ICP-MS analysis showed that, in contrast to Cd, Zn was lost from MT throughout the incubation time. *In vitro* and *in vivo* studies with kidney cytosols seem to reproduce the results obtained for the incubation of drug with GSH and MT standards.

Acknowledgements

This work has been financially supported by the Spanish CICYT (BQU-2002-01348 and CTQ-2005-08593 projects). D.E. acknowledges the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia for the predoctoral fellowship. B.C. is supported by the RyC program under the auspices of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. Dr Manuel Marcos at University of Vigo is highly acknowledged for the ESI-FT-ICR spectra.

References

- 1 R. F. Ozols, *Cancer Treat. Rev.*, 1991, **18**, 77–83.
- 2 H. M. Pinedo and J. H. Schornagel, *Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy 2*, Plenum, New York, 1996.
- 3 D. Esteban-Fernández, M. M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J. M. Verdaguer, R. Ramírez and M. A. Palacios, *Talanta*, 2007, **72**, 768–773.
- 4 A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko and B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224–2248.
- 5 S. J. Lippard and J. M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, California, 1994, p. 113.
- 6 D. Hagrman, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak and A. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2003, **31**, 916–923.
- 7 D. García Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco González and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 861–868.
- 8 K. Wang, J. Lu and R. Li, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **151**, 53–88.
- 9 J. Reedik and J. M. Teuben, 'Platinum-sulfur interactions involved in antitumor drugs, rescue agents and biomolecules', in *Cisplatin, chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. B. Lipper, Weinheim, Wiley-VCH, 1999, pp. 339–362.
- 10 M. Satoh, D. M. Kloth, S. A. Kadhim, J. L. Chin, A. Naganuma, N. Imura and M. G. Cherian, *Cancer Res.*, 1993, **53**, 1829–1832.
- 11 D. Hagrman, J. Goodisman and A. K. Souid, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004, **308**, 658–666.
- 12 J. C. Dabrowiak, J. Goodisman and A. Souid, *Drug Metab. Dispos.*, 2002, **30**, 1378–1384.
- 13 R. Miao, G. Yang, Y. Miao, Y. Mei, J. Hong, C. Zhao and L. Zhu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 1031–1040.
- 14 R. Mandal, G. Jiang and X. Li, *Appl. Organomet. Chem.*, 2003, **17**, 675–681.
- 15 P. Palumaa, O. Zerbe and M. Vasak, *Biochemistry*, 1993, **32**, 2874.
- 16 M. Cui and Z. Mester, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 1517–1527.
- 17 M. El-Khateeb, T. G. Appleton, B. G. Charles and L. R. Gahan, *J. Pharm. Sci.*, 1999, **88**, 319–326.
- 18 S. Hann, Zs. Stefanka, K. Lenz and G. Stinger, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 405–412.

-
- 19 V. Vacchina, L. Torti, C. Allievi and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 884–890.
- 20 T. G. Appleton, R. D. Berry, C. A. Davis, J. R. Hall and H. A. Kimlin, *Inorg. Chem.*, 1984, **28**, 1989–1993.
- 21 B. Lippert, C. J. L. Lock, B. Rosenberg and M. Zvagulis, *Inorg. Chem.*, 1978, **17**, 2971–2975.
- 22 S. E. Miller and D. A. House, *Inorg. Chim. Acta*, 1989, **161**, 131–137.
- 23 G. van Vyncht, G. Bordin and A. R. Rodríguez, *Chromatographia*, 2000, **52**, 745–752.
- 24 A. Rodríguez-Cea, M. R. Fernández de la Campa, E. Blanco González, B. Andón Fernández and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 1357–1364.

C.2.3. Trabajo 4: Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins (*J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 378-384)

El último trabajo que compone este capítulo, presenta un desarrollo metodológico para el análisis de los complejos fármaco:proteína formados en el suero sanguíneo (Esquema experimental 4). Los objetivos de este trabajo fueron la separación e identificación estructural de los aductos detectados.

En primer término se procedió a la separación cromatográfica de los complejos fármaco:proteína mediante AE-FPLC-ICP-MS, y al estudio de su evolución con el tiempo. Para ello se llevaron a cabo incubaciones en condiciones fisiológicas de IgG, apo-Tf y HSA con cisplatino en distintas concentraciones, así como incubaciones del fármaco con suero sanguíneo humano de voluntarios sanos. La mayoría del fármaco interactuó con la HSA, siendo muy pequeña la proporción de cisplatino que se unió a las demás proteínas tanto en las incubaciones sobre patrones, como en las llevadas a cabo sobre el suero sanguíneo. También se realizaron estudios acerca de la interacción del fármaco con holo-Tf, con el objeto de establecer el efecto del cisplatino sobre el Fe unido a la proteína. La nula influencia del fármaco sobre el Fe de la Tf indica que el cisplatino no comparte sitios de unión con este metal y permitió extrapolar los resultados obtenidos con la apo-Tf a la Tf del suero humano, la cual se encuentra saturada en un 30% con Fe.

La segunda parte del trabajo fue dirigida a la identificación de los aductos cisplatino:apo-Tf y cisplatino:HSA, tanto en incubaciones con patrones como en las realizadas sobre suero sanguíneo humano. Con esta finalidad se abordaron dos estrategias convergentes, la identificación directa de los aductos formados mediante ESI-Q-TOF y la digestión trípica de los mismos para la identificación de sus péptidos, incluidos aquellos con el fármaco ligado. Esta última opción se llevó a cabo con una separación previa de los péptidos mediante RP-capLC-ESI-Q-TOF, contando con la ayuda de una detección sensible mediante RP-capLC-ICP-MS de aquellos péptidos portadores de Pt. Las dificultades instrumentales para analizar biomoléculas de gran peso molecular y la resistencia a la digestión trípica presentada por el enlace fármaco:proteína, hacen de la segunda estrategia la más interesante para la continuación de estos trabajos de metalómica.

Esquema experimental 4
(Trabajo 4)

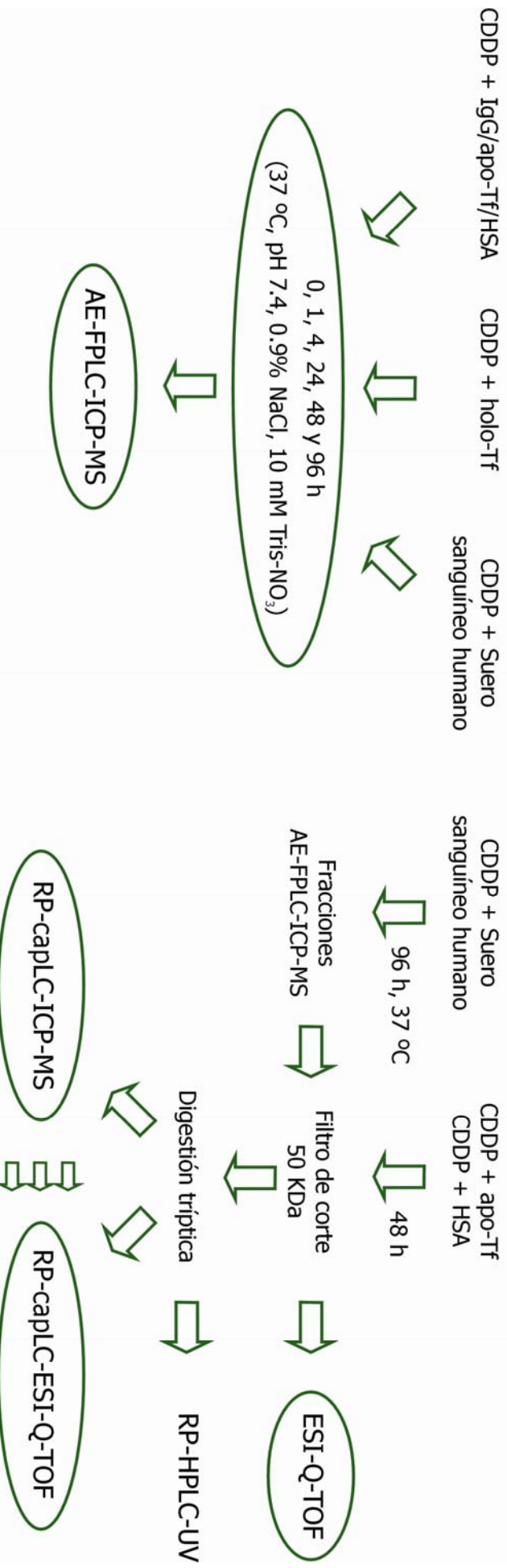


Incubaciones cisplatino + IgG/apo-Tf/HSA/holo-Tf

Incubaciones CDDP + Suero sanguíneo humano

Caracterización cromatográfica

Caracterización estructural



Trabajo 4

Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 23 (2008) 378-384

Este trabajo formó parte de la Comunicación Escrita presentada en el congreso:

“III Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas (SEEM)” en septiembre de 2006, Oviedo,

España

Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study *cis*-platin interactions with serum proteins†

Diego Esteban-Fernández,^b M. Montes-Bayón,^a E. Blanco González,^a
M. M. Gómez Gómez,^b M. A. Palacios^b and A. Sanz-Medel^{*a}

Received 2nd August 2007, Accepted 27th November 2007

First published as an Advance Article on the web 14th December 2007

DOI: 10.1039/b711922d

The judicious use of *cis*-Pt as an intravenously administrable Pt(II) drug for chemotherapy requires the evaluation of its interactions with blood proteins. Therefore, the combined use of modern analytical chemical speciation and of analytical proteomics approaches to study these interactions is described here. The method involves incubation of *cis*-Pt with standard proteins and human serum samples. The separation of the proteins is conducted by liquid chromatography in an anion exchange column (Mono Q). Simultaneous molecular detection by UV absorption (280 nm) and elemental detection (¹⁹⁵Pt) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) are performed. Using this set-up, the effects of the incubation time as well as the drug concentration on *cis*-Pt interactions with transferrin, albumin and immunoglobulin G were studied. In addition, the nature of interactions was also investigated by means of electrospray mass spectrometry (ESI-Q-TOF) of the intact protein. Transferrin and albumin showed different interactions, binding one and four cisplatin molecules, respectively. Also, some typical proteomic studies were initiated by tryptic digesting the transferrin and albumin *cis*-Pt complexes followed by capillary-LC-ICP-MS and ESI-Q-TOF parallel detection of the peptides obtained. The capLC-ICP-MS chromatogram provided clear evidence of Pt-containing peptides remaining after tryptic digestion.

Introduction

Cisplatin, (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), is one of the intravenously administrable Pt(II) complexes approved for worldwide clinical practice as chemotherapeutic agent. It exerts its antitumour activity by forming adducts with DNA nucleobases, which leads to final apoptotic cell death.¹ However, a very modest fraction of the administered cisplatin reacts with nuclear DNA and produces cytotoxic lesions; the largest amount is reported to bind extra- and intracellular proteins.² Therefore, it is of great interest to determine the nature of cisplatin–proteins interactions in the blood stream in order to gain a better understanding of the drug transport and distribution among organs as well as the excretion rate. In this regard, some studies³ have revealed the following reaction abilities of cisplatin with the different blood proteins: haemoglobin > albumin > immunoglobulin. In the cellular fraction of blood, most platinum drugs are bound to haemoglobin,⁴ although some recent studies have described the interactions with other minor components such as superoxide dismutase.⁵ In blood serum, albumin seems to be the major binding partner of cisplatin but the interactions of this drug with other

less abundant serum proteins may have also some pharmacological relevance. In fact, the association of cisplatin to transferrin has been proposed as an alternative system for drug transport and delivery.⁶

The most useful analytical strategies to perform studies on the binding of cisplatin to proteins are based on hybrid methodologies combining different separation techniques with sensitive and selective mass spectrometry-based detectors.⁷ In particular, the combination of liquid chromatography (HPLC) as separation mode with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) as element selective detector has proved to be a successful approach in previous studies.⁸ Some authors have used size exclusion as a separation mechanism,⁹ although the resolution among proteins is seriously compromised in serum samples. Other authors have proposed the use of reversed phase chromatography (C₁₈) with a coating layer of surfactants,¹⁰ or even the use of capillary electrophoresis in conjunction with ICP-MS detection.¹¹

For further structural elucidation of the complexes of cisplatin with serum proteins it is often necessary to use molecular mass spectrometric (MS) techniques such as electrospray (ESI) or matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI). Importantly, most commercial MS analysers are capable of measuring macromolecular mass with sufficient resolution and accuracy to allow the binding stoichiometries of metal–protein complexes to be established directly. This feature has been exploited by several authors to study Pt drugs binding with serum proteins.⁷ Regarding the sample treatment strategies employed for characterizing proteomic samples,

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: asm@uniovi.es

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University Complutense, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

† Presented at 2007 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Taormina, Italy, February 18–23, 2007.

they generally follow either “top-down” or “bottom-up” analytical methodologies.^{12,13}

In the case of cisplatin, top-down strategies have been used to characterize its interaction with human serum transferrin¹⁴ and the comparison with the apo-transferrin suggests that cisplatin occupies a single binding site in the protein structure. Similarly, transferrin interactions with oxaliplatin⁸ have been studied by intact analysis using ESI-MS. However, very few studies have tackled the use of bottom-up methodologies in order to characterize the interaction of cisplatin with serum proteins. This could be due to the required initial proteolytic digestion of the adducted protein, which might result in the loss of the platinum-containing molecule. Just one example has been documented in the literature where Pt-containing peptides have been found after proteolytic digest of adducted transferrin^{14,15} (bottom-up) and the binding site information of the cisplatin molecule provided. However, contradictory results have been published about such binding sites in transferrin and, thus, some additional work is needed.⁷

For this purpose, we propose the complementary use of ICP-MS and ESI-MS techniques to study cisplatin binding to human serum proteins after *in vitro* drug incubation with protein standards and real serum samples. Initial experiments include the separation of the main serum proteins using anion exchange chromatography and ¹⁹⁵Pt detection by ICP-MS using protein standards (transferrin, immunoglobulin G and albumin) incubated with the drug. Furthermore, the structure elucidation of the complexes is conducted by ESI-Q-TOF. On the other hand, initial results on the use of capillary-LC coupled to ESI-Q-TOF and ICP-MS detection in order to monitor possible Pt containing peptides after tryptic digest of the drug-incubated proteins are also described.

Experimental

Instrumentation

HPLC separations of the intact proteins were carried out using a dual-piston liquid chromatographic pump (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a sample injection valve (Rheodyne, Model 7125, Cotati, CA, USA) fitted with a 100 µL injection loop, and an anion-exchange column, Mono-Q HR 5/5 (50 × 5 mm id, Pharmacia, Amersham Bioscience, Germany). Specific atomic detection of Pt in the column effluent was performed using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS), Agilent 4500, from Agilent Technologies (Agilent Technologies, Tokyo, Japan).

Two different chromatographic systems were used for the peptide analysis: a conventional Agilent 1100 (Agilent, Waldbron, Germany) fitted with a C₈ column (4.6 × 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) and with a diode array (DAD) detector. Also, an Agilent 1100 series capillary liquid chromatography system consisting of a four channel on-line de-gasser, a capillary pump, a standard binary pump and a micro-wellplate autosampler was used during all experiments for capillary LC. Capillary LC analysis was performed on an Agilent Zorbax 300 SB C₈ column (150 mm × 0.3 mm, 3.5 µm particle size) (Agilent Technologies). The separation conditions are summarized in Table 1.

A micro-nebuliser, based on a modified CEI 100 nebuliser from CETAC (CETAC, Omaha, NE, USA), and a homemade quartz injector tubing extension (internal volume of injector tube and injector tubing extension 4 mL, inner diameter 16 mm, Quarzschmelze Geesthacht, Geesthacht, Germany) which allows the direct connection of the nebuliser and the torch maintaining the lowest possible internal volume, were used as interface between cLC and the collision cell ICP-MS system.

The ESI-Q-TOF instrument used for this study was a QStar XL model (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with the ion-spray source and using N₂ as nebulization gas. The instrument was calibrated every day using a standard solution of polypropylene glycol for intact protein analysis. Transferrin (Tf) fractions from the HPLC column were reconstituted in 50% methanol–0.01% formic acid and injected at a flow rate of 5 µL min⁻¹. The scanned range goes from *m/z* 500–4000 and the applied voltage is 4500–5500 V. The Bayesian deconvolution algorithm available in the Analyst software is applied to the intact Tf spectrum. See Table 1.

Chemicals and standards

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)), apotransferrin (apo-Tf), immunoglobulin G (IgG) and human serum albumin (HSA) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mobile phases for anion exchange HPLC containing (A), 50 mM tris-aminomethane (Merck, Darmstadt, Germany)–acetic acid (Merck), pH 7.4, and (B), A + 250 mM ammonium acetate (Merck), were prepared by dilution of

Table 1 Instrumental parameters employed (HPLC, ICP-MS and ESI-Q-TOF)

HPLC parameters	
Anion exchange column	Mono Q HR 5/5 (50 × 5 mm id, Pharmacia)
Mobile phases	A: 50 mM Tris–HAc buffer (pH 7.4), B: A + 250 mM ammonium acetate
Gradient	0%–75% B in 45 min
Injection volume	100 µL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Detection	UV at 280 nm
Capillary LC column	C ₈ Agilent Zorbax 300 SB (150 mm × 0.3 mm, 3.5 µm particle size)
Mobile phases	A: 5% MeOH, B: 95% MeOH 0–100% in 40 min
Injection volume	300 nL
Flow rate	3 µL min ⁻¹
ICP-MS parameters	
Forward power	1500 W
External flow	15 L min ⁻¹
Carrier gas flow	1.1 L min ⁻¹
Isotope monitored	¹⁹⁵ Pt, ³⁴ S
ESI-Q-TOF parameters	
Scan type	Positive TOFMS
Ionspray voltage	4.5–5.5 kV
Nebulizing gas	N ₂
Injection rate	5 µL min ⁻¹
External calibration	Polypropylene glycol
Scan range	<i>m/z</i> 500–4000
Spectrum deconvolution	Bayesian protein reconstruction

the solid salts with the 18 M Ω cm distilled de-ionized water. Ultrapure 18 M Ω cm distilled de-ionized water was obtained by means of a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The transferrin fractions, collected after HPLC separation, were de-salted and preconcentrated in Centricon YM-50 centrifugal filter devices (Millipore). For capillary-LC, the separation was conducted using a linear gradient from 5 to 95% methanol (Merck) in 40 min.

Human serum samples from healthy volunteers were kindly provided by the Hospital Central of Asturias (Laboratory for Clinical Analysis, Asturias, Spain).

***In vitro* investigations of serum proteins interactions with cisplatin**

Independent solutions of immunoglobulin G (3 mg mL⁻¹), apo-Tf (3 mg mL⁻¹) and HSA (30 mg mL⁻¹) were incubated with 1 μ M cisplatin solution for 1, 24, 48 and 96 h in saline solution containing 0.9% NaCl and 10 mM Tris-acetic acid (pH = 7.4) at 37 °C in order to mimic physiological conditions. Aliquots of the incubated solutions were later analysed by HPLC-ICP-MS using anion exchange chromatography. For apo-Tf iron saturation, FeCl₃ was used as described elsewhere.¹⁶

The serum samples were firstly pooled and then mixed with 1 μ M cisplatin solution prepared in the saline mixture. The samples were provided by the Hospital Central of Asturias as serum from healthy individuals, where the HSA concentration ranged from 30 to 45 g L⁻¹ and Tf concentration from 2 to 3.6 g L⁻¹. No further quantification of these proteins was conducted in our laboratory. Further 1 + 1 dilution in mobile phase A was conducted to inject the incubated solution into the HPLC-ICP-MS.

In the case of the digested protein studies, incubations were conducted using concentrations of 1:1 protein:cisplatin (38 μ M cisplatin for apo-Tf and 450 μ M cisplatin for albumin). The serum samples were incubated, for this purpose, with 450 μ M cisplatin. After incubation for 48 h, the mixtures were ultrafiltrated using Centricon YM-50 (50 kDa membrane pore size) to preconcentrate the sample and to eliminate the possible unreacted cisplatin. The incubated solutions were treated sequentially with urea (8 M) for denaturising the protein, DTT (40 μ l) with incubation at 56 °C for 45 min to reduce disulfide bonds and iodoacetamide (55 mM, 40 μ l), 30 min at room temperature, to alkylate them. Tryptic digestion of the adducted proteins was carried out by adding 20 μ g of sequencing-grade trypsin per 1 mg of protein and the mixture was digested overnight at 37 °C. The peptides obtained were chromatographically separated using a C₈ column and a DAD detector to evaluate digestions.

Results and discussion

Binding studies of cisplatin with protein standards using HPLC-ICP-MS

The first studies to investigate cisplatin interactions with the different serum proteins consisted of incubation of individual standards of HSA, Tf and IgG with 1, 2, 4 and 8 μ M cisplatin and measuring the peak areas by HPLC-ICP-MS. Owing to

the similarity among the different chromatographic profiles, and in order to avoid further loading of the column with cisplatin, the effect of the incubation time was investigated just using 1 μ M cisplatin. Then, the different cisplatin-protein mixtures were incubated for 1, 24, 48 and 96 h in saline solution (described in the previous section), trying to mimic physiological conditions (buffer and protein concentrations) as recommended in previous publications.⁷ This study tries to see how the binding of cisplatin with serum proteins (at physiological concentrations) occurs within 24–48 h, since 80% of this drug is excreted or stored elsewhere after such period.

The results obtained for different incubation times of 1 μ M cisplatin and physiological levels of the two proteins (3 mg mL⁻¹ apo-Tf and 30 mg mL⁻¹ HSA) showed a complete complexation of HSA in 24 h but only 50% in the case of transferrin, even after 96 h. These relative reaction yields have been estimated by referring the peak area of the Pt-protein complex to the unreacted cisplatin which elutes at the void volume (t_r = 1.2 min), and considering that Pt recovery through the column is about 70%. In the case of IgG, the co-elution of this protein with the unreacted cisplatin impaired any further chromatographic studies.

The observed chromatographic profiles of complexes of cisplatin with apo-Tf and HSA can be observed in Fig. 1. These were obtained by using anion exchange HPLC separation and ICP-MS ¹⁹⁵Pt detection and 96 h of incubation in both cases. As can be observed, the unreacted cisplatin as well as the possible hydrolysis products of this compound can be observed in the void volume of Fig. 1. However, in the case of HSA the unreacted cisplatin that remained at the void volume was much smaller. In this regard, several studies have dealt with the binding kinetics of cisplatin to serum proteins, especially to HSA.^{9,17} According to these studies, after incubation for 24 h the cisplatin changed into a high molecular weight fraction (about 60 kDa, close to HSA) when using size exclusion as the separation mechanism. Our results using anion exchange chromatography are in agreement with these findings.

The effect of iron content of apo-Tf in the binding of cisplatin

According to the recent literature, the binding site/sites of cisplatin to Tf are not completely characterized.⁷ Some

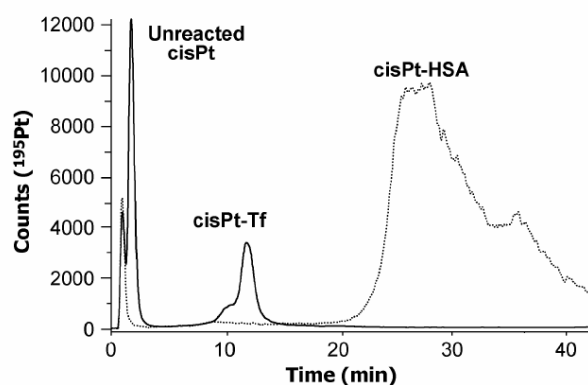


Fig. 1 HPLC-ICP-MS chromatograms for ¹⁹⁵Pt corresponding to the incubation of 1 μ M cisplatin with 3 mg mL⁻¹ apo-Tf (dilution 1:1 for HPLC injection) and 30 mg mL⁻¹ (HSA) (dilution 1:10 for injection).

authors have considered that these interactions occur in the same sites as in the case of iron (in a competitive manner) while others claim that the binding goes through the methionine-256.¹⁸ Since Tf, in human serum, is partially saturated with Fe (about 30% saturation), the effect of the iron content of Tf on the cisplatin interactions has been evaluated by HPLC using UV absorption (460 nm, selective for Tf-Fe complex) and by ICP-MS. For this purpose, Tf was loaded with iron solutions of different concentrations in the presence of bicarbonate (as synergistic ion) and furthermore incubated with cisplatin to obtain a final concentration of the drug of 38 μM after 96 hours.

Fig. 2 shows the comparative chromatographic profiles of iron saturated apo-Tf with (Fig. 2(A)) and without cisplatin (Fig. 2(B)) after 96 h incubation. As can be observed, the traces for Fe and S are analogous in both chromatograms and only the increase in the ^{195}Pt trace is observed in the standard also incubated with the drug. The sulfur trace can be used as proof of the presence of the protein at the retention time where Pt is detected. A similar chromatographic profile has been observed for ^{195}Pt in the case of cisplatin incubated with apo-Tf. This seems to corroborate the fact that cisplatin interacts

with a certain protein site(s), but that such interaction is not influenced by the presence of Fe. Additionally, it seems that Fe does not get displaced from its specific binding sites by cisplatin, as expected due to its high stability constant (10^{20}M^{-1}).

Similar results have been found with other iron concentrations assayed (*e.g.*, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Fe, mimicking the Fe concentration naturally present in human serum). Therefore, the next step was to conduct the incubation of cisplatin with real human serum samples where iron was present and also both model proteins (transferrin and albumin). In this case, after 96 h of incubation most Pt appeared to be bound to HSA and a minor Pt portion eluted in the void volume (either free drug or associated to low molecular weight species, data not shown). Interactions with Tf can be also observed with human serum samples. However, such cisplatin-Tf interactions are significantly smaller when compared with that of HSA. Considering that >80% of the drug is excreted from the body or stored elsewhere within 48 h, our results show that the most efficient cisplatin binder in human serum is albumin, in agreement with other authors.⁷

ESI-Q-TOF strategies to characterize protein-cisplatin interactions

One of the unique features of ESI-MS, which makes it distinct from other MS methods of analysis, is its ability to generate analyte ions directly from aqueous solutions avoiding fragmentation of the biopolymers and even preserving most non-covalent complexes (some weak ones can be destroyed). However, one of the main drawbacks of this technique is its little matrix tolerance (especially when compared with ICP-MS detection). Therefore for ESI-MS, the samples need to be de-salted and cleaned before they can be introduced into the system.

Considering that the binding of cisplatin to serum proteins might require the replacement of some chlorine atoms by OH, incubations were performed in aqueous media and saline solution. Fig. 3 shows the obtained deconvoluted mass spectra of apo-Tf (Fig. 3(a)) and Tf incubated with cisplatin (Fig. 3(b), original and deconvoluted) in aqueous media. As can be seen, in both spectra the predominant ion corresponds to the intact apo-Tf (M_r , 79 559 Da), which shows good agreement with the reported values for this protein calculated as average mass (M_r , 79 573, $\Delta m = 0.02\%$). In addition, it is also possible to observe another isoform of this protein (M_r , 79 974) that could most likely correspond to the pentasialo-transferrin (M_r , 79 940) that we documented in a previous publication.¹⁹

In the case of the cisplatin incubated Tf, a significant signal at m/z 79 784 can be observed in the mass spectrum which shows a difference (226 ± 2 Da) with respect to the apo-transferrin (M_r , 79 560). Interestingly, the same difference (226 ± 2 Da) is also observed for the pentasialo-transferrin isoform relative to the new signal observed at M_r 80 199. This could be ascribed to the binding of a single cisplatin molecule in the form of $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ to the polypeptide chain with the loss of two protons and it has been previously reported when incubating cisplatin with haemoglobin.²⁰ Additionally, the second peak at M_r 80 012 Da could be ascribed to the binding of a second

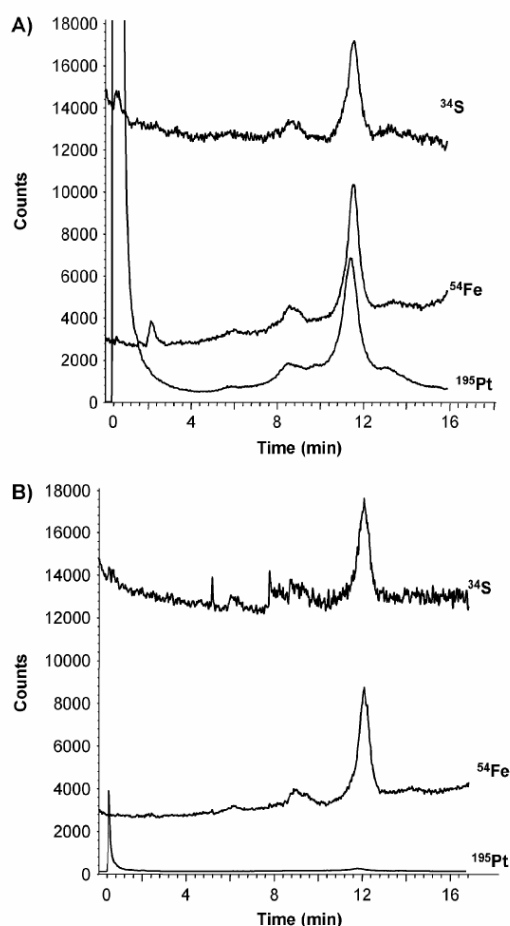


Fig. 2 HPLC-ICP-MS chromatograms showing Fe, S and Pt traces corresponding to 3 mg mL^{-1} apo-Tf firstly saturated with iron (15 ppm as FeCl_3 in the presence of bicarbonate): (A) incubated with 38 μM cisplatin for 96 h; (B) without cisplatin.

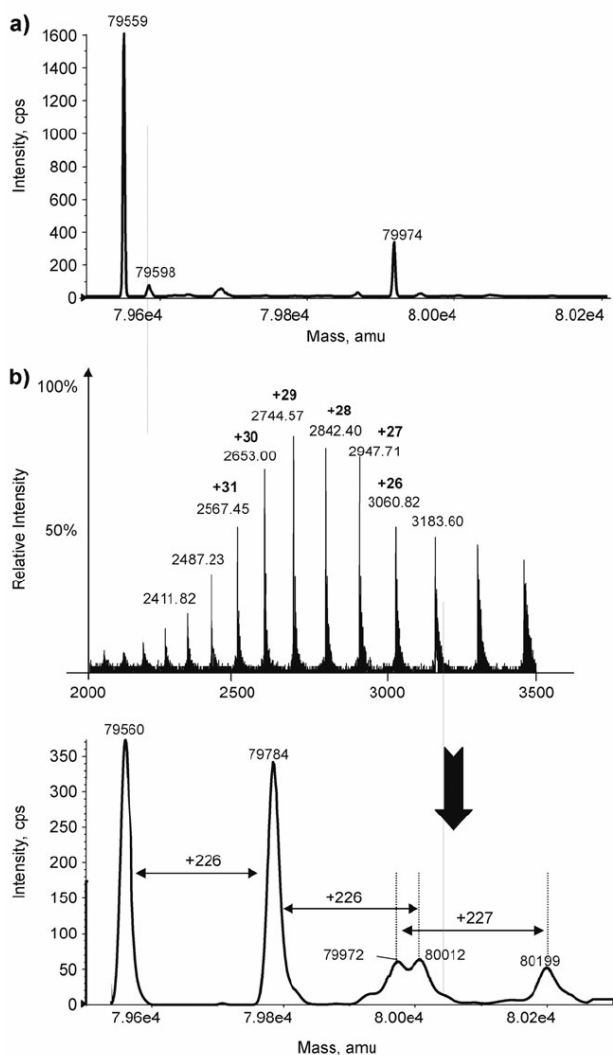


Fig. 3 ESI-mass spectra of transferrin after direct infusion (50% methanol, 0.2% formic acid) for (a) apo-Tf (deconvoluted) and (b) apo-Tf incubated with cisplatin (original spectrum and deconvoluted).

Pt(NH₃)₂ unit, although it shows much lower intensity than the mono-adducted form. Previous results by ESI-MS obtained by other authors¹⁴ revealed the presence of hydroxyl intermediates in the binding to Tf after 20 min of incubation that change, dramatically, after 3 h incubation. Our experiments were conducted after 96 h of incubation and therefore the hydroxyl groups of the Pt molecule could have been lost to allow for the direct binding of the cisplatin molecule to the Tf backbone (similar to the reaction with DNA of this drug).²¹

In the case of HSA, the efficient binding of cisplatin seems to be due to the high affinity of platinum for sulfur-containing ligands.^{7,22} Therefore, the cysteine residues represent one of the most likely sites for association, although there are additional binding places on this protein that can participate in complex formation. Fig. 4 shows the deconvoluted mass spectra of HSA (Fig. 4(a)) and HSA incubated with cisplatin (Fig. 4(b)). This is the first time, to our knowledge, that ESI-MS data have been shown regarding the interaction of cisplatin to HSA, notwithstanding the previous studies by NMR.²³

Fig. 4 shows an important change on the molecular ion of the protein with complexation that corresponds to a shift of 891 ± 4 units. Some authors have claimed a change in the protein secondary structure due to the binding of cisplatin.²⁴ According to them, cisplatin leads to cleavage of albumin disulfide bonds, possibly followed by intramolecular cross-linking of the protein molecule. As consequence, the protein activity may be subject to changes, since S-S bonds play an essential role in maintaining the protein functionality. In fact, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) results indicate a partial unfolding of the protein structure.²⁴ Since the coordination site can be based on sulfur containing amino acids as well as on the histidine residues, it is hard to regard as reliable any stoichiometric ratio from the MS data. However, it seems that the adducted protein contains approximately four cisplatin molecules ($891/227 = 3.92$ if we consider Pt(NH₃)₂ units, as in the case of Tf) while for Tf we observed a 1:1 stoichiometry. Such results can be expected due to the higher content of S-containing amino acids present in HSA compared with Tf and the favourable interaction between S and cisplatin.

Initial experiments by capillary LC-ICP-MS and ESI-Q-TOF to study cisplatin binding peptides from serum proteins

In order to have a better understanding of the binding sites of the drug to Tf and HSA, the two apo-proteins, as well as the cisplatin incubated ones, were digested with trypsin. Bottom up methodologies include the subsequent mass analysis of the peptide digests mixtures. Such MS analysis allows eventual identification of proteins and their post-translational modifications on those peptides. With the aim of verifying the presence of platinum containing peptides, the samples were digested and the peptides analysed by ESI-Q-TOF using two strategies: direct infusion and capillary liquid chromatography.

The apo-proteins studied were firstly digested and then the peptides analysed by direct infusion into the ESI-Q-TOF and the results were sent to a data miner (MASCOT[®]), which confirmed the presence of Tf and HSA and, therefore, the suitability of the selected procedure. However, when the adducted proteins were digested and directly infused into the ESI-Q-TOF, no significant differences were observed between the digested peptides coming from the apo-protein and from the cisplatin adducted one. These results could be due to the small concentration of the *cis*-Pt adducted peptides relative to free peptides existing in the final digest.

Therefore, in order to improve the detection of possible adducted peptides, a previous separation of these species by capillary-LC was attempted. Thus, Fig. 5 shows the chromatographic profile obtained by capillary-LC using ICP-MS detection of the peptides obtained after tryptic digestion of the cisplatin-incubated Tf. As can be seen, several platinum-containing peptides seem to elute from the chromatographic column within the first 35 min of the chromatogram. This separation of the peptides by cap-LC allowed us to use high percentages of organic modifiers in the mobile phase, *e.g.*, to 95% methanol, which is not only often necessary to perform the separation of proteins and peptides²⁵ but also to secure the same separation with ICP-MS and ESI-Q-TOF detection.

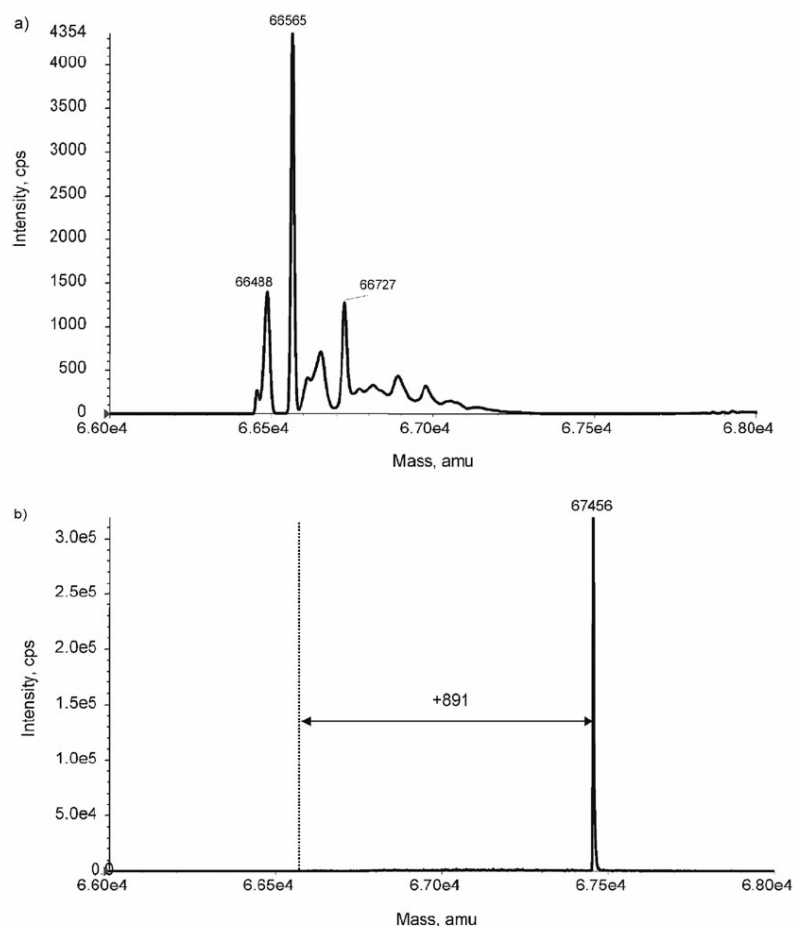


Fig. 4 Deconvoluted mass spectra of albumin (Bayesian protein reconstruct) after direct infusion (50% methanol, 0.2% formic acid) for (a) apo-HSA and (b) cisplatin incubated HSA.

The same separation of the peptides was also conducted using final ESI-Q-TOF (data not shown). Thus, the search for Pt-containing peptides by ESI-Q-TOF was conducted by using the retention time of the Pt species, provided by the ICP-MS. ICP-MS provides the targets to be identified by ESI-Q-TOF (Pt-containing peptides) without the extreme complexity of the spectra generally obtained with the ESI source.

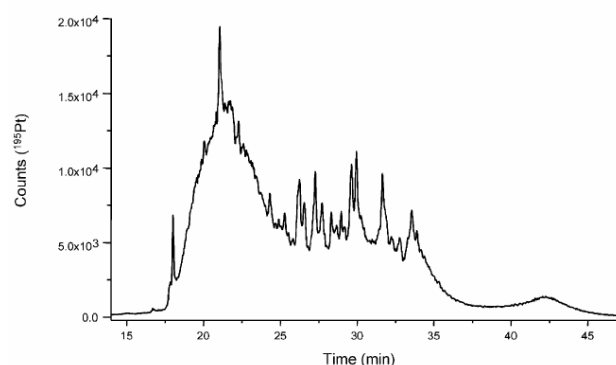


Fig. 5 Capillary-LC separation of the peptides obtained from cisplatin complexed Tf after tryptic digestion using ICP-MS detection.

In this regard, Fig. 6 shows the isotopic profile of a peptide that exhibited a possible Pt pattern at m/z 987.4717 (+4 charges). This peak (retention time 30.2 min in the cap-LC-ICP-MS chromatogram) eluted when the peptides coming from the tryptic digestion of cisplatin adducted Tf were injected. Isotopic modelling of this peptide (m/z 3950 in the deconvoluted spectrum) with and without Pt is shown in Fig. 6. Here, it is possible to observe the good matching between the profiles of the theoretical and calculated cisplatin-peptides. Similarly, other possible Pt-containing peptide was observed in the tryptic digest of cisplatin adducted-HSA ($t_r = 35.2$ min, data not shown). It is noteworthy that this species was also found when the incubation of human serum with cisplatin was conducted.

Unfortunately, the information about the Pt-pattern and the molecular weight is not enough to fully characterize the peptides (a variety of sequences can satisfy these conditions) and further MS/MS has to be done in order to completely elucidate the binding sites of cisplatin to the proteins.

Conclusions

The integrated use of classical MS proteomic strategies, including intact protein analysis, and initial work in peptide

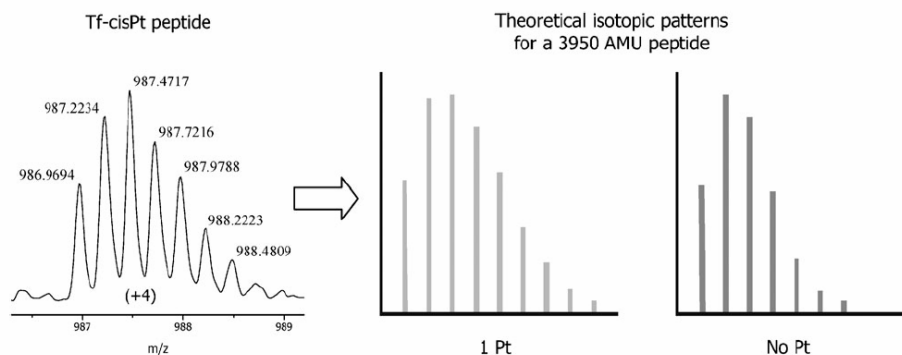


Fig. 6 Pt-containing peptides found in the tryptic digest of cisplatin incubated with apo-Tf. The computer model of the isotope pattern of the proposed peptides with and without Pt is also shown.

fingerprinting with ICP-MS has been applied here to elucidate cisplatin interactions with two main serum proteins. The incubation of the proteins with cisplatin and the analysis of the resulting intact forms by HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF revealed that while with transferrin forms the most important cisplatin adduct is 1:1, albumin more likely reacts with four cisplatin molecules. The results obtained when incubating real human serum samples and using ICP-MS pointed out that, primarily, cisplatin reacts with albumin and this is comparatively fast, within 24 h. Longer incubation times, however, also secure some minor binding of the anti-tumoural drug to transferrin too.

Our first attempts here to unveil the binding sites of cisplatin in human serum proteins using tryptic digestion followed by capillary LC strategies demonstrate a great analytical potential but they require additional studies. In this work, we have illustrated that platinum containing peptides can be detected by ICP-MS using cap-LC as the separation system. As has been shown by other authors, the prior ICP-MS permits one to “screen” and locates clearly the retention times of the Pt-peptides. In this way, further work and search for the sequences of the Pt-peptides by ESI-Q-TOF is made possible.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Hospital Central de Asturias (Laboratory for Clinical Analysis) for providing the serum samples. Financial support provided by the Ministry of Education and Science of Spain (project Consolider CTQ2006-02309 and DE grant) and Fondo Social Europeo for the contract of MMB, as well as the support of Applied Biosystems with the instrumental set-ups (ESI-Q-TOF and MALDI-TOF) are also acknowledged.

References

- 1 S. E. Sherman and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 1153–1181.
- 2 J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499.
- 3 K. Takada, T. Kawamura, M. Inain, S. Masuda, T. Oka, Y. Yoshikawa, N. Shibata, H. Yoshikawa, O. Ike, H. Wada and S. Hitomi, *Biopharm. Drug Dispos.*, 1999, **20**, 421.
- 4 J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer and X.-F. Li, *Clin. Chem. (Washington, D. C.)*, 2005, **51**, 2274.
- 5 V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori and P. L. Orioli, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 1267.
- 6 Z. M. Qian, H. Li, H. Sun and K. Ho, *Pharmacol. Rev.*, 2002, **54**, 561.
- 7 A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko and B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224.
- 8 Y.-Y. Zhao, R. Mandal and X.-F. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 1956.
- 9 J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B. K. Keppler and R. Lobinski, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **387**, 135.
- 10 H. Haraguchi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 5.
- 11 A. R. Timerbaev, S. S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C. G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz and B. K. Keppler, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 1988.
- 12 K. M. Millea, I. S. Krull, S. A. Cohen, J. C. Gebler and S. J. Berger, *J. Proteom. Res.*, 2006, **5**, 135.
- 13 I. A. Kaltashov, M. Zhang, S. J. Eyles and R. R. Abzalimov, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **386**, 472.
- 14 I. Khalaila, C. S. Allardyce, C. S. Verma and P. J. Dyson, *ChemBioChem*, 2005, **6**, 1788.
- 15 C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffey and N. Johnson, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 933.
- 16 M. E. Del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, J. Meija, E. Blanco-González and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5615.
- 17 T. J. Einhäuser, M. Galanski and B. K. Keppler, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 747.
- 18 M. C. Cox, K. J. Barnham, T. A. Frenkiel, J. D. Hoeschele, A. B. Mason, Q. Y. He, R. C. Woodwort and P. J. Sadler, *J. Inorg. Chem.*, 1999, **4**, 621.
- 19 E. Del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, E. Blanco, J. Meija and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5615.
- 20 R. Mandal, C. Teixeira and X.-F. Li, *Analyst*, 2003, **128**, 629.
- 21 D. García Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco González and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 861.
- 22 M. Kleine, D. Wolters and W. S. Sheldrick, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **97**, 354.
- 23 A. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow and P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721.
- 24 J. F. Neault and H. A. Tajmir-Riahi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1384**, 153–159.
- 25 M. Montes-Bayón, D. Pröfrock, A. Sanz-Medel and A. Prange, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1114**, 138.

C.3. Capítulo III:
Otros estudios de especiación
bioinorgánica de Pt
en curso



C.3. Capítulo III: Otros estudios de especiación bioinorgánica de Pt en curso

En multitud de ocasiones, la actividad científica brinda la posibilidad de avanzar por diferentes caminos para alcanzar los objetivos planteados. En este capítulo se muestran los resultados preliminares de algunos trabajos todavía en curso que plantean metodologías analíticas alternativas o complementarias a las mostradas en los capítulos anteriores. La descripción de tales experiencias servirá para completar la visión general del trabajo llevado a cabo, así como para trazar futuras líneas de investigación.

C.3.1. Desarrollo de metodologías analíticas mediante electroforesis en gel monodimensional y bidimensional para la separación de bio-especies de Pt

C.3.1.1. Introducción

El interés en poner a punto métodos analíticos para la separación de bio-especies con Pt mediante electroforesis en gel, se justifica por el gran poder de resolución que poseen estas técnicas y por su carácter micropreparativo¹⁷¹. Este último aspecto, permitirá seguir trabajando con las biomoléculas una vez separadas, empleando técnicas elementales y moleculares de espectrometría de masas que permitan localizar aquellas bio-especies que contengan Pt e identificarlas estructuralmente^{172,173}.

Para evaluar la aplicabilidad de esta técnica a la separación de bio-especies con Pt, se llevaron a cabo separaciones electroforéticas monodimensionales de citosoles de riñón y de oído interno, procedentes de ratas tratadas con cisplatino y oxaliplatino. La detección de Pt en la banda electroforética sirvió como indicador de la existencia de bio-especies con Pt y por tanto, del correcto funcionamiento del proceso electroforético para dichas especies.

También se llevaron a cabo experiencias empleando 2D-SDS-PAGE dirigidas a la obtención de información preliminar de algunas de las muestras biológicas empleadas en los trabajos recogidos en esta memoria. Concretamente el trabajo realizado intentó poner de manifiesto diferencias de expresión proteica entre el citosol de un oído de rata control y de una rata tratada con cisplatino.

Este tipo de separaciones abren la puerta a futuros trabajos como la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente, en lo que se podría considerar un clásico trabajo de proteómica, o la localización de las manchas electroforéticas que contengan Pt, para lo cual se hace necesario el empleo de LA-ICP-MS¹⁷⁴ como técnica de detección.

C.3.1.2. Materiales y métodos

Electroforesis monodimensional

La preparación de la muestra se llevó a cabo a través de dos estrategias distintas con el fin de solucionar los problemas de sensibilidad del método (Esquema experimental de ensayos de electroforesis en gel).

Estrategia 1. Las muestras empleadas fueron citosoles de cóclea y riñón de rata tratada con 32 mg m⁻² de cisplatino y sacrificada a los 3 días. La preparación del citosol se llevó a cabo como se describe en el Trabajo 1. El citosol de cada una de las muestras fue tratado con Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), glicerol (10%), SDS (2%), BME (5%) y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se calentó a 100 °C durante 5 min y se sonicó durante 15 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó y se recogió el sobrenadante. El buffer de carga empleado fue Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8), SDS (12%), glicerol (87%) y azul de bromofenol. La cantidad de proteína cargada en los pocillos electroforéticos para las muestra de riñón y cóclea, fue de unos 40 y 25 µg de proteína, respectivamente. El sistema electroforético empleado fue un Mini-Protean II (Bio-Rad).

Estrategia 2. La muestra empleada en este caso fue un citosol de riñón de rata tratada con 80 mg m⁻² de oxaliplatino y sacrificada al tercer día. Con el fin de enriquecer la muestra en bio-especies con Pt, se aislaron distintas fracciones abundantes en Pt mediante una separación cromatográfica bidimensional como la descrita en el Trabajo 2. Para ello, se recogieron fracciones de 1 mL a la salida de la columna SEC (Superdex 75 10/300 GL), y se cuantificó el Pt total y el contenido proteico de cada una de ellas. La fracción número 15 fue elegida por su alta concentración de Pt y bajo contenido proteico para ser separada en segunda dimensión mediante AE-FPLC-ICP-MS. Para ello, la

Esquema experimental
(Ensayos de electroforesis en gel)

Cisplatino 32 mg m⁻²
Oxalplatinato 80 mg m⁻²



Ratas Wistar



Oído Riñón

Electroforesis monodimensional
(1D-SDS-PAGE)

Electroforesis bidimensional
(2D-SDS-PAGE)

Estrategia 1



Citosol de oído interno y riñón (cisplatino)

Estrategia 2



Citosol de riñón (oxaliplatino)



1D cromatográfica (SEC)
Recoger fracción 15

LC-ICP-MS y Bradford de cada fracción

Focalización en 2D cromatográfica (AE)
Recoger fracción 17

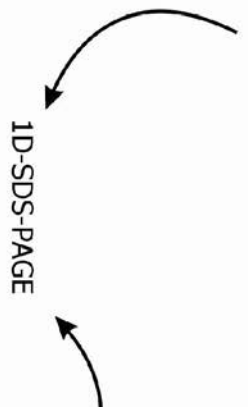


Citosol de riñón control y de rata tratada con cisplatino



2D-SDS-PAGE

Comparación de geles
Expresión diferencial de proteínas



primera dimensión cromatográfica se repitió 7 veces en las mismas condiciones, recogiendo en todas ellas la fracción 15. El conjunto de estas fracciones se diluyó con el mismo volumen de agua y se focalizó en la cabeza de la columna aniónica empleada en la segunda dimensión cromatográfica (Mono Q H/R 5/5). Con el fin de evitar problemas de saturación de la columna empleada en la segunda dimensión, se llevaron a cabo tres procesos cromatográficos para focalizar las siete fracciones recogidas en la primera dimensión. De todas las fracciones de 1 mL recogidas en la segunda dimensión, la fracción 17 fue elegida para ser separada en 1D-SDS-PAGE por su elevada relación Pt/proteína. Se juntaron las tres fracciones 17 correspondientes a los tres procesos cromatográficos de intercambio aniónico y se liofilizaron con el fin de preconcentrar la muestra lo más posible antes de su separación electroforética. Posteriormente, se reconstituyó el liofilizado en unos 60 µL de agua y se sometió la muestra al mismo tratamiento electroforético descrito en la *Estrategia 1* para el citosol celular. La muestra cargada contenía alrededor de 15 µg de proteína.

El gel electroforético empleado fue de poliacrilamida al 16.5%, con una relación acrilamida:bisacrilamida de 15,5:1, y empleando *tris*-tricina en el tampón del cátodo para conseguir una mayor retención de proteínas de muy bajo peso molecular (hasta 4 KDa). La elección de este tipo de gel, que posee un intenso entrecruzamiento, se fundamentó en la observación previa en los cromatogramas SEC-ICP-MS, de una notable cantidad de bio-especies de Pt comprendidas entre 6 y 12 KDa.

El procedimiento llevado a cabo para determinar el contenido total de Pt en las distintas bandas electroforéticas fue la digestión de porciones de gel según lo descrito en el Trabajo 1. Se cortaron las tiras electroforéticas en 9 porciones espaciadas según las manchas obtenidas para los indicadores de pesos moleculares empleados (9 patrones entre 4 y 250 KDa). El análisis final mediante ICP-MS por nebulización directa del digerido se llevó a cabo tal y como se describe en el Trabajo 1. Una metodología analítica más sensible y adecuada para localizar la región del gel electroforético donde se encuentran las biomoléculas con Pt, consiste en el empleo de LA-ICP-MS. Desgraciadamente nuestro laboratorio aún no dispone de esta técnica.

La determinación del contenido total de proteína en las distintas muestras y fracciones analizadas se llevó a cabo empleando el método Bradford, midiendo la señal

obtenida a 595 nm con un espectrofotómetro UV/Vis y usando BSA como proteína de calibración.

Electroforesis bidimensional

Las muestras sometidas a la separación electroforética bidimensional fueron citosoles de riñones de rata control y de rata tratada con 32 mg m⁻² de cisplatino, sacrificadas a los 3 días de la administración (Esquema experimental de electroforesis en gel). La preparación del citosol se llevó a cabo como se describe en el Trabajo 1. A continuación, se precipitaron las proteínas de la muestra con acetona con el objeto de purificar y/o preconcentrar la muestra. Tras la cuantificación de la cantidad de proteína presente en la muestra mediante el método Bradford, se cargaron 100 µg de proteína disueltos en un tampón de carga compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8, IPG buffer 3-11 0.5% (anfolitos) y DTT 50 mM. La dimensión de isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo con tiras IPG (18 cm, pH no lineal entre 3 y 11). La segunda dimensión SDS-PAGE se realizó con un gel de acrilamida del 12,5% y con una relación acrilamida:bisacrilamida de 30:0,8.

C.3.1.3. Resultados y discusión

Electroforesis monodimensional. Estrategia 1: 1D-SDS-PAGE de citosoles de riñón y cóclea

El análisis del contenido total de Pt en las porciones de gel procedentes de la *Estrategia 1*, mostró una clara concordancia con los perfiles cromatográficos obtenidos por SEC-ICP-MS para citosoles tratados con agentes desnaturalizantes (Trabajo 1) exceptuando leves desplazamientos probablemente debidos a mecanismos de retención cromatográficos secundarios. El citosol de riñón presentó un pico cromatográfico predominante superior a 12,4 KDa (Figura 21 a), lo cual coincide en gran medida con el contenido de Pt medido en la fracción de gel correspondiente a 34 KDa (Figura 21 b). Por otro lado, el perfil cromatográfico de Pt del citosol de oído interno (Figura 22 a) muestra

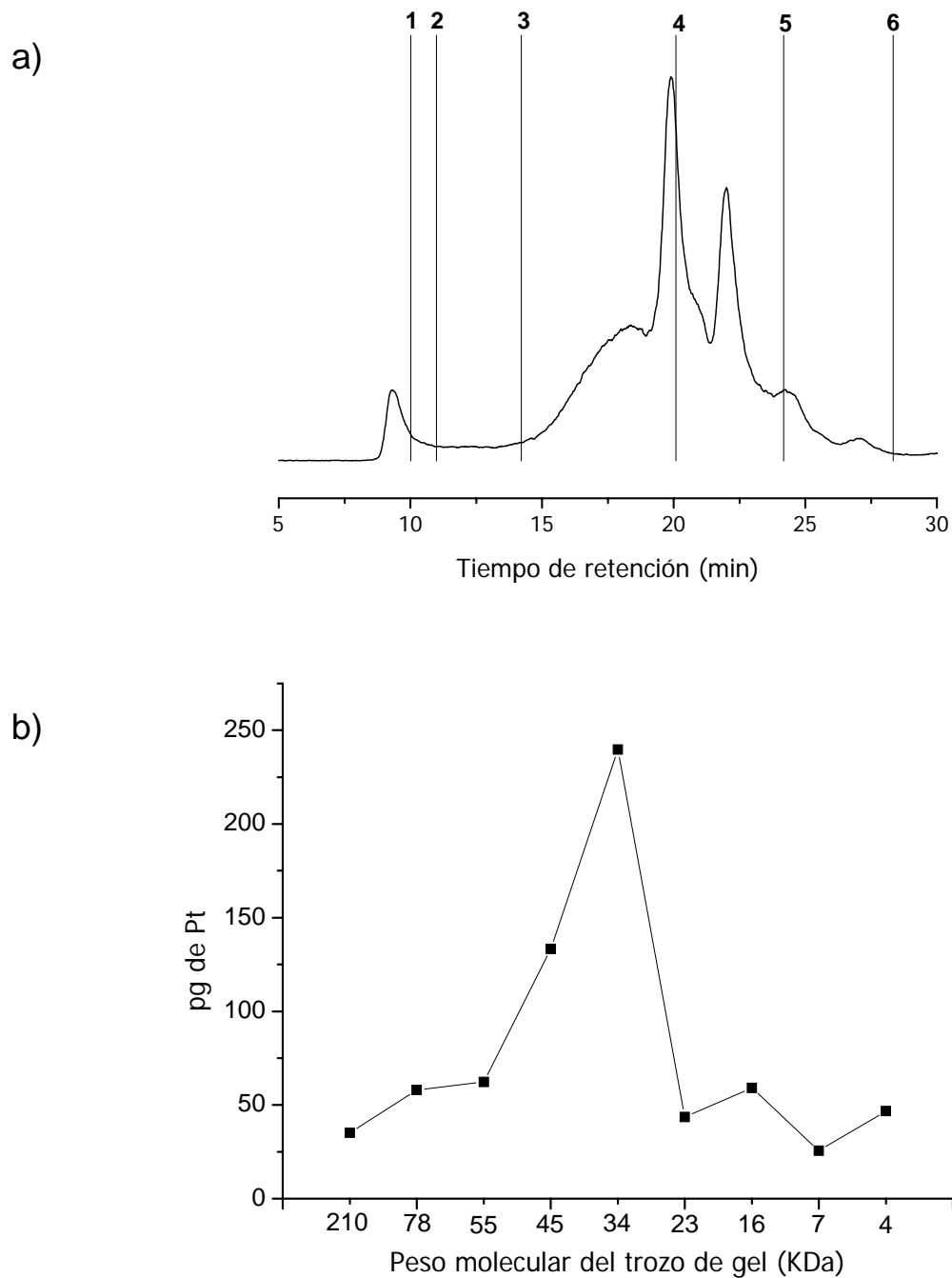


Figura 21. Separación de las bio-especies de Pt presentes en el citosol de riñón de una rata tratada con 32 mg /m² de cisplatino y sacrificada tres días después de la administración. a) Cromatograma SEC-ICP-MS monitorizando ¹⁹⁵Pt. b) Contenido de Pt determinado mediante ICP-MS en diferentes porciones de gel electroforético 1D-SDS-PAGE. Pesos moleculares de los marcadores de calibración de la columna cromatográfica: (1) 70 KDa, (2) 66 KDa, (3) 29 KDa, (4) 12.4 KDa, (5) 6.5 KDa y (6) 3 KDa.

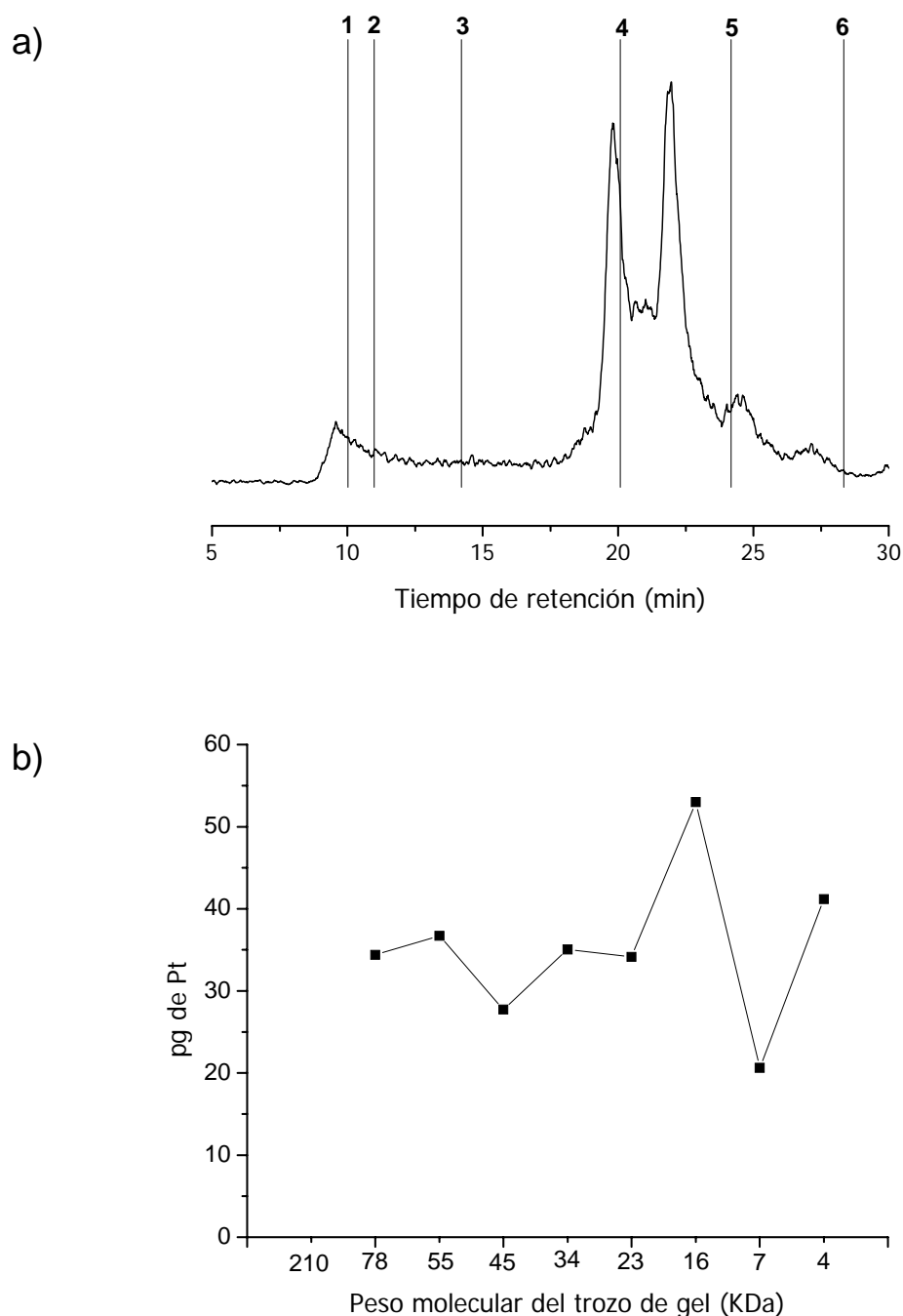


Figura 22. Separación de las bio-especies de Pt presentes en el citosol de oído interno de una rata tratada con 32 mg /m² de cisplatino y sacrificada tres días después de la administración. a) Cromatograma SEC-ICP-MS monitorizando ¹⁹⁵Pt. b) Contenido de Pt determinado mediante ICP-MS en diferentes porciones de gel electroforético 1D-SDS-PAGE. Pesos moleculares de los marcadores de calibración de la columna cromatográfica: (1) 70 KDa, (2) 66 KDa, (3) 29 KDa, (4) 12.4 KDa, (5) 6.5 KDa y (6) 3 KDa.

dos picos intensos entorno a 9 y 12 KDa, mientras que la fracción del gel correspondiente a 16 KDa es la que contiene mayor cantidad de Pt (Figura 22 b). Estos resultados muestran un paralelismo entre la cromatografía SEC y la electroforesis monodimensional, pudiéndose concluir a priori, que la 1D-SDS-PAGE es adecuada para la separación de bio-especies de Pt.

Además se comprobó que la contaminación derivada de los electrodos de Pt del equipo de electroforesis, no afectaba significativamente al contenido de Pt en los geles. Para ello, se analizaron trozos de gel considerados como blancos.

Sin embargo, existen dos factores que muestran la necesidad de perfeccionar la metodología empleada. En primer lugar, es importante destacar que los niveles de Pt cuantificados hacen que se esté trabajando cerca de los límites de cuantificación del método (20 ng L^{-1}). La cantidad de muestra que puede depositarse en un pocillo electroforético convencional ronda los $40 \mu\text{g}$ de proteína y la cantidad de Pt asociada a esa proteína es el factor decisivo para tener concentraciones apreciables de las bio-especies de Pt de interés. Por ello, se planteó la Estrategia 2, donde se hizo una separación cromatográfica bidimensional buscando las fracciones cromatográficas más ricas en Pt y con menor contenido proteico, para tener muestras con una elevada relación Pt/proteína.

Por otro lado, se calculó la recuperación comparando el sumatorio de las cantidades de Pt cuantificadas en cada trozo de gel electroforético y cuantificando el Pt directamente en el citosol empleado en el análisis. Los resultados mostraron una buena recuperación para las muestras de cóclea, entorno a un 74%, pero la recuperación para las muestras de riñón fue notablemente inferior, no alcanzándose el 10% del Pt depositado. Estos datos invitan a la mejora del proceso electroforético e informan de una posible diferencia sustancial en el tipo de bio-especies de Pt de las dos muestras analizadas.

Electroforesis monodimensional. Estrategia 2: 1D-SDS-PAGE de fracciones de citosol de riñón enriquecidas en Pt

Como se ha comentado anteriormente, la muestra preparada para la separación electroforética, consistió en una fracción enriquecida en Pt obtenida en la segunda dimensión cromatográfica tras sendas separaciones SEC y AE-FPLC. En cada una de las etapas de fraccionamiento cromatográfico (Trabajo 2) se cuantificó el contenido de proteína y Pt con el fin de obtener fracciones con una alta relación Pt/proteína. En la Figura 23 se muestra el perfil cromatográfico obtenido monitorizando el ^{195}Pt por SEC-ICP-MS (Figura 23 a), así como el contenido de Pt (Figura 23 b) y de proteína (Figura 23 c) de cada una de las fracciones recogidas. La fracción 15 de primera dimensión se escogió por su mayor relación Pt/proteína y se sometió a la segunda dimensión cromatográfica. El perfil cromatográfico de la separación de dicha fracción por AE-FPLC-ICP-MS se muestra en la Figura 24, donde la fracción 17 fue escogida como la más interesante, teniendo todas ellas un contenido proteico similar y muy bajo.

Sometida a SDS-PAGE, la fracción 17 de la segunda dimensión cromatográfica, presentó la mayor concentración de Pt en el intervalo de pesos moleculares comprendidos entre 4 y 16 KDa. La cuantificación del contenido total de Pt en la fracción 17 y el sumatorio de lo cuantificado en cada uno de los trozos electroforéticos analizados mostró una recuperación de aproximadamente el 29%, muy superior a la registrada en el apartado anterior, donde la muestra de riñón separada electroforéticamente era directamente el citosol celular. Aún así, las pérdidas registradas a lo largo del proceso fueron muy significativas y por ello se cuantificó también el Pt en la fracción 17 tras el tratamiento de muestra necesario para llevar a cabo la separación electroforética. Se observó que más del 65% del Pt recogido en la fracción 17 se había perdido antes de depositar la muestra en el pocillo electroforético. Por lo tanto, la pérdida de las bio-especies con Pt en el proceso electroforético propiamente dicho se redujo a un 6% y fue en la etapa de liofilización, reconstitución y desnaturalización donde se produjeron las mayores pérdidas.

Estos datos indican la importancia del control de la pérdida de muestra por adhesión de las bio-especies a las paredes de los recipientes empleados y sugieren una reducción de las etapas del proceso, la disminución del número de recipientes empleados y la pasivación de los mismos. Además, quitan importancia a posibles procesos de

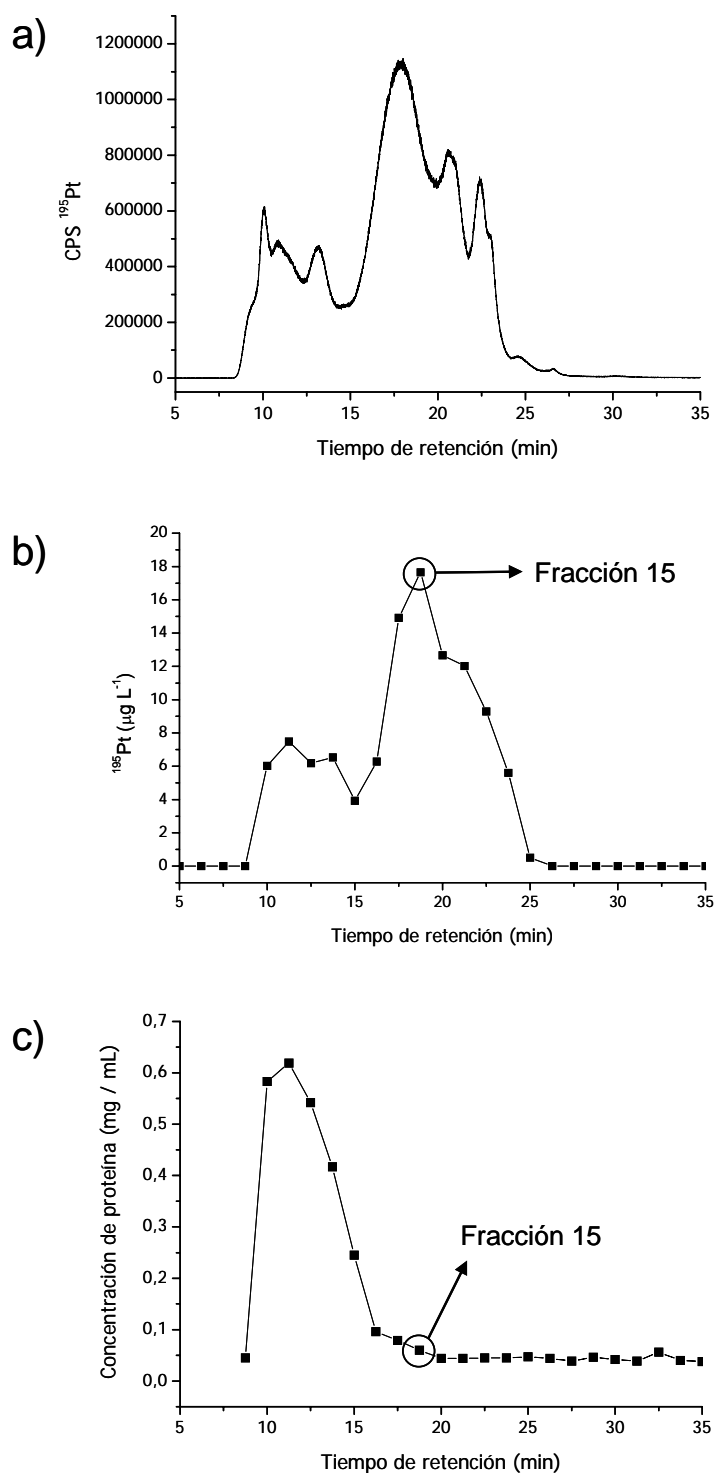


Figura 23. Separación de las bio-especies de Pt presentes en el citosol de riñón de una rata tratada con 80 mg / m^2 de oxaliplatino y sacrificada tres días después de la administración. a) Cromatograma SEC-ICP-MS monitorizando ^{195}Pt , b) concentración de Pt y c) concentración de proteína en cada una de las fracciones recogidas en la cromatografía SEC.

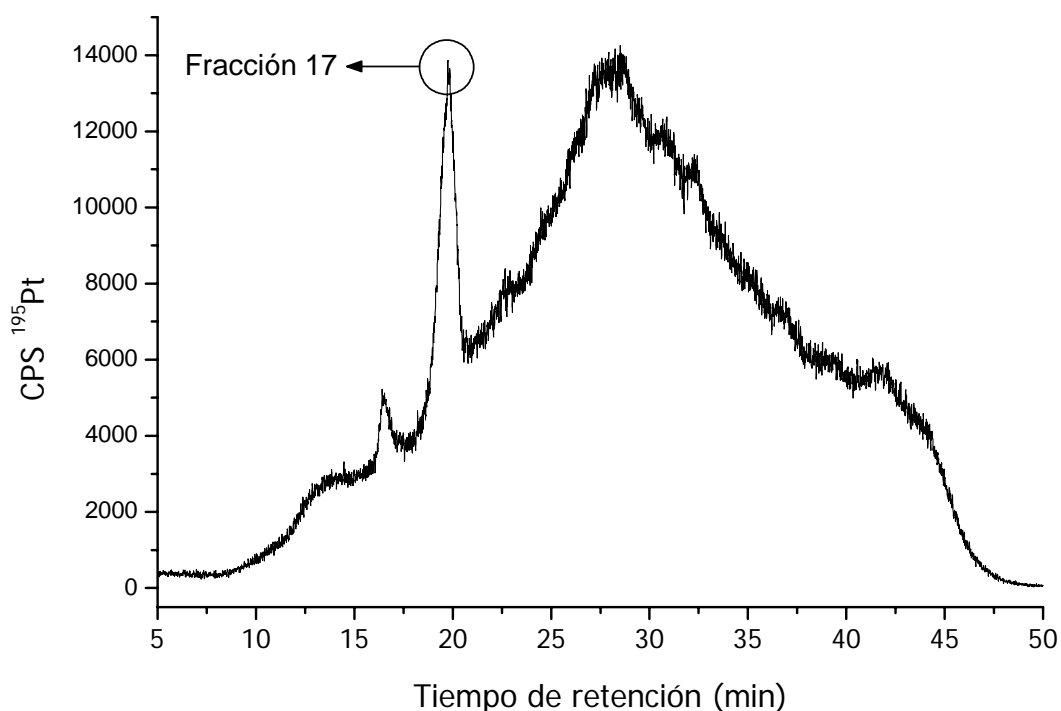


Figura 24. Separación cromatográfica mediante AE-FPLC-ICP-MS de la fracción 15 recogida de la cromatografía SEC empleada como primera dimensión para la separación de las bio-especies de Pt presentes en el citosol de riñón de rata tratada con $80 \text{ mg} / \text{m}^2$ de oxaliplatino y sacrificada tres días después de la administración.

ruptura del enlace fármaco:biomolécula en el proceso electroforético, conclusión que ya había sido apuntada en el Trabajo 1, donde se demostró la estabilidad de este enlace en condiciones desnaturalizantes.

Siguiendo esta estrategia para separar las fracciones proteicas ricas en Pt, las cantidades de Pt detectadas en cada uno de las porciones de gel siguen estando cercanas a los límites de cuantificación del método. Para intentar mejorar este aspecto, se deberá recurrir a una mayor preconcentración de la muestra para poder cargar más de los $15 \text{ }\mu\text{g}$ de proteína analizada en este experimento. Además, se deberán poner en práctica las medidas anteriormente expuestas encaminadas a la minimización de las pérdidas durante el procedimiento analítico. Al margen del posible empleo de LA-ICP-MS para la localización de las manchas electroforéticas con Pt, es de suma importancia desarrollar una nueva metodología más sensible para la digestión de los trozos de gel

electroforético. Las soluciones para alcanzar dicho objetivo pasan por reducir el volumen de los reactores empleados para las mineralizaciones y así obtener volúmenes finales de digestión muy pequeños, sin que ello suponga un deterioro de la reproducibilidad.

Electroforesis bidimensional

En la Figura 25 se comparan los geles bidimensionales teñidos resultado de la separación de un citosol de oído de rata blanco (Figura 25 a) y un citosol de oído procedente de una rata tratada con cisplatino (Figura 25 b). Las manchas electroforéticas señaladas han sido consideradas como diferencias de expresión entre muestras y su reproducibilidad ha sido constatada con sendas réplicas de ambas muestras.

La confirmación de diferencias de expresión en las muestras analizadas invita a la realización de nuevas experiencias, esta vez empleando muestras de cóclea mucho más especializadas. Las muestras empleadas hasta el momento engloban el laberinto óseo, el laberinto membranoso, un pequeño fragmento de nervio auditivo y una porción ósea de la pared posterior de la cóclea. Sin embargo, la región afectada por la ototoxicidad del cisplatino se localiza en partes diferenciadas del laberinto membranoso. Para desarrollar este estudio se debe abandonar el uso de la rata Wistar como animal de experimentación para trabajar con ejemplares de cobaya, que poseen órganos auditivos de mayor tamaño de los que es posible extraer el tejido membranoso de interés. La constatación de diferencias de expresión más notables en estas muestras más específicas, permitiría abordar con mayor fiabilidad los citados trabajos de identificación de las proteínas diferenciales, así como la localización e identificación de las proteínas con Pt separadas electroforéticamente.

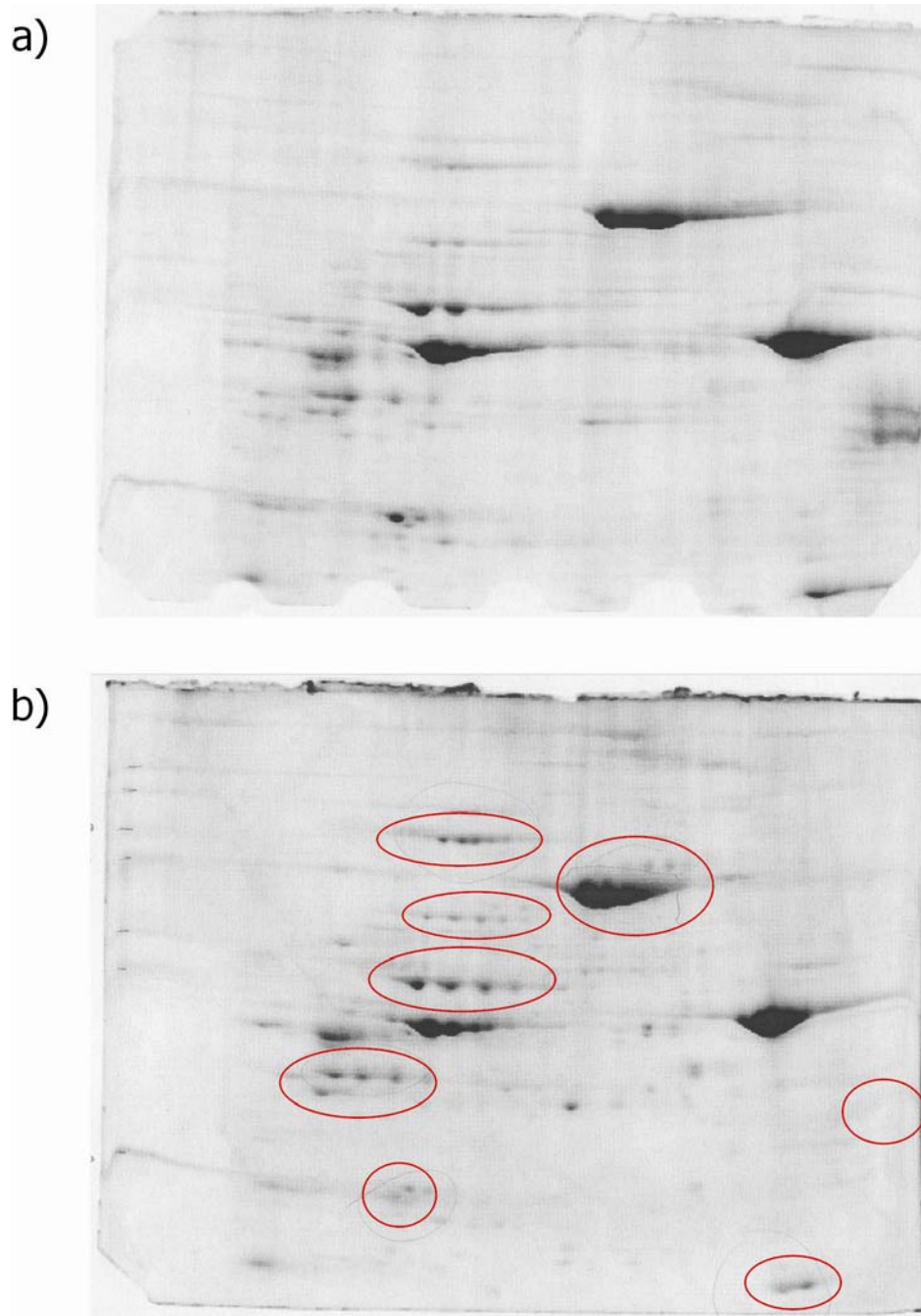


Figura 25. Geles electroforéticos 2D-SDS-PAGE del citosol celular de a) un oído interno control y b) un oído interno de una rata tratada con cisplatino.

C.3.2. Desarrollo de metodologías analíticas para la secuenciación de péptidos con Pt mediante ESI-LIT

C.3.2.1. Introducción

La comprobación de la robustez del enlace del fármaco con las proteínas del suero sanguíneo ensayadas (Trabajo 4), supone un paso importante en la caracterización de estas interacciones. De esta manera, el estudio de los péptidos derivados de la digestión de los aductos fármaco:biomolécula, se presenta como una alternativa metodológica al complicado análisis estructural de las bio-especies de Pt intactas^{85,86}.

Como consecuencia del Trabajo 4, se han realizado estudios de secuenciación de los péptidos seleccionados por su perfil isotópico modificado por Pt. Es importante tener en cuenta que estos péptidos objeto de estudio son minoritarios y que por tanto, pueden encontrarse en concentraciones bajas en la muestra a pesar de trabajar con digeridos de proteínas suficientemente concentradas. Por ello, son habituales leves variaciones en los perfiles isotópicos promediados para estos péptidos, en función de la sensibilidad puntual del equipo y de la correcta ionización de la muestra. Estas consideraciones cobran especial importancia debido a que las diferencias entre los perfiles isotópicos de los péptidos libres y los modificados con Pt pueden no ser importantes, y leves alteraciones debidas a los fenómenos anteriormente expuestos pueden conducir a conclusiones erróneas. Por ello, se hizo necesaria la confirmación de la presencia de Pt en los péptidos seleccionados a través de la secuenciación peptídica. Además, la consecución de este paso permitirá a su vez estudiar el sitio de unión y la forma química del fármaco unido al péptido, objetivo último de estos estudios de metalómica.

C.3.2.2. Materiales y métodos

Las muestras analizadas han sido digestiones tríplicas de los aductos cisplatino:HSA y cisplatino:apo-Tf, preparadas tal y como se describe en el Trabajo 4. El digerido fue desalado mediante el empleo de ZipTip antes de ser analizado por nanoESI-LIT (LTQ, Thermo Electron, Palo Alto, San José). La fragmentación de los péptidos de interés se llevó a cabo mediante CID (*Collision Induced Dissociation*).

En primer lugar, se seleccionaron potenciales péptidos con Pt a partir de los datos obtenidos en el Trabajo 4. En cada una de las dos muestras se encontraron más de 20 péptidos con perfiles isotópicos similares a los teóricos calculados para péptidos modificados con Pt. La herramienta utilizada para el cálculo de los perfiles isotópicos teóricos fue el programa Isotope Pattern Calculator 4.0. (www.geocities.com/junhuayam/pattern.htm).

Una vez seleccionados los péptidos de interés se procedió a su detección y secuenciación. Los resultados experimentales de la secuenciación de los péptidos fragmentados, se cotejaron con los péptidos teóricos calculados para la digestión trípica de HSA y apo-Tf, mediante el software de análisis de proteínas incluido en el sitio web de ExPASy (www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html) con el fin de comprobar que los péptidos analizados no correspondían a péptidos libres de Pt propios de cada proteína. Para ello, se buscaron las secuencias de cada proteína en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL, y se calculó el resultado de una digestión trípica de características similares a la desarrollada experimentalmente. De esta manera, se simuló una digestión de las secuencias buscadas donde se omitieron péptidos inferiores a 1000 Da, se permitió la existencia de péptidos que contuvieran hasta tres puntos de ruptura fallidos, se contempló la carbamidometilación de los grupos Cys debido al empleo de iodoacetamida y se posibilitó la oxidación de las Met para rendir metionin-sulfóxido.

C.3.2.3. Resultados y discusión

Los primeros datos de la secuenciación de péptidos con perfil isotópico similar al producido por péptidos modificados con Pt, han conducido a dos tipos de resultados. En primer lugar, aquellos péptidos que dieron lugar a un buen espectro de fragmentación se identificaron como péptidos libres de Pt presentes en la secuencia peptídica teórica de las proteínas analizadas (Figura 26), y por tanto, se descartó que fueran péptidos que contuvieran Pt.

RMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTK

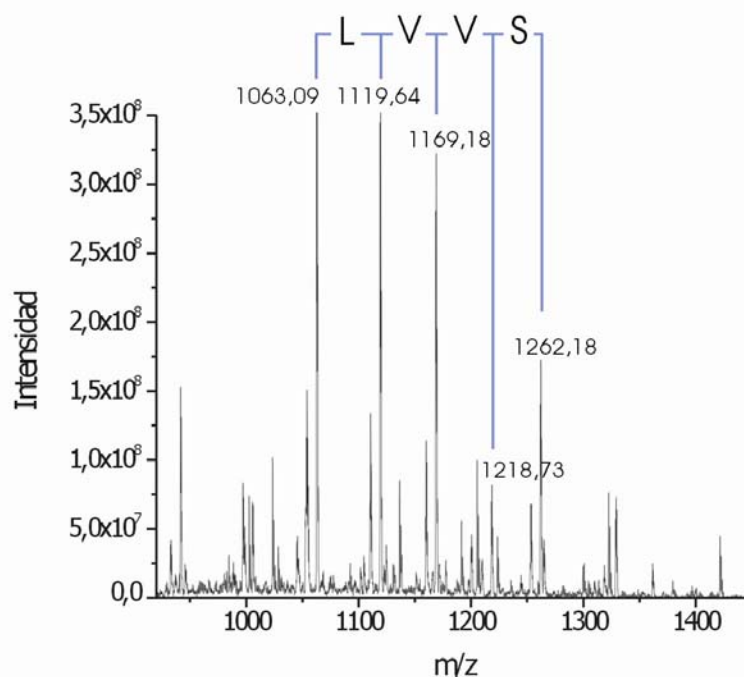


Figura 26. Espectro de fragmentación del cluster de iones de carga +4 a m/z 914,22-916,46 procedente de la digestión trípica del aducto cisplatino:HSA. Identificación del péptido precursor de peso 3543,81 Da.

Por otro lado, un segundo grupo de péptidos no han podido ser identificados debido a sus pobres espectros de fragmentación. Sin embargo, precisamente estos péptidos son los que muestran mayores indicios de contener Pt. Los perfiles isotópicos de los fragmentos resultantes que poseen buena intensidad, parecen indicar la presencia de Pt en ellos (Figura 27). Los perfiles isotópicos experimentales de fragmentos de un péptido sospechoso de contener Pt (Figura 27 a), se asemejan al perfil isotópico calculado para fragmentos del mismo tamaño y que contienen Pt (Figura 27 b y c). Sin embargo, difieren bastante de aquellos perfiles calculados para fragmentos sin Pt.

Como ya ha sucedido en el caso del análisis por ESI-FT-ICR de MT y del aducto cisplatino:MT (Trabajo 3), parece como si la presencia de Pt en la biomolécula entorpeciera la ionización y la fragmentación, dando lugar a espectros de baja calidad

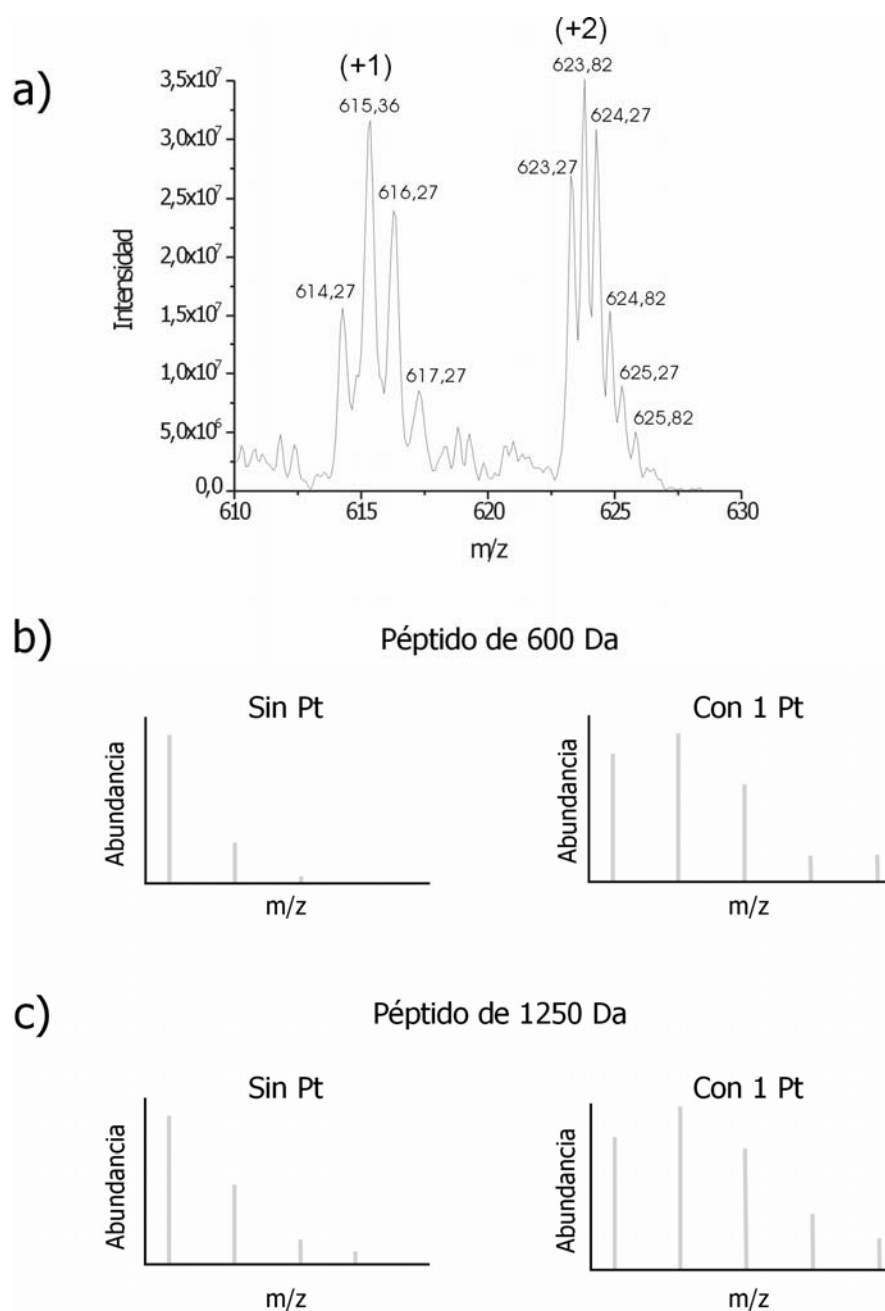


Figura 27. a) Detalle del espectro de fragmentación del cluster de iones a m/z 633,71-635,04 (carga +3) procedente de la digestión trípica del aducto cisplatino:HSA. b) Perfiles isotópicos teóricos de fragmentos peptídicos de 600 Da con y sin Pt en su estructura. c) Perfiles isotópicos teóricos de fragmentos peptídicos de 1250 Da con y sin Pt en su estructura.

difícilmente interpretables. Por ello, una opción de futuro para el análisis de estos péptidos puede pasar por el empleo de técnicas de última generación para la fragmentación de biomoléculas, como el sistema ETD (*Electron Transfer Dissociation*)²⁰⁴. Este novedoso sistema obedece a mecanismos de fragmentación distintos al sistema CID, existiendo además ciertas variables que hacen posible modular la fragmentación y así encontrar las condiciones experimentales más adecuadas para obtener un buen espectro de fragmentación. Otra ventaja de este sistema es que se caracteriza por preservar las modificaciones post-traduccionales lábiles, como pueden ser las interacciones metal:biomolécula, lo que la convierte en una herramienta muy interesante para aplicaciones metalómicas de todo tipo.

C.4. Capítulo IV:
Aplicaciones a los campos
de la medicina y
la biología molecular



C.4. Capítulo IV: Aplicaciones a los campos de la medicina y la biología molecular

Uno de los principales objetivos del trabajo presentado en esta memoria, ha sido el desarrollo de metodologías analíticas aplicables a muestras reales. De esta manera, ha sido posible la realización de análisis de muestras procedentes de ensayos *in vivo* y que han contribuido al entendimiento de los fenómenos que ocurren en el organismo cuando se administran fármacos antitumorales de Pt. Para llevar a cabo tales experiencias, se han establecido colaboraciones con grupos de investigación del ámbito médico y biológico, fruto de las cuales han sido publicados los trabajos que componen este capítulo.

C.4.1. Trabajo 5: Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration (*Acta Oto-Laryngologica* (2007))

El proyecto compartido con el grupo del Doctor Rafael Ramírez Camacho, de la unidad de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Puerta de Hierro, ha consistido en la determinación del contenido total de Pt en muestras de oído y cerebro de ratas Wistar sometidas a tratamientos monodosis con distintos fármacos antitumorales de Pt, con el fin de relacionar la acumulación de los fármacos con la pérdida de audición experimentada por los animales. El análisis de muestras de cerebro se justifica por el interés que suscita comparar órganos que comparten origen embrionario, con similar riego sanguíneo y con una disposición anatómica cercana.

En los últimos años, las investigaciones en este campo se han orientado hacia la elucidación de los mecanismos responsables de la pérdida de audición, una vez superada la etapa previa de descripción de los cambios funcionales que produce el cisplatino en el oído²⁰⁵. La constatación de la existencia o ausencia de una relación entre persistencia del fármaco en el oído y pérdida de audición, puede indicar la prevalencia de mecanismos reversibles, como los relacionados con disfuncionalidades transitorias por interferencias metabólicas del fármaco, o señalar a los daños estructurales irreversibles de células auditivas como responsables de la pérdida de audición⁶. Por ello, en el Trabajo 5 se abordó el estudio de la acumulación del cisplatino a lo largo de un periodo de tiempo

medio y su relación con la pérdida de audición de los ejemplares de rata Wistar empleados.

Para ello, se emplearon un total de 32 ratas Wistar a las que se administró una sola dosis de 5 mg Kg^{-1} de cisplatino de manera intraperitoneal y siguiendo un tratamiento estándar con diuresis inducida, así como control de la ingesta y de posibles infecciones. Se sacrificaron grupos de ratas a 3, 7, 30 y 90 días tras la administración, y se destinaron 8 ejemplares sin tratar para medir el nivel basal de Pt a cada tiempo. De cada uno de los ejemplares sacrificados se extrajeron el cerebro y el oído interno para la determinación del contenido total de Pt.

Mediante la técnica ABRs (*Auditory Brainstem Responses*), se comprobaron los umbrales de audición para los ejemplares empleados antes de someterlos al tratamiento e inmediatamente antes de su sacrificio. Aunque no se pudieron establecer correlaciones estadísticas entre los distintos tiempos post-administración, sí se constató un aumento en el umbral de audición en todas las ratas tras ser tratadas con cisplatino.

La medida del Pt total sobre las muestras secadas y mineralizadas en horno microondas, se llevó a cabo por nebulización directa en el ICP-MS. La máxima concentración de Pt se encontró, para ambos órganos, entorno a la primera semana tras la administración, siendo mucho más afín el oído a acumular el cisplatino y más propenso el cerebro a eliminar el fármaco acumulado. No se observaron correlaciones entre las pérdidas de audición y la acumulación del fármaco. Esta es la primera vez que se aplica la determinación de Pt total en oído a estudios de otorrinolaringología.

Trabajo 5

Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration

Acta Oto-Laryngologica (2007)

(Aceptado)

ORIGINAL ARTICLE

Cisplatin-induced hearing loss does not correlate with intracellular platinum concentration

R. RAMÍREZ-CAMACHO¹, D. ESTEBAN FERNÁNDEZ², J.M. VERDAGUER¹,
M.M. GÓMEZ GÓMEZ¹, A. TRINIDAD¹, J.R. GARCÍA-BERROCAL¹ &
M.A. PALACIOS CORVILLO²

¹Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid and ²Department of Analytical Chemistry, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Abstract

Conclusion. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) can be applied to organic tissues obtained from experimental animals. Hearing loss does not correlate with the platinum (Pt) concentration found in the inner ear. Drug structure and affinity to inner ear proteins could explain ototoxicity caused by cisplatin. **Objectives.** To analyse Pt affinity for brain and ear tissues (of similar embryologic origin) in the Wistar rat and clearance gradient after a single dose, and to correlate these findings with hearing changes. **Materials and methods.** Thirty-two Wistar rats were intraperitoneally injected with cisplatin at a dose of 5 mg/kg. Animals were sacrificed after obtaining auditory brain responses (ABRs) at 3, 7, 30 and 90 days (nine, seven, seven and nine animals, respectively). Brain and both temporal bones were extracted from each animal and analysed by ICP-MS to determine the absolute concentrations of the metal. Eight non-treated animals were employed as a control group. **Results.** The ABR thresholds were significantly elevated in animals from all groups after cisplatin treatment. A maximum accumulation of Pt for inner ear and brain was revealed around the first week: 3.175 (57%) and 0.342 (72%), respectively. Pt significantly accumulated in greater quantities in ear than in brain ($p < 0.01$) and was cleared at a higher rate in brain than in ear ($p < 0.01$) following cochlea/brain ratio analysis. No statistically significant correlation was found between amounts of Pt and hearing loss in the study animals.

Keywords: Hair cell, total Pt, ICP-MS, cisplatin ototoxicity, Wistar rat

Introduction

Platinum (Pt)-based treatments are some of the most commonly employed forms of chemotherapy, not only in organ-preservation treatments for head and neck cancer but also for other solid tumours, such as ovary, lung and brain. This has revolutionized the treatment of testicular cancer [1–5]. Cisplatin (*cis*-diamineddichloroplatinum (II)) was the first drug from this group to be employed and is still a first-line treatment for some neoplastic entities. Its main adverse effects are ototoxicity (irreversible hearing loss, tinnitus and dizziness), nephrotoxicity (renal dysfunction), bone marrow toxicity (anaemia, neutropenia and thrombocytopenia), gastrointestinal toxicity (nausea, vomiting, diarrhoea), liver toxicity

(hepatic failure) and peripheral nervous system toxicity (motor and sensory neuropathy) [6]. Most of these adverse effects can be prevented and treated, but cochlear damage is one of the most common reasons to discontinue chemotherapy with Pt-based compounds.

Although new chemical formulations for Pt-derived drugs have been developed to minimize these effects, there is evidence for a higher effectiveness of cisplatin in comparison with carboplatin when treating head and neck tumors [7].

Initially, most of the studies concerning cisplatin and ototoxicity dealt with functional changes [8,9]. More recently, research has been aimed at elucidating the mechanisms of cell damage induced by

Correspondence: R. Ramírez-Camacho, Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain. E-mail: rramirez@scorl.net

(Received 10 June 2007; accepted 14 August 2007)

ISSN 0001-6489 print/ISSN 1651-2551 online © 2007 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/00016480701635167

cisplatin. Cisplatin is a DNA-damaging agent and its cytotoxicity has generally been attributed to the ability to form inter-strand and intra-strand nuclear DNA cross-links. The fragmentation of DNA is diagnostic for the presence of apoptosis that is characterized by morphological changes such as cell shrinkage, chromatin condensation and fragmentation of DNA. Thus, not only ssDNA (a product of DNA fragmentation), but also Pt-DNA adducts have been found in different cell types of the inner ear, with a higher concentration in the stria vascularis [10]. However, the mechanisms by which nuclear cisplatin/DNA adducts generate the cytoplasmic cascade of events leading to apoptosis have not been defined. Only 1% of intracellular Pt is bound to nuclear DNA, with the great majority of the drug available to interact with other cellular targets such as phospholipids, cytosolic, cytoskeletal and membrane proteins, RNA and mitochondrial DNA [11].

To our knowledge, the affinity of Pt for certain organs and/or proteins and clearance capability by different tissues have not been explained sufficiently. As the central nervous system is also affected by the toxic effect of cisplatin and it shares with the inner ear a similar embryological origin, a common blood supply and anatomical proximity, comparison between both tissues could clarify some aspects of cisplatin-induced damage. The aim of the present study was to determine concentrations of Pt in these two organs (inner ear and brain), after the injection of a single dose of cisplatin in the Wistar rat, and to evaluate its persistence in both tissues in the short and the medium term to establish a correlation between Pt concentration and organ dysfunction.

Materials and methods

Animal model and design of groups

Forty Wistar rats weighing 200–300 g were studied, 32 were assigned to the study group and 8 to the control group. The animals were handled following the guidelines of the National Council for the Care of Laboratory Animals. Animals with signs of active or past infection by otoscopy or Preyer's test were excluded.

Experimental procedure

Animals were anaesthetized with a combination of ketamine (100 mg/kg) and diazepam (0.1 mg/kg) given intraperitoneally. After this, the rats were intraperitoneally injected with a cisplatin solution in saline medium (0.9% NaCl) corresponding to a dose of 5 mg/kg of rat. Saline was subsequently injected subcutaneously (5 ml) to induce diuresis.

Animals were later checked for correct food and water ingestion. No mortality was found among the rats treated with this dosage.

After drug administration, study group animals were distributed to different sacrifice intervals: nine rats were sacrificed at 3 days, seven rats at 7 days, seven animals at 30 days and the remaining nine rats at 90 days. In the control group ($n=8$) only 10 ml/kg NaCl 0.9% w/v was injected; animals from the control group ($n=8$) were distributed to the same sacrifice intervals, i.e. 3, 7, 30 and 90 days (two animals each).

Auditory brainstem responses (ABRs) were measured before drug administration and before the animals were euthanized (SPL dB). The ABR measurement in control rats proved to be highly reproducible in the retest schedule, indicating high inter-test reliability. A differential active electrode was placed subcutaneously below the test ear, a reference electrode at the vertex, and a ground electrode below the contralateral ear. Ten micro-second tone burst stimuli (8 kHz) were delivered monoaurally through an ear tip; 1500 presentations, delivered at 10 times per second, were averaged to obtain a waveform. Hearing threshold was defined as the lowest intensity of stimulation that yielded a reproducible waveform.

After sacrifice, brain and both temporal bones were removed and preserved for Pt quantification by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The animal's head was separated from the trunk and soft tissues were removed. Cranial bone was excised and then the whole brain was removed for Pt quantification (including meningeal tissue from the medulla). After this, a sagittal section of the cranial base was cut and temporal bones were resected using scissors. Tympanic bulla was opened by resecting hypotympanic bone until cochlear bulge was seen. Then cochlear bone was removed for quantification. The final ear specimen included spiral bone of cochlea, membranous labyrinth, a short fragment of acoustic nerve and a small portion of the posterior bony wall of the cochlea.

Quantitative determination of Pt in tissues

Samples were dried in a conventional oven up to a constant weight (6 h at 55°C and 3 h at 105°C). After this, the samples were homogenized by agate mortar grinding.

Dried samples (0.05–0.1 g) were placed in PFA advanced composite vessels and digested in a microwave oven (CEM MSP 1000, Matthews, NC, USA) with 2 ml of distilled HNO₃ and 0.6 ml of H₂O₂. The microwave digestion programme used was: (step 1) 1 min at 250 W, (step 2) 1 min at 0 W,

(step 3) 5 min at 400 W, (step 4) 6 min at 600 W and (step 5) 8 min at 750 W.

The digested samples were evaporated to dryness in Teflon vessels. Two more evaporation steps were performed adding 2 ml of aqua regia and 1 ml of HCl, respectively. The last step remnants were diluted with HCl 0.24 mol/L up to 5 ml.

An ICP-MS (Thermo X-Series X7, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch and an impact bead quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for the measurement of platinum. This is a highly sensitive and specific method as it employs an external calibration with ^{195}Pt isotope and uses $1\ \mu\text{g/L}$ of ^{191}Ir as internal standard. Pt blank level detection limit was 0.017 mg/kg.

All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA). High purity nitric and hydrochloric acids were obtained by the distillation of the analytical grade reagents in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Harretstasse, D-72800 Eningen, Germany). Stock solutions of Pt (1000 mg/L in HCl 0.5 mol/L; Spectrosol BDH, Poole, UK) and Ir (1000 mg/L in HCl 8%, Merck, 64271 Darmstadt, Germany) were diluted with HCl 0.24 mol/L to prepare standard solutions. Working solutions were prepared daily and then diluted with HCl 0.24 mol/L to final concentration.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. The statistical analysis was carried out using the Stat-View statistics program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Wilcoxon's and Kruskal-Wallis tests were used. The level of significance chosen was $p < 0.05$.

Results

Threshold shifts of ABRs

The ABR thresholds were elevated in animals from all groups after cisplatin treatment (Table I). ABR thresholds from the 3 days group were elevated from 28.3 (3.5) dB (mean \pm SD) to 45.5 (7.3) dB;

$p = 0.008$. At 7 days, ABR examination demonstrated an increase from 13.1 (11.3) dB to 27.2 (16.6) dB; $p = 0.005$. The ABRs of the 30 day group were elevated from 16.0 (15.6) dB to 32.1 (23.7) dB; $p = 0.028$. The long-term group (90 days) showed an increase from 29.7 (8.1) to 41.6 (9.6); $p = 0.028$. In the control group no threshold shifts were found ($p > 0.05$). Likewise, no significant differences were found in ABR thresholds in study animals depending on the survival time ($p = 0.790$).

Pt accumulation

Table II shows the Pt concentration in brain and cochlea and its ratio for each group of animals. Results are given as Pt concentration found in the tissue (mg Pt/kg dried tissue). These results show a higher accumulation of Pt in the cochlea than in the brain for rats from all the groups: 1.672 vs 0.211 at 3 days ($p = 0.008$); 3.175 vs 0.342 at 7 days ($p = 0.018$); 0.686 vs 0.052 at 30 days ($p = 0.028$) and 0.598 vs 0.027 ($p = 0.008$). The accumulation of Pt increased in both tissues, inner ear and brain, from 3 days to 7 days (1.672 (0.540) and 3.175 (1.944) ($p = 0.031$) for inner ear; 0.211 (0.080) and 0.342 (0.237) for brain ($p = 0.210$)) with a remarkable decrease at 30 days ($p = 0.001$ in cochlea and brain) and less at 90 days ($p > 0.05$ in cochlea and brain), revealing a tendency to clearing in both organs. This clearance rate is higher in cerebral tissue, as shown by the progressive increment of the proportion between cochlear and brain concentrations (from 8.133 at 3 days to 46.526 at 90 days). No traceable quantities of Pt were found in the control group.

No statistically significant differences were found between the amounts of Pt in cochlea and hearing loss ($p > 0.05$).

Discussion

Since it was introduced as an antitumoral agent, cisplatin-induced ototoxicity and nephrotoxicity have been well known side effects [12]. Once administered, the drug can enter some types of healthy cells as well as the tumour cells, either by

Table I. Auditory brainstem responses obtained in the different groups of animals after cisplatin (CDDP) injection or saline solution injection (control group).

Group	BAER pre-injection (SD)	BAER post-injection (SD)	<i>p</i> value
Control group	21.36 (3.2)	22 (4.2)	> 0.05
3 days	28.3 (3.5)	45.5 (7.3)	0.008
7 days	13.1 (11.3)	27.2 (16.6)	0.005
30 days	16.0 (16.6)	32.1 (23.7)	0.028
90 days	19.7 (8.1)	41.6 (9.6)	0.028

4 R. Ramírez-Camacho et al.

Table II. Pt concentration in dry tissue (mg/kg), standard deviation (SD) and cochlea/brain ratio after cisplatin treatment; Pt blank level of rats below the detection limit (0.017 mg/kg).

Group	Cochlea (SD)	Brain (SD)	Cochlea/brain (SD)	<i>p</i> value
Control group	0 (0)	0 (0)	0 (0)	>0.05
3 days	1.672 (0.540)	0.211 (0.080)	8.133 (1.068)	0.008
7 days	3.175 (1.944)	0.342 (0.237)	11.382 (1.773)	0.018
30 days	0.686 (0.080)	0.052 (0.009)	13.613 (2.767)	0.028
90 days	0.598 (0.598)	0.027 (0.026)	46.526 (39.138)	0.008

passive diffusion or active uptake by the cell. Inside the cell, cisplatin undergoes hydrolysis and has a number of possible targets such as DNA, RNA, sulfur-containing enzymes and mitochondria. Interaction of cisplatin with sulfur-containing enzymes is believed to be involved in resistance of cells to cisplatin.

Hearing loss is one of the most common side effects observed in patients receiving cisplatin for cancer treatment. Toxic effects of cisplatin show a great variability among patients, so it is necessary to consider an additional variable in these studies such as concentration of Pt in the different tissues. ICP-MS has allowed trace elements analysis in non-organic substances as well as biological tissues. It has been applied to examine the trace element composition of blood [13] and metabolic studies of minerals in humans [14]. ICP-MS is a widely employed analytical technique for pharmacokinetic studies of cisplatin. It has been used to detect Pt accumulation in cultured human non-small cell lung cancer cell lines [15].

By means of this technique, we have found a 10-fold higher deposition of Pt in inner ear than in brain, and the Pt clearance rate is faster in brain, as deduced from observing Pt quantities at different time points (Table II). These different concentrations detected in the inner ear and brain – which are in anatomical proximity, have a common embryological origin (ectoderm) and a common vascularisation – suggest that Pt has a higher histological affinity for the structures of the organ of Corti. A revision of the proteins that are present in the inner ear but not in the brain was reported by Thalman et al. [12,16], who described the organ of Corti proteins (OCPs), OCP1, OCP2 and oncomodulin, among others. These are proteins only present in the inner ear that may have undergone evolutive modifications for accomplishing its specific functional role.

We did not study the specific region in which the Pt deposited inside the inner ear. Our attempts to find specific structures of the organ of Corti with which Pt interacts by means of energy dispersive spectrometer have been unproductive to date (unpublished data). Proteomic analysis of cochlear protein expression after cisplatin administration has

shown both increases and decreases in the expression of cochlear proteins, so the characterization of these proteins should lead to a better understanding of cellular response to cisplatin [17].

Functional results (Table I) show that all animals receiving cisplatin had a hearing loss ($p < 0.05$), although no statistically significant differences were found among the study groups at each time point (Table II). Temporal variability in hearing function after a single dose of cisplatin could correspond either to direct action of the toxic agent or to endogenous mechanisms of cell regeneration. Although maximal action of cisplatin occurs at 7 days [18], Pt can act by means of metabolic interference (type II fibrocytes of the spiral ligament) or structural damage of hair cells, that could precede structural damage of supporting cells [19]. The first mechanism would cause a transient metabolic dysfunction that could possibly be reversible. However, the second mechanism could lead to irreversible damage of the sensory cells. This could explain the variability found in our functional results. Of course there is also the possibility of individual variations in the specific proteins of the organ of Corti (genetically or not genetically mediated), in the endogenous cytoprotective mechanisms of the cochlea and also transient variations in the same experimental animal. All these factors are extremely difficult to explore.

It is also important to note that quantification of Pt in our work includes Pt that is hydrated, hydrolyzed inside the nucleus, bound to RNA, bound to DNA and bound to other non-DNA proteins. Experimental data imply that DNA-bound intracellular Pt, that is, the cytotoxic Pt, is a small fraction of total intracellular Pt [20,21]. This fact could explain the lack of correlation between the amount of Pt deposited in tissues and functional changes.

It is well known that some tumours are resistant to cisplatin effects, and also some patients are more prone to develop hearing loss after cisplatin treatment. It is not yet clear whether there is a relation between these two phenomena or not, but it has been reported that there is no significant correlation between cisplatin sensitivity and cellular Pt accumulation in a study performed in non-small cell tumour cell lung cancer lines [15].

Future investigations of the accumulation, distribution, binding to biomolecules and biotransformation of different drugs with toxic effects on the inner ear in the cells of the organ of Corti will lead to avoidance of ototoxicity by means of pharmacological modifications.

References

- [1] Einhorn LH, Williams SD, Chamness A, Brames MJ, Perkins SM, Abonour R. High-dose chemotherapy and stem-cell rescue for metastatic germ-cell tumors. *N Engl J Med* 2007;357:340–8.
- [2] Mardiak J, Salek T, Sycova-Mila Z, Obertova J, Reckova M, Mego M, et al. Paclitaxel, bleomycin, etoposide, and cisplatin (T-BEP) as initial treatment in patients with poor-prognosis germ cell tumors (GCT): a phase II study. *Neoplasma* 2007;54:240–5.
- [3] Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, Lothe RA, Fossa SD. Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione s-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol* 2007;25:708–14.
- [4] Sonpavde G, Hutson TE, Roth BJ. Management of recurrent testicular germ cell tumors. *Oncologist* 2007;12:51–61.
- [5] Fung MK, Cheung HW, Ling MT, Cheung AL, Wong YC, Wang X. Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Cancer* 2006;95:475–84.
- [6] Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:36–42.
- [7] Balazova E, Hrubisko M, Ujhazy V. In vivo and in vitro effectivity of some platinum complexes. *Neoplasma* 1984;31:641–7.
- [8] Estrem SA, Babin RW, Ryu JH, Moore KC. Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1981;89:638–45.
- [9] Anniko M, Sobin A. Cisplatin: evaluation of its ototoxic potential. *Am J Otolaryngol* 1986;7:276–93.
- [10] Thomas JP, Lautermann J, Liedert B, Seiler F, Thomale J. High accumulation of platinum-DNA adducts in strial marginal cells of the cochlea is an early event in cisplatin but not carboplatin ototoxicity. *Mol Pharmacol* 2006;70:23–9.
- [11] Yang Z, Schumaker LM, Egorin MJ, Zuhowski EG, Guo Z, Cullen KJ. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:5817–25.
- [12] Blakley BW, Cohen JI, Doolittle ND, Muldoon LL, Campbell KC, Dickey DT, et al. Strategies for prevention of toxicity caused by platinum-based chemotherapy: review and summary of the annual meeting of the Blood-Brain Barrier Disruption Program, Gleneden Beach, Oregon, March 10, 2001. *Laryngoscope* 2002;112:1997–2001.
- [13] Lutz T, Nivel P, Schmidt B. Whole blood analysis by ICP-MS. In: Holland H, Eaton A, editors. *Application of plasma source mass spectrometry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1991. p. 96–100.
- [14] Sun X, Ting W, Ziesel S, Janghorbani M. Accurate measurement of stable isotopes of lithium by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 1987;112:1223–8.
- [15] Hanada T, Isobe H, Saitoh T, Ogura S, Saito K, Kawakami Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of platinum accumulation in human non small cell lung cancer lines. *Int J Clin Oncol* 1998;3:98–101.
- [16] Thalmann I. Inner ear proteomics: a fad or hear to stay. *Brain Res* 2006;1091:103–12.
- [17] Coling D, Ding D, Young R, Lis M, Stofko E, Blumenthal K, et al. Proteomic analysis of cisplatin-induced cochlear damage: methods and early changes in protein expression. *Hear Res* 2007;226:140–56.
- [18] Ramirez-Camacho R, Citores MJ, Trinidad A, Verdaguer JM, Garcia-Berrocal JR, Marero AM, et al. HSP-70 as a nonspecific early marker in cisplatin ototoxicity. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 2007;127:564–7.
- [19] Ramirez-Camacho R, Garcia-Berrocal JR, Bujan J, Martin-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 2004;114:533–7.
- [20] El-Kareh A, Secomb T. A mathematical model for cisplatin cellular pharmacodynamics. *Neoplasia* 2003;5:161–9.
- [21] Pascoe J, Roberts J. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds: I. DNA inter-strand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem Pharmacol* 1974;23:1359–65.

C.4.2. Trabajo 6: A new animal model of cisplatin ototoxicity: quantitative and functional results (*Hearing Research* (2008))

Otro punto de gran interés que se pretendió abordar, fue el desarrollo de un modelo animal para predecir la respuesta humana a la ototoxicidad inducida por el cisplatino. Hasta el momento los modelos animales empleados han tenido serios inconvenientes derivados de las elevadas dosis que se administraban a los ejemplares de experimentación y a la aplicación de tratamientos que diferían sustancialmente de los empleados en humanos. Con el diseño propuesto en el Trabajo 6 se evitan serios inconvenientes, como la elevada mortalidad de los animales o la contribución de aquellos ejemplares que desarrollan resistencia al fármaco.

Mediante la medida de la respuesta auditiva del tronco del encéfalo y la determinación de la concentración de Pt mediante ICP-MS en el oído de ratas tratadas con diferentes ciclos de cisplatino, se ha establecido que la ototoxicidad inducida por el tratamiento con este fármaco aparece en la primeras etapas tras la administración y no se relaciona con la acumulación del mismo en el órgano.

Trabajo 6

A new animal model of cisplatin ototoxicity: quantitative and functional results

Hearing Research (2008)

(Enviado)

A new animal model of cisplatin ototoxicity: quantitative and functional results

J.M. Verdaguer¹, D. Esteban-Fernández², J.R. García-Berrocal¹, M.M. Gómez-Gómez², M.A. Palacios Corvillo², R. Ramírez-Camacho¹

¹Ear Research Group, Department of Otorhinolaryngology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Universidad Autónoma de Madrid and ²Department of Analytical Chemistry, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

INTRODUCTION

For several decades, Pt-based drugs have been effectively employed in antitumoral treatments. Cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum[II]) was introduced as a chemotherapeutic drug for the treatment of many cancers like testicular, ovarian, head and neck, bladder, esophageal, and small cell lung (1), and remains a main antineoplastic drug for the treatment of solid tumours. Platinum-based treatments are some of the most employed forms of chemotherapy, not only in organ-preservation treatments for head and neck cancer but also for other solid tumours, such as ovary, lung, brain and other. It has revolutionized the treatment of testicular cancer. Cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum (II)) was the first drug from this group to be employed (2) and is still a first line treatment for some neoplastic entities. Its main adverse effects are ototoxicity (irreversible hearing loss, tinnitus and dizziness) (3,4), nephrotoxicity (renal dysfunction) (3), bone marrow toxicity (anemia, neutropenia and thrombocytopenia) (5), gastrointestinal toxicity (nausea, vomiting, diarrhoea) (6), liver toxicity (hepatic failure) (5) and peripheral nervous system toxicity (motor and sensory neuropathy) (7). Most of these adverse effects can be prevented and treated, but cochlear damage is one of the most common reasons to discontinue chemotherapy with platinum-based compounds (8).

Ototoxicity was found in the first clinic trials as a main side effect of the drug (9). However, its incidence and severity oscillate between different studies (10), from 7 to 100% (5,9,11-15) of prevalence. This uneven results have been explained by dose differences, velocity of administration, dehydration of patients, previous history of hearing loss (16) or genetic susceptibility (17).

Several animal models have been developed to predict human responses to the cisplatin-induced ototoxicity (18-21). Most of these animal models were based on a high cisplatin dose administrated in one single injection. But in our opinion, this is not a realistic approach, because in clinical practice, cisplatin is usually administrated in smaller doses in consecutive cycles. Because of this

difference our group decided to develop a new animal model of cisplatin-induced toxicity characterized by its administration in cycles to study its accumulation in inner ear and its functional repercussion.

MATERIAL AND METHODS

Animal model and design of groups

All animal procedures were performed according to the European Economic Community (EEC) Council directive 86/609. During the experiment, the animals were kept in individual cages, fed with commercial cubes and drinkable water *ad libitum* and maintained in an air-conditioned housing room with a 12 h light-dark cycle. A total of 48 female Wistar rats weighing 180–200 g on arrival at the housing room were used. Animals with signs of active or past infection by otoscopy or Preyer's test were discarded. By random selection they were divided into six groups (8 rats in each group) and treated as follows:

- Group 1: single cisplatin dose of 2.5 mg/kg (i.p.) injection
- Group 2: two consecutive courses of 2.5 mg/kg cisplatin i.p. injections, separated three weeks from each other
- Group 3: three consecutive courses of 2.5 mg/kg cisplatin i.p. injections, separated three weeks from each other
- Group 4: four consecutive courses of 2.5 mg/kg cisplatin i.p. injections, separated three weeks from each other
- Group 5: five consecutive courses of 2.5 mg/kg cisplatin i.p. injections, separated three weeks from each other
- Group 6: untreated controls.

In addition, all animals were daily injected with 10 ml of saline subcutaneously for hydration. Animals were regularly checked for a correct food and water ingestion. No mortality among the rats treated with this dose was found.

Rats were euthanized within 24 hours after the final injection of their group.

Auditory Brainstem Response

Auditory brainstem responses in SPL decibels were measured before each drug administration and before the animals were euthanized. The ABR measurement in control rats proved to be highly reproducible in the retest schedule, indicating high interest reliability. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/Kg) and diazepam (0.1 mg/Kg). Then, a differential active electrode was placed subcutaneously below the test ear, a reference electrode at the vertex, and a ground electrode below the contralateral ear. Ten microsecond tone burst stimuli (8 kHz) were delivered monoaurally through an ear tip. One thousand five hundred presentations, delivered at 10 times per second, were averaged to obtain a waveform. Hearing threshold was defined as the lowest intensity of stimulation that yielded a reproducible waveform.

Hearing thresholds were obtained in each group before and after a new course of cisplatin was injected to the animals.

After sacrifice, both temporal bones were removed and preserved for platinum quantification by Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (Q-ICP-MS). Animal head was separated from the trunk and soft tissues were removed. Cranial bone was excised and then the whole brain was removed. After this, a sagittal section of the cranial base was cut and temporal bones were resected using scissors. Tympanic bulla was opened by resecting hypotympanic bone until cochlear bulge was seen. Then cochlear bone was removed for quantification. Final ear specimen included spiral bone of cochlea, membranous labyrinth, a short fragment of acoustic nerve and a small portion of posterior bony wall of cochlea.

Quantitative determination of platinum in tissues

Samples were dried in a conventional oven up to a constant weight (6 h at 55°C and 3 h at 105°C). After this, the samples were homogenized by agate mortar grinding.

Dried samples (0.05-0.1 g) were placed in PFA Advanced Composite Vessels and digested in microwave oven (CEM MSP 1000, 3100 Smith Farm Road, Matthews, NC28105-5044, US) with 2 mL of distilled HNO₃ and 0.6 mL of H₂O₂. The microwave digestion program used was: (Step 1) 1 min 250 W, (Step 2) 1 min 0 W,

(Step 3) 5 min 400 W, (Step 4) 6 min 600 W and (Step 5) 8 min 750 W.

The digested samples were evaporated to dryness in Teflon vessels. Two more evaporation steps were performed adding 2 mL of aqua regia and 1 mL of HCl respectively. The last step remnants were diluted with HCl 0.24 mol L⁻¹ up to 5 mL.

A Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS) (Thermo X-Series X7, England), equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for the measurement of Pt. This is a highly sensitive and specific method as it employs an external calibration with ¹⁹⁵Pt isotope and uses 1 µg L⁻¹ of ¹⁹¹Ir as internal standard. Pt blank level detection limit was 0.017 mg/Kg.

All solutions were prepared with deionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA). High-purity nitric and hydrochloric acids were obtained by the distillation of the analytical-grade reagents in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Harretstasse, D-72800 Eningen, Germany). Stock solutions of Pt (1000 mg L⁻¹ in HCl 0.5 mol L⁻¹, Spectrosol BDH Limited Poole, England) and Ir (1000 mg L⁻¹ in HCl 8%, Merck, 64271 Darmstadt, Germany) were diluted with HCl 0.24 mol L⁻¹ to prepare standard solutions. Working solutions were prepared daily and then diluted with HCl 0.24 mol L⁻¹ to final concentration.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The statistical analysis was carried out using the Stat-View statistics program (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Wilcoxon's test and Kruskal Wallis' tests were used. The level of significance chosen was $p < 0.05$.

RESULTS

BAER results of the different groups can be found in Table 1. Figure 1 shows that hearing loss is incremental until the third cycle when it remains stable ($p < 0.05$). Table 2 displays Pt concentrations found in the cochlea of our experimental subjects.

Table 1. Results of BAER obtained in groups of animals after the administration of different cisplatin cycles

Groups	BAER pre-treatment	BAER post-treatment	P
Control	16.06	15.45	>0.05
1 cycle	19.06	38.13	<0.01
2 cycles	17.14	38.21	<0.01
3 cycles	15.36	43.57	<0.01
4 cycles	16.79	42.50	<0.01
5 cycles	15.83	41.52	<0.01

DISCUSSION

One of the main problems about ototoxicity studies is that there is not a single standardized definition of ototoxicity among all researchers (22,23). The most generally accepted definition has been enunciated by the American Speech-Language-Hearing-Association (ASHA): ototoxicity is the lessening of baseline hearing levels in 20 dBs in any frequency or 10 dBs in two adjacent ones after a drug administration (24).

Cisplatin induced damage has an early onset in all groups. Differences are statistically significant in all groups (minus control group) between baseline BAER levels and BAER levels after drug injection ($p < 0.001$). Studies from Ford and Tsukasaki and previous research from our group (25-27) in animal subjects mark the first 14-72 hours after drug injection as the onset of ototoxicity. This can be influenced by Pt concentration in cochlea. Studies in human beings show no conclusive results, Fausti and Sakamoto (28,29) display hearing losses after first administration of the drug but other researchers (30) stress the importance of long term hearing losses. These differences could be due to different doses and administration patterns. But there is a certain threshold that should be reached to unchain these degenerative changes. If this threshold is common for all subjects is still undetermined. Also a certain recovery after cisplatin administration has been proved in animal and human subjects. This recovery could be explained by supporting cells active role against ototoxicity. As long as supporting cells endure cisplatin induced damage, outer hair cells remain unaltered.

Table 2. Pt concentrations in dry tissue of cochlea (mg/Kg \pm SD)

Groups	Pt (mg/Kg)
Control (n = 8)	Not detected
Cycle 1 (n = 8)	1.96 \pm 0.35
Cycle 2 (n = 8)	1.25 \pm 0.32
Cycle 3 (n = 8)	1.33 \pm 0.44
Cycle 4 (n = 8)	1.09 \pm 0.09
Cycle 5 (n = 8)	2.20 \pm 0.05

* nd: not detected.

In our study cisplatin induced damage increases during first two cycles. Afterwards it remains stable within non lethal doses. These results resembles those obtained in oncologic patients, where ototoxicity is a frequent side effect of cisplatin use. Most of human patients treated with cisplatin show a certain degree of hearing loss. In our experiment hearing losses only increased up to third cisplatin dose.

A possible explanation of these results could be that using dose and intervals that closely resemble clinical use of the drug a confusion factor is removed. This confounding factor is mortality of experimental subjects. Most of previous animal models used single high cisplatin doses. These doses tend to create a high mortality rate between experimental subjects. Up to our knowledge there is only another similar to ours proposed by Minami *et al.* (31). The administration of a single high cisplatin dose could select cisplatin-resistant subjects invalidating the results obtained. None of the animals used in our study died during cisplatin administration.

Other problem that should be studied is that in common clinical practice cisplatin is rarely used as a single antineoplastic agent. Cisplatin is generally used in combination with other antineoplastic drugs. How these drugs interact and its repercussion in hearing loss is still largely unknown.

Another interesting finding in our study was that there were no statistically significant differences in cisplatin accumulation in cochlea in all groups after cisplatin administration (Table 2). Traditionally has been assumed that cisplatin ototoxicity was caused by cisplatin accumulation in the nucleus of outer hair cells affection their DNA (32). But this mechanism alone can not explain the results obtained in our study.

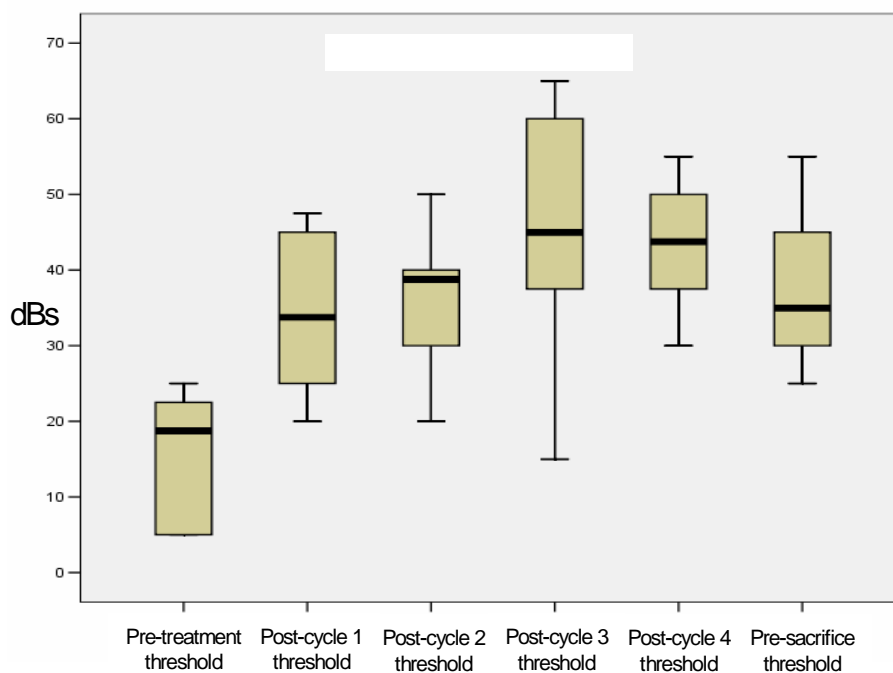


Figure 1. Hearing loss increase during cisplatin administration

CONCLUSIONS

The animal model presented in our study is a valid model to study cisplatin induced-ototoxicity mechanisms and their treatment. The main advantage of this model over previous ones are two: First, the lessening of mortality in experimental subjects and second, this model that resembles more closely habitual clinical use of the drug allowing to extrapolate their results to human beings.

Cisplatin induced-ototoxicity appears at early stages after drug injection. Its intensity increases up to a plateau level where stays stable within non lethal doses.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been financially supported by the Spanish CICYT (*CTQ-2005-08593 and BQU-2002-01348 projects*) and FIS 05/0673 grants.

References

(1) Lippert B. Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Wiley-VCH; Weinheim; 1999.

(2) Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698-9.

(3) Adams M, Kerby IJ, Rucker I, Evans A, Johnsen K, Franks CR. A comparison of the toxicity and efficacy of cisplatin and carboplatin in advanced ovarian cancer. *Acta Oncol* 1989;24:57-60.

(4) Fausti SA, Henry JA, Schaffer HI, Olson DJ, Frey RH, Bagby GC, Jr. High-frequency monitoring for early detection of cisplatin ototoxicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:661-6.

(5) Forastiere AA, Takasugi BJ, Baker SR, Wolf GT, Kudla-Hatch V. High dose cisplatin in advanced head and neck cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1987;19:155-8.

(6) Kobayashi H, Ohashi N, Watanabe Y. Clinical features of cisplatin vestibulotoxicity and hearing loss. *Otorhinolaryngology* 1987;49:67-72.

(7) Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:36-42.

(8) Fausti SA, Larson VD, Noffsinger D, Wilson RH, Phillips DS, Fowler CG. High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 1994;15:232-9.

- (9) Rossof AH, Slayton RE, Perlia CP. Preliminary clinical experience with cis-diammine-dichloro-platinum. *Cancer* 1972;30:1451.
- (10) Fausti SA, Larson VD, Noffsinger D, Wilson RH, Phillips DS, Fowler CG. High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 1994;15:232-9.
- (11) Langenberg M, Terhaard CH, Hordijk GJ, Es RJ, Voest EE, Graeff A. Simultaneous radio- and chemotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck in daily clinical practice: 5 years experience in a University Hospital. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004;29:729-34.
- (12) Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin MA, Izzi G, Corradini N, et al. Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:649-55.
- (13) Langer T, Stohr W, Bielack S, Paulussen M, Treuner J, Beck JD. Late effects surveillance system for sarcoma patients. *Pediatr Blood Cancer* 2004;42:373-9.
- (14) Simon T, Hero B, Dupuis W, Selle B, Berthold F. The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma. *Klin Padiatr* 2002;214:149-52.
- (15) Fausti SA, Henry JA, Schaffer HI, Olson DJ, Frey RH, Bagby GC, Jr. High-frequency monitoring for early detection of cisplatin ototoxicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:661-6.
- (16) Pollera CF, Marolla P, Nardi M, Ameglio F, Cozzo L, Bevere F. Very high dose cisplatin-induced ototoxicity: a preliminary report on early and long-term effects. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1988;21:61-4.
- (17) Peters U, Preisler-Adams S, Lanvers-Kaminsky C, Jurgens H, Lamprecht-Dinnesen A. Sequence variations of mitochondrial DNA and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Anticancer Res* 2003;23:1249-55.
- (18) Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 2004;198:137-43.
- (19) Ramirez-Camacho R, Garcia-Berrocal JR, Bujan J, Martin-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 2004;114:533-7.
- (20) Sergi B, Ferraresi A, Troiani D, Paludetti G, Fetoni AR. Cisplatin ototoxicity in the guinea pig: vestibular and cochlear damage. *Hear Res* 2003;182:56-64.
- (21) Sie KC, Norton SJ. Changes in otoacoustic emissions and auditory brain stem response after cis-platinum exposure in gerbils. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116:585-92.
- (22) Fausti SA, Larson VD, Noffsinger D, Wilson RH, Phillips DS, Fowler CG. High-frequency audiometric monitoring strategies for early detection of ototoxicity. *Ear Hear* 1994;15:232-9.
- (23) Liberman PH, Schultz C, Gomez MV, Carvalho AL, Pellizzon AC, Testa JR, et al. Auditory effects after organ preservation protocol for laryngeal/hypopharyngeal carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:1265-8.
- (24) American Speech-Language-Hearing-Association (ASHA). Guidelines for the audiologic management of individuals receiving cochleotoxic drug therapy. *ASHA* 1994;36:11-9.
- (25) Ramirez-Camacho R, Garcia-Berrocal JR, Bujan J, Martin-Marero A, Trinidad A. Supporting cells as a target of cisplatin-induced inner ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope* 2004;114:533-7.
- (26) Ford M.S., Whitworth C, Ryback LP, Ramkumar V. Up-regulation of adenosine receptors in the cochlea by cisplatin. *Hear Res* 1997;111:143-52.
- (27) Tsukasaki N, Whitworth C, Ryback LP. Acute changes in cochlear potentials due to cisplatin. *Hear Res* 2000;149:189-98.
- (28) Fausti SA, Henry JA, Schaffer HI, Olson DJ, Frey RH, Bagby GC, Jr. High-frequency monitoring for early detection of cisplatin ototoxicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:661-6.
- (29) Sakamoto M, Kaga K, Kamio T. Extended high-frequency ototoxicity induced by the first administration of cisplatin. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:828-33.
- (30) Bertolini P, Lassalle M, Mercier G, Raquin MA, Izzi G, Corradini N, et al. Platinum compound-related ototoxicity in children: long-term follow-up reveals continuous worsening of hearing loss. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:649-55.
- (31) Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res* 2004;198:137-43.
- (32) van Ruijven MW, Groot JC, Hendriksen F, Smoorenburg GF. Immunohistochemical detection of platinumated DNA in the cochlea of cisplatin-treated guinea pigs. *Hear Res* 2005;203:112-21.

C.4.3. Trabajo 7: Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation (*Biochim. Biophys. Acta*, 1743 (2005) 269-279)

Este trabajo es fruto de la colaboración con el Profesor Patricio Aller Tresguerres, perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). La labor desempeñada en este caso fue la determinación del Pt total en el interior celular y del Pt unido al ADN mediante FIA-ICP-MS con el fin de estudiar la apoptosis inducida por el cisplatino en la línea celular leucémica promonocítica humana U-937.

Concretamente se estudió el efecto de la inhibición de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) sobre la apoptosis inducida por el cisplatino. Las ERKs pertenecen a una familia de quinasas ricas en serina y treonina que se denominan proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), y que juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis celular. El empleo de inhibidores de las ERK parece proteger a la célula de la toxicidad del fármaco reduciendo la apoptosis en algunos tipos celulares, como es el caso de la línea celular empleada en este estudio.

De esta manera, en el Trabajo 7 se abordó el estudio de la influencia de los inhibidores PD98059 y U0126 de la ruta MEK/ERK, sobre la acción tóxica del cisplatino y su relación con procesos de oxidación intracelular, platinación del ADN, evolución de los niveles intracelulares de GSH²⁰⁶ y Pt, o activación de las proteínas quinasas C (PKC) en células U937. Igualmente se trataron de evidenciar paralelismos con otros fármacos antitumorales como el As₂O₃²⁰⁷ y la respuesta en otras líneas celulares.

En primer lugar se determinaron las concentraciones de cisplatino y los tiempos de exposición necesarios para observar un grado significativo de apoptosis celular en ausencia de necrosis. Se determinó como tiempo idóneo de exposición 3 h y una concentración de cisplatino de 75 µM. Se determinaron los niveles de fosforilación de las ERKs como medida de su activación, mediante inmunotransferencia (immunoblot o Western blot), observándose una activación de dichas quinasas en presencia de cisplatino y un aumento paralelo de la apoptosis. Una tendencia contraria en todos estos parámetros se constató al emplear inhibidores PD98059 y U0126 de las ERK, indicando

que estos inhibidores provocan una disminución de la apoptosis celular inducida por el cisplatino.

Aunque en todas las líneas celulares ensayadas el cisplatino produce la fosforilación de las ERK y sus inhibidores reducen la fosforilación, no en todas ellas se modula la apoptosis mediante el empleo de inhibidores de las ERKs. De manera semejante, se demostró que los inhibidores de las ERK no previenen la apoptosis inducida por otros fármacos antitumorales, que sin embargo si activan las ERK. Todo ello indica que la respuesta es dependiente tanto del modelo celular, como del fármaco empleado. Asimismo, la aplicación de inhibidores de PKC permitió deducir que esta proteína quinasa no interviene en la activación de las ERKs ni en la generación de apoptosis por acción del cisplatino.

Como etapa final de esta publicación se evaluó el efecto de los inhibidores de las ERKs sobre dos indicadores de la acción citotóxica del cisplatino, la platinación del ADN y la oxidación intracelular. Ambos indicadores crecen en presencia de cisplatino, sugiriendo su posible implicación en la toxicidad inducida por el fármaco. El empleo del inhibidor U0126 provoca un descenso en la cantidad de ADN platinado, así como en la cantidad de peróxidos intracelulares. Por el contrario, el empleo de agentes antioxidantes no reduce la fosforilación de las ERKs, lo que sugiere que los inhibidores de las ERKs ejercen su acción protectora en algún estadio por encima del disparo del estrés oxidativo. La medición del contenido intracelular de Pt mediante FIA-ICP-MS, permitió observar un descenso en el mismo en presencia de inhibidores de las ERKs. De esta manera, parece que el proceso de atenuación de la toxicidad del cisplatino por la inhibición de las ERKs se lleva a cabo mediante el descenso de la acumulación intracelular del fármaco, en la línea celular estudiada. Se hicieron pruebas para relacionar estos hechos con el contenido intracelular de GSH, tripeptido que interviene en la detoxificación del fármaco por extrusión de la célula. A pesar de esta propiedad, el GSH no se mostró como un factor implicado en la regulación de la citotoxicidad del cisplatino por inhibidores de las ERKs.

Trabajo 7

Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation,

Biochim. Biophys. Acta, 1743 (2005) 269-279.



Pharmacological inhibitors of extracellular signal-regulated protein kinases attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells via glutathione-independent reduction in intracellular drug accumulation

Donna Amrán^a, Patricia Sancho^a, Carlos Fernández^a, Diego Esteban^b, Adrián M. Ramos^a, Elena de Blas^a, Milagros Gómez^b, María A. Palacios^b, Patricio Aller^{a,*}

^aCentro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid, Spain

^bDepartamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

Received 16 June 2004; received in revised form 8 October 2004; accepted 13 October 2004

Available online 27 October 2004

Abstract

It has been reported that inhibition of extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) attenuates the toxicity cisplatin (*cis*-platinum (II)-diammine dichloride) in some cell types. This response was here investigated using human myeloid leukemia cells. Cisplatin stimulated ERK1/2 phosphorylation and caused apoptosis in U-937 promonocytic cells, an effect which was attenuated by the MEK/ERK inhibitors PD98059 and U0126. While ERK1/2 activation was a general phenomenon, irrespective of the used cell type or antitumour drug, the MEK/ERK inhibitors only reduced cisplatin toxicity in human myeloid cells (THP-1, HL-60 and NB-4), but not in RAW 264.7 mouse macrophages and NRK-52E rat renal tubular cells; and failed to reduce the toxicity etoposide, camptothecin, melphalan and arsenic trioxide, in U-937 cells. U0126 attenuated cisplatin–DNA binding and intracellular peroxide accumulation, which are important regulators of cisplatin toxicity. Although cisplatin decreased the intracellular glutathione (GSH) content, which was restored by U0126, treatments with GSH-ethyl ester and DL-buthionine-(*S,R*)-sulfoximine revealed that GSH does not regulate cisplatin toxicity in the present experimental conditions. In spite of it, PD98059 and U0126 reduced the intracellular accumulation of cisplatin. These results suggest that GSH-independent modulation of drug transport is a major mechanism explaining the anti-apoptotic action of MEK/ERK inhibitors in cisplatin-treated myeloid cells.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cisplatin; Apoptosis; ERK inhibitor; Drug accumulation; Glutathione; Myeloid cell

Abbreviations: Ac-DEVD-pNA, *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroaniline; BHA, butylated hydroxyanisole; BSO, DL-buthionine-(*S,R*)-sulfoximine; CDDP, cisplatin, *cis*-platinum (II)-diammine dichloride; DAPI, 4,6-diamino-2-phenylindole; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FI-ICP-MS, flow injection-inductively coupled plasma mass spectrometry; GSH, reduced glutathione; GSH-OEt, reduced glutathione ethyl ester; H₂DCFDA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase, stress-activated protein kinase 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; PKC, calcium-dependent protein kinase; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

* Corresponding author. Tel.: +34 918373112; fax: +34 915360432.

E-mail address: aller@cib.csic.es (P. Aller).

0167-4889/\$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bbamer.2004.10.009

1. Introduction

While the execution of apoptosis follows a basic set of well-characterized and in general well-conserved morphological and biochemical traits [see Ref. 1, as a historical perspective], the mechanisms responsible for the death signalling and regulation are less known, and are greatly dependent on both the apoptotic stimulus and cell type. One of the most relevant aspects in the regulation of apoptosis is the signalling by mitogen-activated protein kinases (MAPKs), a family of serine/threonine kinases which mediate intracellular signal transduction in res-

ponse to different stimuli [2]. Three major MAPKs have been identified, namely c-Jun NH₂-terminal kinases (JNK, stress-activated protein kinase 1), p38 (stress-activated protein kinase 2), and extracellular-signal regulated protein kinases (ERK1/2, p44/p42). As a general rule, JNK and p38 are mainly activated by cytotoxic insults and are associated to apoptosis induction. By contrast, ERKs are mainly (but not exclusively) activated by growth factors, stimulate cell proliferation, and as such prevent apoptosis [2,3]. However, this rule is subjected to multiple exceptions.

An apparent example of non-canonical role of MAPKs could be given by the protective action of ERK inhibitors against cisplatin toxicity in some cell types. Cisplatin is a DNA alkylating agent with proved efficacy in the treatment of a wide range of solid tumours and some forms of leukemia [4,5, and references therein]. This drug causes apoptotic and necrotic cell death by mechanisms primary related to the formation of DNA adducts, although other factors (e.g., intracellular oxidation, mitochondrial dysfunction and cytoskeleton disruption) may also play a decisive role [5–7]. Treatment of ovarian carcinoma cells [8,9] and the C8161 (but not other) melanoma cell line [10] with cisplatin caused ERK activation and cell death, and this later effect was potentiated by ERK inhibitors, indicating that ERKs behave as survival-inducing kinases in these cells. By contrast, blockade of ERK activation, either by pharmacological inhibitors or gene transfer procedures, reduced the cisplatin toxicity in cervical carcinoma [11,12], hepatoblastoma [12], osteosarcoma and neuroblastoma [13] cell lines. With few exceptions—e.g., the work of Yeh et al. [12], which investigated the regulatory role of NFκB—no clear explanation was given for the protective action of ERK inhibitors.

We earlier reported that cisplatin normally induces apoptosis in U-937 human promonocytic leukemia cells, but that the mode of death could be changed to necrosis after severe glutathione (GSH) depletion [6,14]. In fact, cisplatin may behave as a GSH-sensitive drug, in the sense that its toxicity is dependent on the intracellular GSH content [7,15, and references therein]. In addition, we recently observed that protein kinase C activators increased the toxicity of arsenic trioxide (another GSH-sensitive agent) in U-937 cells via ERK-mediated GSH depletion, and that MEK/ERK inhibitors reduced apoptosis by restoring the GSH level [16]. These observations led us to analyze the behaviour of ERKs, the effects of MEK/ERK inhibitors, and the possible influence of GSH, during cisplatin-induced apoptosis in promonocytic cells. The obtained results indicated that pharmacological MEK/ERK inhibitors attenuate the apoptotic action of cisplatin in human myeloid leukemia cells by reducing the intracellular drug accumulation. However, this effect is regulated in a GSH-independent manner.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All components for cell culture were obtained from Invitrogen S.A. (Barcelona, Spain). 4,6-Diamino-2-phenylindole (DAPI) was from Serva (Heidelberg, Germany). Monochlorobimane, dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), and rhodamine 123 were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The calcium-dependent protein kinase (PKC) inhibitor GF190203X was obtained from Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA). The MEK/ERK inhibitors PD98059 and U0126, and the caspase 3-specific substrate *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide (Ac-DEVD-*p*NA), were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Rabbit polyclonal antibodies against human p44/42 MAPK, phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), SAPK/JNK, and phospho-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody was from DAKO Diagnósticos, S.A. (Barcelona, Spain). Platinum, arsenic and germanium and iridium standard solutions (1 mg/ml) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were from Sigma (Madrid, Spain).

2.2. Cells and treatments

U-937 [17] and THP-1 [18] human promonocytic, HL-60 human promyelocytic [19], NB-4 human acute myeloid [20] leukemia cells, and RAW 264.7 mouse macrophages [21] were routinely grown in RPMI 1640, and NRK-52E rat renal tubular cells [22] in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 0.2% sodium bicarbonate and antibiotics in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. U-937, THP-1, HL-60 and NB-4 cells were seeded at 2 × 10⁵ cells/ml 18 h before the initiation of the experiments, while treatments with RAW 264.7 and NRK-52E cells were initiated at semi-confluence. For pulse-treatment experiments, the U-937 cells were incubated for 1–3 h with cisplatin, then washed twice with pre-warmed (37 °C) RPMI 1640 medium, and allowed to recover for the desired time periods in drug-free complete culture medium. Stock solutions of 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, 2 mM), etoposide (20 mM), camptothecin (10 mM), GF109203X (2.42 mM), PD98059 (20 mM), U0126 (2.63 mM), monochlorobimane (200 mM), and Ac-DEVD-*p*NA (5 mM) were prepared in dimethyl sulfoxide; butylated hydroxyanisole (BHA, 0.5 M) and H₂DCFDA (5 mM) in ethanol; and melphalan (164 mM) in a mixture of ethanol/HCl (40:1, v/v). All these solution were stored at –20 °C. Stock solutions of cisplatin (3.3 mM) and arsenic trioxide (100 mM) were prepared in distilled water; and stock solutions of DAPI (10 µg/ml), propidium iodide

(PI, 1 mg/ml), and rhodamine 123 (1 mg/ml), in phosphate-buffered saline (PBS). These solutions were stored at 4 °C. Solutions of reduced glutathione ethyl ester (GSH-OEt, 50 mM) and DL-buthionine-(*S,R*)-sulfoximine (BSO, 50 mM) were freshly prepared in PBS and distilled water, respectively, before application.

2.3. Determination of apoptosis, necrosis, and caspase activity

Distinctive characteristics of apoptotic cells were the presence of chromatin condensation/fragmentation and the acquisition of sub-G₁ DNA content. To examine chromatin structure, cells were fixed with ethanol, stained with DAPI, and examined by fluorescence microscopy. To measure DNA content, cells were permeabilized, stained with PI, and examined by flow cytometry. Distinctive characteristics of primary necrosis were the sharp increase in cell size and the free massive influx of dyes in non-permeabilized cells. This was determined by incubating non-permeabilized cells with trypan blue or PI, and examination by microscopy or flow cytometry, respectively. All these procedures were described in detail elsewhere [6].

Caspase-3 activity was determined *in vitro* by measuring the capacity of total cell extracts to cleave the caspase-3-specific substrate Ac-DEVD-pNA, following the earlier described procedure [14].

2.4. Measurement of peroxide accumulation and mitochondrial transmembrane potential

The intracellular accumulation of peroxides was determined using the fluorescent probe H₂DCFDA [23]. With this aim, the cells were grown in red phenol-lacking culture medium, and 1 h prior to treatment with cisplatin the cells were loaded with 5 μM H₂DCFDA. After treatment, the cells were centrifuged and resuspended in PBS, and the fluorescence measured by flow cytometry. Control cells were subjected to the same manipulation, except for treatment with cisplatin.

To measure the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$), cells were washed with PBS and then incubated for 20 min at room temperature with PBS containing 1 μg/ml rhodamine 123. After two washes and final resuspension in PBS, the fluorescence was measured by flow cytometry.

2.5. Measurement of intracellular GSH content

The total cellular GSH content was determined by fluorometry after cell loading with monochlorobimane, following the previously described procedure [6].

2.6. Immunoblot assays

To obtain total cellular extracts, cells were collected by centrifugation, washed with PBS, and lysed by 5 min

heating at 100 °C in Laemmli's buffer [24] containing a protease inhibitor cocktail, 10 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate. After centrifugation (5 min at 14,000×g, 4 °C), the supernatants (10 μg protein per lane) were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto membranes, and immunodetected, as previously described [25].

2.7. FI-ICP-MS determinations

For determination of total intracellular platinum and arsenic content, total cellular extracts were prepared as indicated above. For determination DNA-bound platinum, samples of 10⁷ cells were collected by centrifugation and washed with PBS, and the DNA was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the procedure described by the manufacturer. Concentrated HCl and HNO₃ solutions were purified by sub-distillation in a polytetrafluor ethylen distiller BSR-939IR (Berghof/America, Coral Springs, FL, USA). The flow injection (FI) manifold consisted of a peristaltic pump and one rotatory injection valve for sample injection (50 μl) into the 0.24 M HCl carrier (for platinum) or 0.30 M HNO₃ (for arsenic) streams at 1 ml/min. This manifold was connected directly to the ICP-MS via the nebulizer inlet tubing. A Quadrupole-ICP-MS (HP-4500, Agilent Technologies, Yokogawa Analytical System, Tokyo, Japan), equipped with a Babington-type nebulizer, a Fassel torch and a double-pass Scott-type spray chamber cooler by a Peltier system, was employed for the measurement. Peak areas were measured for the isotopes ¹⁹⁵Pt and ¹⁹¹Ir (internal standard for platinum), and ⁷⁵As and ⁷²Ge (internal standard for arsenic). Analysis was carried out by external calibration. Arsenic determination was not interfered with by the formation of ArCl⁺ since the chloride concentration in the cells did not exceed the minimum interferent level. The backgrounds obtained using extracts from control (cisplatin- and arsenic trioxide-untreated) cells were routinely subtracted from all values.

3. Results

3.1. Apoptosis induction

First, we measured the frequency of apoptosis in U-937 cell cultures treated with cisplatin under different experimental conditions. In a first group of experiments, cisplatin was applied at concentrations ranging from 35 to 250 μM for short time-periods (from 1 to 8 h). This was the experimental design commonly used by us and other researchers to analyze apoptosis induction by DNA-damaging drugs (including cisplatin) in myeloid leukemia cells [6, and other works]. Cisplatin caused a concentration-dependent (Fig. 1A) and time-dependent (Fig. 1B) increase in the frequency of cells with fragmented chromatin, which is a

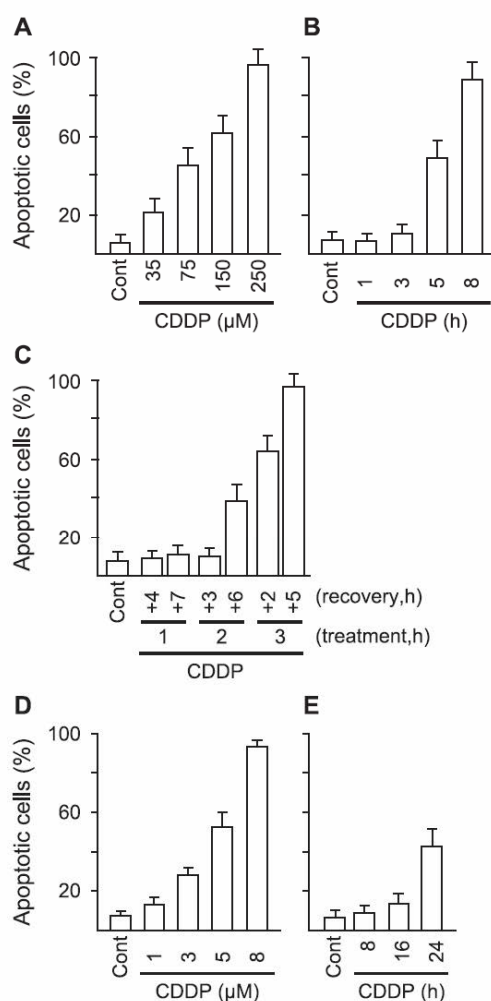


Fig. 1. Generation of apoptosis by cisplatin in U-937 cell cultures. The panels show the frequency of cells with fragmented chromatin, as determined by chromatin condensation/fragmentation, in untreated (Cont) and cisplatin (CDDP)-treated cultures. (A) Continuous treatment for 5 h with the indicated concentrations of cisplatin. (B) Continuous treatment for the indicated time-periods with 75 μM cisplatin. (C) Pulse-treatment with 75 μM cisplatin for 1, 2 and 3 h, followed by recovery for the indicated time-periods in drug-free medium. (D) Continuous treatment for 24 h with the indicated concentrations of cisplatin. (E) Continuous treatment for the indicated time-periods with 5 μM cisplatin. The results are the mean ± S.D. of at least three determinations.

characteristic of apoptosis. At the concentration of 75 μM cisplatin, approximately 50% of the cells were already apoptotic at 5 h of treatment (Fig. 1B). The frequency of apoptosis increased thereafter, but “secondary” (apoptosis-derived) necrosis and cell destruction started to be observed. Hence, 75 μM cisplatin and 5 h were the concentration and maximum time period adopted to analyze regulatory mechanisms with this experimental design. Pulse-treatment experiments indicated that a minimum of 3 h exposure to cisplatin was required for the drug to be fully effective—i.e., to cause similar toxicity as in the continuous treatment (compare 3+2 and 3+5 h in Fig. 1C, with 5 and 8 h,

respectively, in Fig. 1B). At all assayed conditions, the frequency of “primary” necrotic cells was negligible (approximately 4%, as in untreated cultures). A more detailed examination of apoptotic and necrotic markers was carried out in preceding works [6,14], and hence is omitted here.

For comparison with the conditions used with other cell models [9–12], experiments were also carried out in which lower cisplatin concentrations (1–8 μM) were applied for longer time periods (16–24 h). We also observed a concentration- and time-dependent apoptosis induction, reaching 40–50% at 24-h treatment with 5 μM cisplatin (Fig. 1D and E). However, this type of treatment also elicited other cellular responses, such as cell blockade at G₂/M, cell hypertrophy, and expression of differentiation markers (Ref. [26], and results not shown). For this reason, this experimental design was only occasionally used for confirmatory purposes.

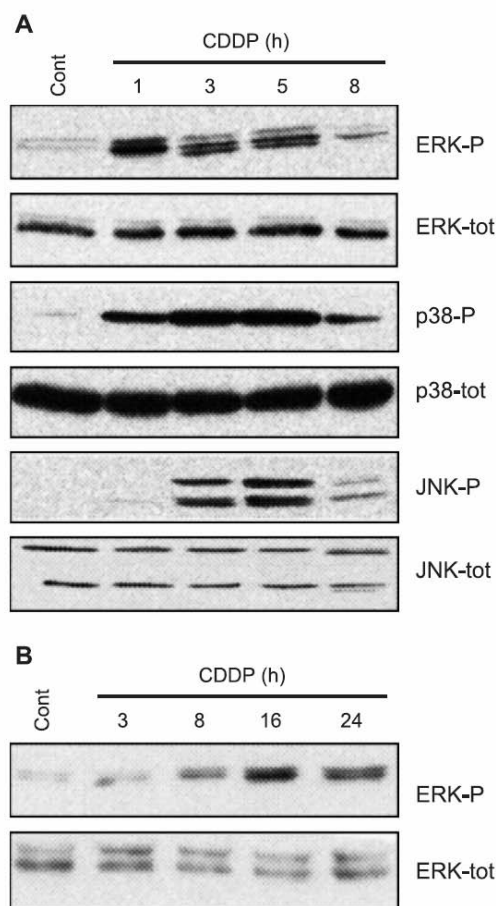


Fig. 2. MAPK activation by cisplatin. (A) Relative levels of total (-tot) and phosphorylated (-P) ERK1/2, p38, and JNK, in untreated U-937 cells (Cont) and cells treated for the indicated time-periods with 75 μM cisplatin, as measured by immunoblot using the appropriate antibodies. (B) Relative level of total and phosphorylated ERK1/2 in cells treated for the indicated time-periods with 5 μM cisplatin.

3.2. ERK activation and effect of ERK inhibitors

Next, we analyzed the capacity of cisplatin to cause ERK activation, as measured by the increase in the phosphorylation state. As indicated in Fig. 2A, 75 μ M cisplatin stimulated ERK1/2 phosphorylation, which was already detected at 1 h of treatment. Similar responses were observed with the other major MAPKs, which were here

analyzed for comparison—namely increased p38 phosphorylation at 1 h of treatment, and increased JNK phosphorylation at 3 h of treatment (Fig. 2A). Treatment with 5 μ M cisplatin (adopted for the long-term experiments) also stimulated ERK phosphorylation, albeit at later times (Fig. 2B).

The possible role of ERKs as regulators of cisplatin-induced apoptosis was then investigated using appropriate

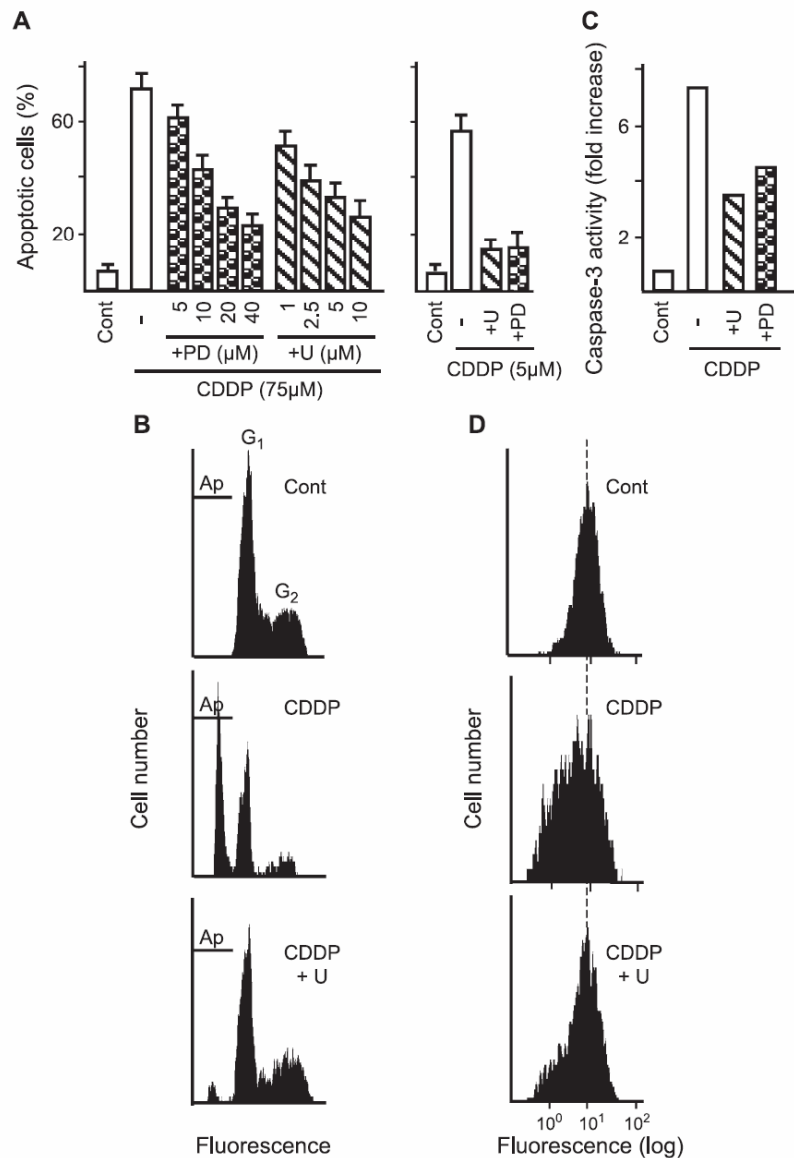


Fig. 3. Effect of ERK inhibitors on cisplatin-induced apoptosis, caspase-3 activity and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). (A) Left panel, frequency of U-937 cells with fragmented chromatin in untreated cultures (Cont) and cultures treated for 5 h with 75 μ M cisplatin in the absence (–) or presence of the indicated concentrations of PD98059 (+PD) and U0126 (+U). Right panel, similar determinations, using 5 μ M cisplatin, 20 μ M PD98059 and 2.5 μ M U0126, for 24 h. (B) Cell distribution according to their DNA content, as determined by cell permeabilization, PI staining and flow cytometry. Cells with sub-G₁ DNA content are considered as apoptotic (Ap). (C) Caspase-3 activity, as determined by in vitro assays using total cellular extracts and DEVD- ρ NA as substrate. (D) Disruption of $\Delta\Psi_m$, as determined by the changes in fluorescence upon rhodamine 123 loading. The vertical dotted line in each profile represents the main fluorescence value in the control, to better discern the displacement caused by the treatments. In B–D, cisplatin was applied at 75 μ M for 5 h, and PD98059 and U0126 were used at 40 and 10 μ M, respectively. The kinase inhibitors were always added 30 min before cisplatin. All other conditions were as in Fig. 1.

pharmacological inhibitors of the MEK/ERK pathway, namely PD98059 and U0126 [27,28]. More direct approaches could not be employed, due to the poor efficacy and/or excessive toxicity of the commonly used transfection procedures in U-937 and other myeloid cells (results not shown). It was observed that both PD98059 (in the range of 5 to 40 μM) and U0126 (in the range of 1 to 10 μM) caused a concentration-dependent attenuation of apoptosis induction by 75 μM cisplatin (Fig. 3A). On the basis of these observations—and also of our earlier results which demonstrated effective inhibition of ERK phosphorylation [16,25]—the concentrations of 40 μM PD98059 and 10 μM U0126 were adopted for further experiments. The MEK/ERK inhibitors also reduced apoptosis induction in the long-term experiments (24 h with 5 μM cisplatin: Fig. 3A). The protective action of the inhibitors was corroborated by measuring their capacity to decrease the frequency of cells with sub-G₁ DNA content, which is also a marker of apoptosis (Fig. 3B); and to attenuate the activity of caspase-3, which is required for apoptosis execution (Fig. 3C). In addition, the inhibitors reduced the dissipation of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) (Fig. 3D, and results not shown), a phenomenon

which normally accompanies, and may also regulate, apoptosis induction [29].

To analyze whether the protective action of MEK/ERK inhibitors was a cell line-specific effect, THP-1 human promonocytic, HL-60 human myelomonocytic, and NB-4 human acute promyelocytic leukemia cells were treated with 150, 40 and 100 μM cisplatin, respectively. These concentrations were adopted after performing dose-response assays (not shown), since they caused approximately 40–60% apoptosis at 5 h of treatment. It was observed that PD98059 and U0126 attenuated apoptosis in those cell lines, as measured by chromatin fragmentation (Fig. 4A). By contrast, the MEK/ERK inhibitors failed to attenuate apoptosis in RAW 264.7 mouse macrophages and NRK-52E rat renal tubular cells treated with 75 and 100 μM cisplatin, respectively, here used as additional controls (Fig. 4A). These results were corroborated by measuring the frequency of cells with sub-G₁ DNA (Fig. 4B). Adequate controls indicated that in all assayed cell lines cisplatin stimulated ERK phosphorylation, which was reduced by the MEK/ERK inhibitors (results not shown).

To analyze whether the protective action of MEK/ERK inhibitors is specific for cisplatin, U-937 cells were treated

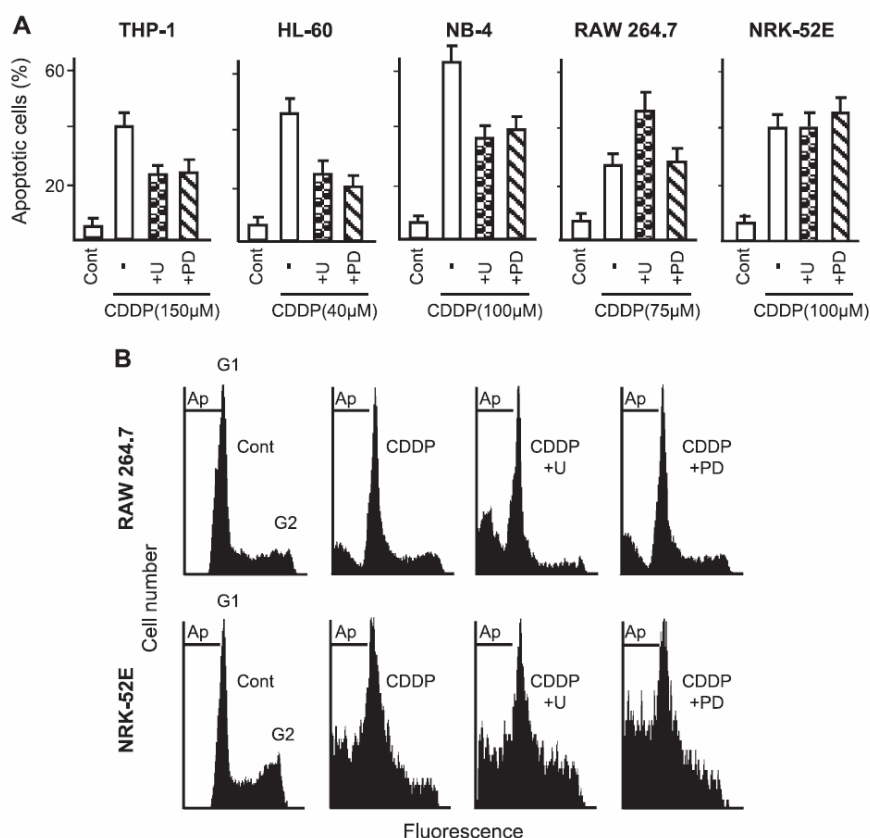


Fig. 4. Modulation of cisplatin-induced apoptosis by ERK inhibitors in different cell lines. (A) Frequency of apoptotic cells, as determined by chromatin fragmentation, in THP-1, HL-60, NB-4 and RAW 264.7 cell cultures treated for 5 h, and NRK-52E treated for 24 h with the indicated concentrations of cisplatin, in the absence (–) or presence of 10 μM U0126 and 40 μM PD98059. (B) Cell distribution according to their DNA content in RAW 264.7 and NRK-52E cells, using the same conditions as above. All other conditions were as in Figs. 1 and 3.

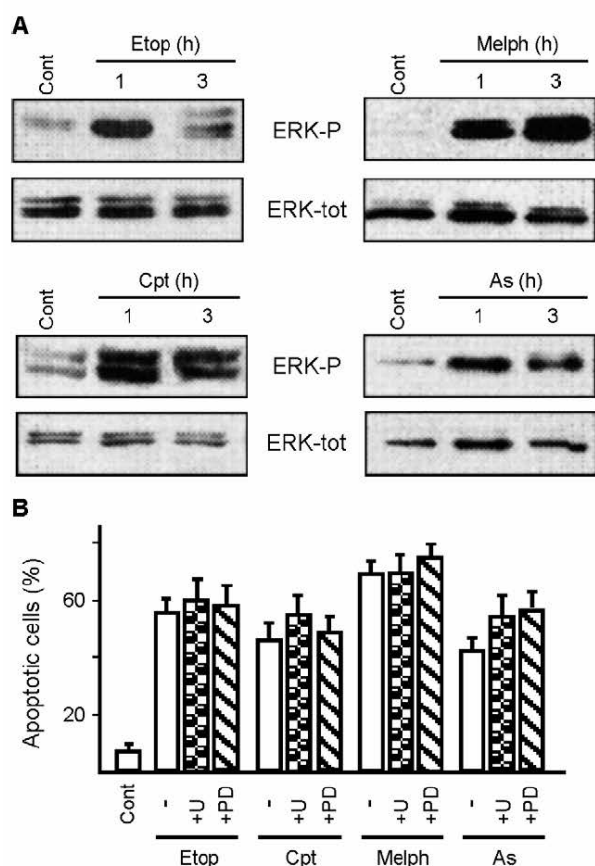


Fig. 5. ERK activation and apoptosis induction by different antitumour drugs. (A) Relative levels of total and phosphorylated ERKs in untreated U-937 cells (Cont) and cells treated for the indicated time periods with 10 μ M etoposide (Etop), 0.4 μ M camptothecin (Cpt), 40 μ M melphalan (Melph) and 35 μ M arsenic trioxide (As). (B) Frequency of apoptotic cells upon treatment for 5 h with the indicated drugs, in the absence (–) or presence of 10 μ M U0126 (+U) and 40 μ M PD98059 (+PD). All other conditions were as in Figs. 1 and 3.

with other antitumour drugs, namely the DNA topoisomerase II inhibitor etoposide (10 μ M), the DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin (0.4 μ M), the DNA alkylating drug melphalan (40 μ M), and the anti-leukemic agent arsenic trioxide (35 μ M). These concentrations were adopted from earlier studies [6] and preliminary dose-response studies (result not shown). These agents rapidly caused ERK activation (Fig. 5A), as in the case of cisplatin. Nonetheless, the MEK/ERK inhibitors failed to prevent the generation of apoptosis, as measured by chromatin fragmentation (Fig. 5B). These observations were corroborated by measuring the frequency of cells with sub- G_1 DNA content (result not shown).

It was earlier indicated that the activation of the MEK/ERK pathway by cisplatin may be mediated by PKC activation [8]. For this reason, additional determinations were carried out using GF109203X, a broad-spectrum PKC inhibitor [30]. Control assays indicated that 2 μ M GF109203X prevented the ERK activation caused by

20 nM TPA, a typical PKC activator (Fig. 6A). However, GF109203X did not affect ERK activation (Fig. 6A) and apoptosis induction (Fig. 6B) by cisplatin, indicating that these effects are independent of PKC in this experimental system.

3.3. DNA platination, intracellular oxidation and effect of antioxidants

It is generally accepted that the toxicity of cisplatin is primarily the consequence of its capacity to bind genomic DNA [5,7]. Nevertheless, we have demonstrated that cisplatin causes intracellular oxidation, which may also be important for apoptosis [6]. For these reasons, experiments were carried out to measure DNA platination, as an indication of cisplatin–DNA binding, as well as intracellular accumulation of peroxides, as an indication of oxidation. It was observed that cisplatin caused a time-dependent increase in the amount of DNA-bound platinum, which was reduced by U0126 (Fig. 7A). The maximum degree of reduction was attained at 3 h, the critical period to trigger apoptosis (see Fig. 1C), and decreased at 5 h, when apoptosis is already under execution (see Fig. 1B). Measurements at 1 h gave very low, unreliable values, and hence are omitted. In addition, cisplatin increased peroxide accumulation, and the increase was also reduced by U0126 (Fig. 7B). Noteworthy, experiments using antioxidant agents revealed that BHA (a nonspecific antioxidant) and catalase (specific against hydrogen peroxide) attenuated the cispla-

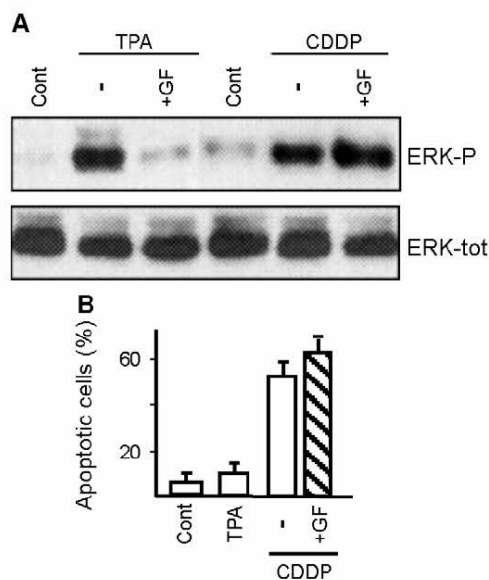


Fig. 6. Effect of PKC inhibition on ERK activation and apoptosis. (A) Frequency of total and phosphorylated ERKs upon treatment of U-937 cells for 3 h with 20 nM TPA or 75 μ M CDDP, in the absence (–) or presence of 2 μ M GF109203X (+GF). (B) Frequency of apoptosis in cell cultures subjected for 5 h to the same treatments. All other conditions were as in Figs. 1 and 3.

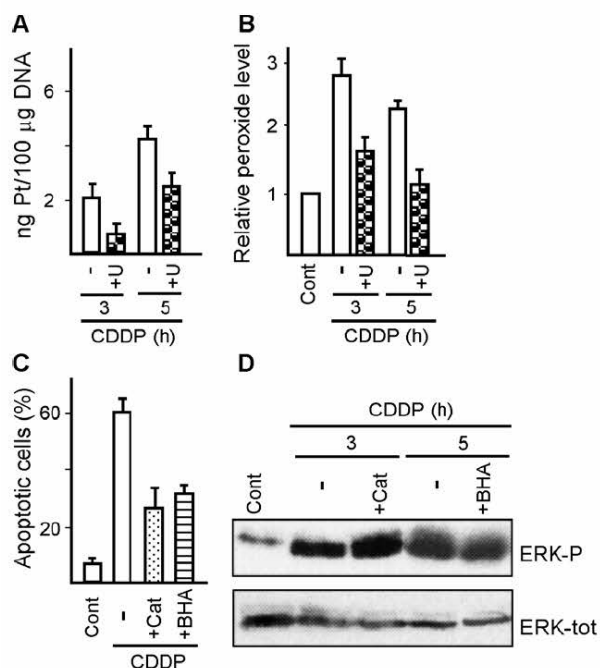


Fig. 7. DNA platination, intracellular oxidation, and effect of antioxidants. (A) Amounts of DNA-bound platinum, as determined by FI-ICP-MS, in U-937 cells treated for the indicated time periods with cisplatin, in the absence (–) or presence of U0126 (+U). (B) Changes in intracellular peroxide accumulation, as determined by H₂DCFDA-derived fluorescence, in U-937 cells treated for the indicated time periods with cisplatin, with and without U0126. The results are expressed in relation to untreated cells (Cont), which received the arbitrary value of one. (C) Frequency of apoptosis upon treatment for 5 h with cisplatin, either in the absence (–) or presence of 500 U/ml catalase (+Cat) or 200 µM BHA (+BHA). (D) Relative levels of total and phosphorylated ERKs upon treatment for the indicated time periods with cisplatin, with and without catalase and BHA. Cisplatin was always used at 75 µM, and U0126 at 10 µM. All other conditions were as in Figs. 1 and 3.

tin-provoked apoptosis (Fig. 7C), but failed to reduce ERK phosphorylation (Fig. 7D). Taken together, these results indicate that ERK inhibitors exert their protective action at some point upstream from the trigger of intracellular oxidation.

3.4. Intracellular platinum content

The observation that U0126 inhibited apparently unrelated effects of cisplatin, such as DNA platination and intracellular oxidation, might indicate that the ERK inhibitor affects the drug availability. For this reason, experiments were carried out to measure the intracellular platinum content, as an indication of cisplatin accumulation, in the absence and presence of MEK/ERK inhibitors. The results are indicated in Fig. 8A. It was observed that treatment for 1–5 h with 75 µM cisplatin caused a slow, progressive increase in intracellular platinum content, and that the increase was reduced by U0126 and PD98059. As in the case of DNA-bound platinum, the maximum degree of reduction was attained at 3

h, the critical regulatory period prior to apoptosis execution. By contrast, intracellular platinum was not reduced by the PKC inhibitor GF109203X in U-937 cells (Fig. 8A), or by PD98059 in RAW 264.7 macrophages (Fig. 8B), two situations in which cell death was not affected (see Figs. 6 and 4, respectively). Moreover, control experiments using arsenic trioxide revealed a rapid intracellular arsenic accumulation, which was not reduced and was even slightly increased by PD98059 (Fig. 8C), a result which parallels the effect of the inhibitor on arsenic trioxide-provoked apoptosis (see Fig. 5B). Taken together, these observations strongly suggest that reduction of intracellular drug accumulation is a mechanism by which MEK/ERK inhibitors attenuate the toxicity of cisplatin in U-937 cells.

3.5. GSH levels

It is known that cisplatin is detoxified by a mechanism which includes conjugation with GSH, followed by

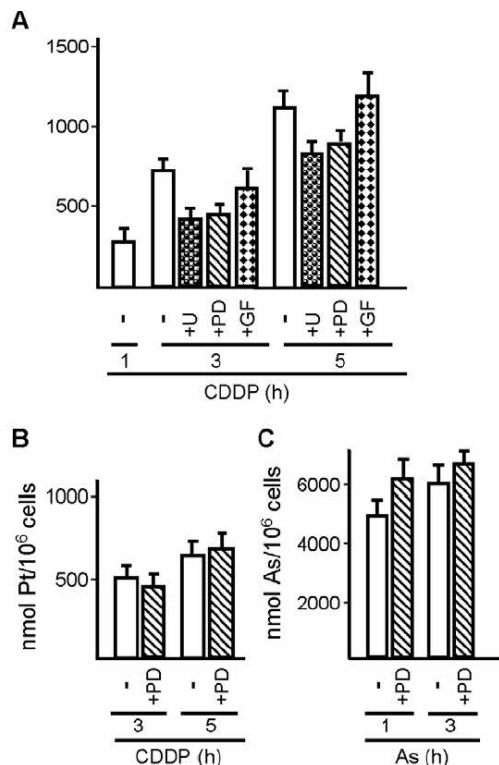


Fig. 8. Intracellular platinum and arsenic content. (A) Intracellular platinum content in U-937 cells treated for the indicated time periods with cisplatin in the absence (–) or presence of U0126, PD98059, or GF109203X. (B) Intracellular platinum content in RAW 264.7 macrophages treated with cisplatin in the absence (–) or presence of PD98059. (C) Intracellular arsenic content in U-937 cells treated with arsenic trioxide (As) in the absence (–) or presence of PD98059. Cisplatin and arsenic trioxide were used at 75 and 35 µM, respectively; and U0126 (+U), PD98059 (+PD) and GF109203X (+GF), at 10, 40 and 2 µM, respectively. The determinations were carried out by FI-ICP-MS, using total cellular extracts. The results represent the mean ± S.D. of four (A) or three (B, C) determinations.

extrusion from cell [7,15, and references therein]. For this reason, we asked whether the reduction in intracellular cisplatin accumulation and attenuation of apoptosis by MEK/ERK inhibitors could be a consequence of alterations in GSH content. As indicated in Fig. 9A, treatment with 75 μ M cisplatin decreased the GSH level, and the decrease was prevented by U0126. Nevertheless, the importance of GSH reduction as a regulatory event was unclear. In fact, GSH depletion was only clearly observed at 5 h of treatment, a time at which apoptosis is already under execution (see Fig. 1B); and U0126 did not modify GSH content at 3 h, a time at which the intracellular cisplatin accumulation was greatly decreased (see Fig. 8A). Hence, additional determinations were carried out using GSH-OEt, a cell-permeable compound earlier used to augment the intracellular GSH content in U-937 cells [31]. Since cisplatin could directly bind GSH in solution, in these experiments the drugs were separately administered—i.e., a 3-h pulse-treatment with

cisplatin alone, followed by recovery with GSH-OEt alone. As indicated in Fig. 9B, GSH-OEt failed to reduce the toxicity of cisplatin.

The relationship between GSH content and cisplatin toxicity was also examined in the long-term experiments using BSO, a specific inhibitor of the activity of γ -glutamylcysteine synthetase, the rate-limiting enzyme for GSH biosynthesis [32]. Although 1 mM BSO caused an approximately 50–60% reduction in intracellular GSH content at 14–24 h (Fig. 9C), co-treatment with BSO did not modify the cisplatin toxicity (Fig. 9D). This contrasts with the response of arsenic trioxide, the toxicity of which was potentiated by co-treatment with BSO (Fig. 9D). Taken together, these results indicate that GSH is not a regulatory factor for cisplatin toxicity under the here used experimental conditions.

4. Discussion

The results in this work corroborate our previous observations indicating that cisplatin causes apoptosis in U-937 promonocytic cells [6,14]. Pulse-treatment experiments revealed that a relatively prolonged exposure to the drug (3 h) is required for cisplatin to efficaciously trigger cell death. This contrasts with the rapid action of other antitumour drugs, such as arsenic trioxide or the DNA-damaging agents etoposide and camptothecin, which require shorter pulse-treatments (0.5–1 h) to trigger apoptosis (results not shown). The delayed effect of cisplatin on cell viability is consistent with, and may be a consequence of, its slow kinetics of intracellular accumulation and DNA binding (see Figs. 7A and 8A). Our results also show a correlation between ERK activation and apoptosis induction, as judged by the capacity of cisplatin to cause ERK phosphorylation, and the capacity of PD98059 and U0126 to attenuate cell death. Although this later effect was equally observed in all assayed human myeloid cell lines (U-937, THP-1, HL-60 and NB-4), it was not obtained with other cell types (RAW 264.7, NRK-52E), confirming the notion that the protective action of MEK/ERK inhibitors is a cell type-specific response [8–13]. On the other hand, the attenuation of cisplatin toxicity was a drug-specific response, which could not be reproduced with other antitumour drugs.

It must be pointed out that, although 1-h treatment period with cisplatin was insufficient to cause apoptosis, it sufficed to cause ERK activation (see Fig. 2), suggesting that this effect requires minimal levels, or is even independent of the intracellular drug content. A possible explanation is that cisplatin triggers kinase activation by direct interaction with plasma membrane components. In this regard, it has been demonstrated that cisplatin binds membrane phospholipids, causing perturbations in the bilayer structure which might affect the membrane functioning [33,34]. More specifically, it has been indicated that ERK activation and apoptosis

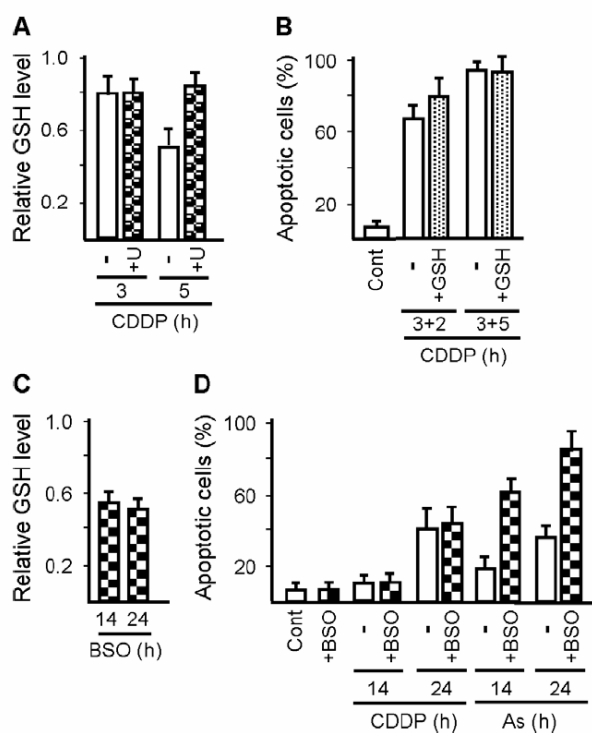


Fig. 9. GSH levels and effects of GSH-OEt and BSO. (A) Changes in intracellular GSH content, as determined by cell loading with monochlorobimane and fluorometry, in U-937 cells treated for the indicated time periods with 75 μ M cisplatin, in the absence (–) or presence of U0126 (+U). The values are expressed in relation to untreated cells (Cont), which received the arbitrary value of one. Approximate GSH content in controls: 9.5 nmol/ 10^6 cells. (B) Frequency of apoptotic cells in cultures pulse-labelled for 3 h with cisplatin alone, and then allowed to recover for 2 (3+2) or 5 (3+5) h in cisplatin-free medium in the absence (–) or presence of 5 mM GSH-OEt (+GSH). (C) Changes in intracellular GSH levels at the indicated time-periods of treatment with 1 mM BSO. (D) Frequency of apoptotic cells in cultures treated for 24 h with 1 mM BSO alone, and for the indicated time-periods with 5 μ M cisplatin or 4 μ M arsenic trioxide, either with (+BSO) or without (–) 24-h pre-incubation with BSO. All other conditions were as in Figs. 1 and 3.

induction by cisplatin and other DNA-damaging agents are mediated by growth factor receptor activation—although the exact mechanism by which the drugs may affect growth factor receptors is unclear [11,35, and references therein]. The observations that cisplatin behaved as an oxidant agent, and that the antioxidant *N*-acetyl cysteine attenuated epidermal growth factor receptor activation, ERK activation and apoptosis, suggested that intracellular oxidation may be an upstream mediator of cisplatin effects [11,35]. Nevertheless, this interpretation must be considered with caution, since *N*-acetyl-L-cysteine is a thiol-containing molecule, which could protect the cells by direct binding and inactivation of cisplatin, rather than because of its antioxidant properties. Actually, in our experiments the antioxidant agents BHA and catalase attenuated cell death without reducing ERK phosphorylation in U-937 cells. Instead, U0126 reduced peroxide accumulation, which is consistent with earlier results indicating that MAP kinases may mediate the trigger of oxidation in myeloid cells [25, and references therein]. On the other hand, the possibility that PKC could mediate the action of cisplatin in U-937 cells may be excluded, due to the inability of the PKC inhibitor GF109203X to prevent ERK phosphorylation and apoptosis in this cell line.

Finally, our results showed that the MEK/ERK inhibitors reduce the intracellular cisplatin accumulation in U-937 cells, which correlates with their capacity to attenuate apoptosis. The possibility that the protective action of the inhibitors could be a trivial consequence of cisplatin scavenging via direct drug–drug interaction in the extracellular milieu may be excluded, since no protection was observed in RAW 264.7 and NRK-52E cells, when used under similar experimental conditions as in U-937 cells. Hence, we may reasonably conclude that the MEK/ERK inhibitors somewhat affect the overall cisplatin transport system(s) in human myeloid cells. The identification of the exact target(s) of regulation is a difficult task, due to the great complexity and still incomplete knowledge of the cisplatin import/export machinery (reviewed in Ref. [7]). We focussed the attention on the intracellular GSH content, since (i) as indicated above, GSH depletion was apparently the immediate reason by which TPA-provoked ERK activation increased the toxicity of arsenic trioxide, a GSH-sensitive drug, in U-937 cells [16]; and (ii) the level of intracellular GSH was reported to be the rate-limiting step of the glutathione-based detoxification machinery in HepG2 cells, which leads to cisplatin extrusion from the cells [15]. However, intracellular GSH may not play a significant regulatory role in the present experimental conditions. In fact, treatments with the GSH elevating agent GSH-OEt and the GSH depleting agent BSO failed to affect the cisplatin-induced apoptosis (see Fig. 9B and D). Moreover, the decrease in intracellular cisplatin accumulation caused by MEK/ERK inhibitors at 3 h of treatment (see Fig. 8A) was not accompanied by a change in GSH level (see Fig. 9A). Hence, the late GSH decrease at 5 h of treatment with 75 μ M cisplatin (concomitant with the

execution of apoptosis) and its reversal by U0126 are probably a mere consequence of cell death. Of course, the exclusion of GSH as a critical factor does not invalidate the hypothesis that cisplatin transport (either drug uptake or efflux) is susceptible to regulation by protein kinases. For instance, PKC activation by phorbol ester was reported to potentiate cisplatin accumulation in HeLa cells by stimulating the rate of drug uptake [36]. On the other hand, the capacity of MEK/ERK inhibitors to provide a late protection against cisplatin in osteosarcoma and neuroblastoma cells [13] might indirectly argue for an increased rate of drug efflux in these cell types.

In summary, the present results represent the first direct demonstration that MEK/ERK inhibitors reduce cisplatin accumulation in human myeloid cells, and as such also provide a good explanation for the protective (anti-apoptotic) action of these inhibitors in these cells. Whether the same mechanism may account for the protective effect of ERK inhibition in other cell types remains to be investigated. Of course, this explanation does not exclude an additional contribution of other regulatory mechanisms—e.g., the modulation of critical transcription factor activities, as earlier reported [12].

Acknowledgements

This work was supported by Grants SAF2001-1219 and BQU2002-01348 from the Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Ministerio de Ciencia y Tecnología; Grant 01/0946 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo; and Grant 08.3/0011.3/2001 from the Dirección General de Investigación, Comunidad de Madrid, Spain. P.S., C.F. and D.E. were recipients of predoctoral fellowships from the Ministerio de Educación Cultura y Deporte (P.S.) and Ministerio de Ciencia y Tecnología (C.F., D.E.), Spain. A.M.R. was recipient of a postdoctoral fellowship from the Fundación Carolina, Spain.

References

- [1] J.C. Ameisen, On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 367–393.
- [2] L.A. Tibbles, J.R. Woodgett, The stress activated protein kinase pathways, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1230–1254.
- [3] T.G. Cross, D. Scheel-Toellner, N.V. Henriquez, E. Deacon, M. Salmon, J.M. Lord, Serine/threonine protein kinases and apoptosis, *Exp. Cell Res.* 256 (2000) 34–41.
- [4] R.S. Go, A.A. Adjei, Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 409–422.
- [5] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Structure, recognition and processing of cisplatin–DNA adducts, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2467–2498.
- [6] A. Troyano, C. Fernández, P. Sancho, E. de Blas, P. Aller, Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and

- necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47107–47115.
- [7] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene* 22 (2003) 7265–7279.
- [8] J. Hayakawa, M. Ohmichi, H. Kurachi, H. Ikegami, A. Kimura, T. Matsuoka, H. Jikihara, D. Mercola, Y. Murata, Inhibition of extracellular signal-regulated protein kinase or c-Jun N-terminal protein kinase cascade, differentially activated by cisplatin, sensitizes human ovarian cancer cell line, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31648–31654.
- [9] D.L. Persons, E.M. Yazlovitskaya, W. Cui, J.C. Pelling, Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 1007–1014.
- [10] A. Mandic, K. Viktorsson, T. Heiden, J. Hansson, M.C. Shoshan, The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis, *Melanoma Res.* 11 (2001) 11–19.
- [11] X. Wang, J.L. Martindale, N.J. Holbrook, Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39435–39443.
- [12] P.Y. Yeh, S.E. Chuang, K.H. Yeh, Y.C. Song, C.K. Ea, A.L. Cheng, Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signalling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF κ B activation, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 1423–1430.
- [13] W. Woessmann, X. Chen, A. Borkhardt, Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 50 (2002) 397–404.
- [14] A. Troyano, P. Sancho, C. Fernández, E. de Blas, P. Bernardi, P. Aller, The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 889–898.
- [15] K. Zhang, M. Chew, E.B. Yang, K.P. Wong, P. Mack, Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms, *Mol. Pharmacol.* 59 (2001) 837–843.
- [16] C. Fernández, A.M. Ramos, P. Sancho, D. Amrán, E. de Blas, P. Aller, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 3877–3884.
- [17] C. Sudström, K. Nilsson, Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937), *Int. J. Cancer* 17 (1976) 565–577.
- [18] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer* 26 (1980) 171–176.
- [19] S. Collins, R. Gallo, R. Gallagher, Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature* 270 (1977) 347–349.
- [20] M. Lanotte, V. Martin-Thouvenin, S. Najman, P. Balerini, F. Valensi, R. Berger, NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3), *Blood* 77 (1991) 1080–1086.
- [21] W.C. Raschke, S. Baird, P. Ralph, I. Nakoinz, Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus, *Cell* 15 (1978) 261–267.
- [22] J.E. De Larco, G.J. Todaro, Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation, *J. Cell. Physiol.* 94 (1978) 335–342.
- [23] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–855.
- [25] A. Galán, M.L. García-Bermejo, A. Troyano, N.E. Vilaboa, E. de Blas, M.G. Kazanietz, P. Aller, Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 11418–11424.
- [26] A. Ballester, C. Pérez, P. Aller, F. Mata, Differentiation of U-937 promonocytic cells with mitomycin c or *cis*-diamminedichloroplatinum II, *Int. J. Cancer* 65 (1996) 791–795.
- [27] D.T. Dudley, L. Pang, S.J. Decker, A.J. Bridges, A.R. Saltiel, A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7686–7689.
- [28] M.H. Favata, K.I. Horiuchi, E.J. Manos, A.J. Daulerio, D.A. Stradley, W.S. Feese, D.E. Van Dyk, W.J. Pitts, R.A. Earl, F. Hobbs, R.A. Copeland, R.L. Magolda, P.A. Scherle, J.M. Trzaskos, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18623–18632.
- [29] S.A. Susin, N. Zamzami, G. Kroemer, Mitochondria and regulators of apoptosis: doubt no more, *Biochim. Biophys. Acta* 1366 (1998) 151–165.
- [30] D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle, L. Duhamel, D. Charon, J. Kirilovski, The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15771–15781.
- [31] G. Filomeni, G. Rotilio, M.R. Ciriolo, Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p-38 MAP kinase pathway, *FASEB J.* 17 (2003) 64–66.
- [32] H.H. Bailey, L-SR-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues, *Chem.-Biol. Interact.* 111–112 (1998) 239–254.
- [33] G. Speelmans, R.W. Staffhorst, K. Versluis, J. Reedijk, B. de Kruijff, Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes, *Biochemistry* 36 (1997) 10545–10550.
- [34] M. Suwalsky, P. Hernandez, F. Villena, C.P. Sotomayor, The anticancer drug cisplatin interacts with the human erythrocyte membrane, *Z. Naturforsch., C* 55 (2000) 461–466.
- [35] M. Benhar, D. Engelberg, A. Levitzki, Cisplatin-induced activation of the EGF receptor, *Oncogene* 21 (2002) 8723–8731.
- [36] A. Basu, R.W. Evans, Comparison of the effects of growth factors and protein kinase c activators on cellular sensitivity to *cis*-diamminedichloroplatinum(II), *Int. J. Cancer* 58 (1994) 587–591.

D. Discusión integradora



En esta sección se presenta una discusión global de los resultados obtenidos dividida en tres apartados. Los dos primeros se han dedicado a la exposición de las aportaciones al desarrollo de nuevas metodologías analíticas y a la comprensión de los mecanismos de actuación de los fármacos de Pt, respectivamente. En el tercer apartado se discuten ciertas ideas o propuestas para la puesta en marcha de futuros trabajos de investigación a la vista de los resultados obtenidos.

Se pueden citar dos características fundamentales de la labor investigadora llevada a cabo. Por un lado, es importante destacar el carácter multidisciplinar de las investigaciones realizadas. Las colaboraciones con diversos grupos de investigación relacionados con el estudio de fármacos antitumorales de Pt, han dado lugar a publicaciones en áreas tan diferentes como la Química Analítica, la Otorrinolaringología o la Biología Celular.

Otra característica importante del trabajo realizado, y objetivo fundamental desde sus comienzos, ha sido la aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales. En la mayoría de las ocasiones, para la puesta a punto de las metodologías analíticas, se han empleado incubaciones de los fármacos antitumorales de Pt con patrones de las biomoléculas de interés. En todos los trabajos publicados se ha procurado hacer una aplicación final a muestras reales o a simulaciones lo más fieles posibles de las mismas, ya que el avance en este sentido, aunque complejo, supone un salto cualitativo en el desarrollo de herramientas analíticas para su empleo en metalómica.

D.1. Aportaciones fundamentales al desarrollo de metodología analítica

En este apartado se presenta la metodología analítica desarrollada, o en vía de desarrollo, para la determinación del contenido total de Pt y la especiación de los aductos fármaco:biomolécula presentes en tejidos, fluidos biológicos y cultivos celulares de organismos sometidos a tratamientos antitumorales con cisplatino, carboplatino u oxaliplatino.

D.1.1. Metodología analítica para la determinación del contenido de Pt en tejidos y en fracciones celulares por ICP-MS

La metodología empleada para la determinación del contenido de Pt en muestras biológicas procedentes de terapias con fármacos antitumorales de Pt, se ha basado en una mineralización en horno microondas con HNO₃ concentrado y H₂O₂. El método desarrollado ofreció una excelente reproducibilidad y exactitud (Trabajo 1), objetivo fundamental que se persiguió en la puesta a punto de esta metodología. El empleo de Ir como patrón interno en la cuantificación del Pt por calibración externa, permitió analizar ciertas muestras por nebulización directa en el ICP-MS sin necesidad de mineralización previa y con una adecuada corrección del efecto matriz de las muestras. Tal es el caso de los citosoles celulares y de sus subfracciones obtenidas por ultrafiltración. De esta manera, se pudieron determinar concentraciones totales de Pt en tejidos o fracciones celulares, paso previo imprescindible para abordar posteriores desarrollos analíticos.

D.1.2. Técnicas de fraccionamiento celular y citosólico

Las técnicas de ultracentrifugación y ultrafiltración, fueron empleadas para la obtención de las distintas fracciones celulares (nuclear, mitocondrial y citosólica) y subfracciones citosólicas (MW > 100 KDa, entre 50 y 100 KDa, entre 3 y 50 KDa, y < 3 KDa), respectivamente. Se probaron diferentes tiempos y velocidades de centrifugación, así como distintas etapas de lavado para asegurar la recuperación cuantitativa del Pt

presente en cada una de las fracciones de la muestra. El análisis del contenido total de Pt en cada una de las fracciones obtenidas, se realizó mediante ICP-MS.

Los residuos procedentes de las distintas etapas de ultracentrifugación, así como los filtros de corte y las fracciones retenidas en los mismos, fueron sometidas a una etapa de lavado con la solución extractante (Trabajo 1).

La idoneidad de los procesos de lavado diseñados se comprobó aplicando nuevas etapas de lavado y comprobando la ausencia de cantidades significativas de Pt en los sobrenadantes y filtrados.

D.1.3. Acoplamiento SEC-ICP-MS para la separación de bio-especies con Pt formadas en experimentos *in vitro* o *in vivo*. Primera dimensión cromatográfica (1D).

La elección de la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) como primera dimensión de separación se debe a su buena tolerancia a matrices de alta complejidad y a que, aunque no posee una buena resolución, es adecuada para la simplificación de la muestra, eliminando posibles interferentes de alto y/o bajo peso molecular.

El procedimiento empleado para la preparación de los citosoles empleados en el desarrollo metodológico, ha sido determinante para la correcta aplicación de esta primera dimensión. No se debe olvidar la extrema complejidad de muchas de las muestras analizadas, y por ello se ha prestado especial atención a la preparación del extracto celular soluble o citosol¹⁵⁶. La ultracentrifugación a 15000 g del homogeneizado del tejido en presencia de la solución extractante (10 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 7.4), es necesaria para obtener muestras citosólicas limpias de membranas celulares, núcleos y ciertos orgánulos. No menos importante es empleo de un cóctel de inhibidores de proteasas para prevenir las transformaciones de las bio-especies de Pt, o la utilización de filtros de nylon de 0,22 μ M para eliminar los pequeños orgánulos o partículas que no se han podido decantar con la centrifugación. Además, es importante realizar este filtrado en el mismo momento de la inyección cromatográfica, ya que de otra forma se producirían agregados de las proteínas presentes en la muestra que darían problemas de sobrepresión en la columna y de pérdida de especies platinadas de interés.

La conservación a -20 °C de los citosoles así preparados ha mostrado la ausencia de transformaciones de las especies platinadas presentes en la muestra y se han podido reproducir los perfiles cromatográficos tras semanas de almacenamiento (datos no publicados). Sin embargo, tanto el proceso de congelación, como el paso del tiempo, han conducido a una pérdida no selectiva de las especies platinadas, presumiblemente por el aumento de la mencionada agregación proteica y por la retención en el filtro previo a la columna cromatográfica de los agregados formados. Además, los análisis realizados en estas condiciones condujeron a depósitos en la cabeza de la columna y por tanto, redujeron notablemente la vida útil de ésta. Por ello, todas las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo inmediatamente después de la preparación del extracto citosólico.

En función de los objetivos perseguidos se emplearon distintos tipos de columnas SEC. En los Trabajos 1 y 2 se abordó la separación de las bio-especies con Pt presentes en citosoles de tejidos de ratas tratadas con fármacos antitumorales de Pt. Por ello, se empleó una columna Superdex 75 10/300 GL, con un amplio rango de separación de 3 a 70 KDa. Sin embargo, en el Trabajo 3 sólo fueron objeto de estudio las especies fármaco:GSH y fármaco:MT, por lo que se eligió una columna BioBasic SEC 60 con rango de separación entre 0,1 y 6 KDa. En ambos casos la detección de la señal de Pt se realizó mediante ICP-MS acoplado en línea a la columna cromatográfica, empleándose como fase móvil: 10 mM Tris-HCl pH 7,4 con 25 mM NaCl.

La revisión bibliográfica realizada no ha mostrado la existencia de publicaciones donde se aplicara la cromatografía SEC a la separación de bio-especies con Pt procedentes de tejidos. Gracias a la cuidada preparación de la muestra, en los Trabajos 1, 2 y 3, se presentan por primera vez separaciones de este tipo aplicadas a bio-especies de Pt formadas *in vitro* e *in vivo*.

D.1.4. Preconcentración de las bio-especies de Pt contenidas en las fracciones SEC de 1D para su separación mediante AE-FPLC-ICP-MS. Segunda dimensión cromatográfica (2D).

En muestras reales, los bajos contenidos de Pt hacen que sea de vital importancia trabajar con muestras suficientemente concentradas, máxime cuando se van a emplear diferentes dimensiones cromatográficas que van a diluir la muestra. Por ello, la aplicación de una nueva dimensión sobre las fracciones recogidas en 1D, está inevitablemente acompañada de la evaluación de diferentes métodos de preconcentración que garanticen la suficiente concentración de las bio-especies de Pt, así como la integridad de las especies a separar. Los métodos de preconcentración desarrollados y evaluados en el Trabajo 2 han sido:

- Evaporación con corriente de nitrógeno
- Liofilización
- Ultrafiltración
- Preconcentración en cabeza de la columna cromatográfica o focalización.

Los cromatogramas adquiridos en segunda dimensión tras la preconcentración de la muestra (Trabajo 2), se llevaron a cabo con una columna de intercambio aniónico para proteínas (Mono-Q H/R 5/5) acoplada a un sistema de detección elemental ICP-MS (Trabajo 2, Figura 4). Los estudios de focalización demostraron que una fase móvil A, compuesta por Tris-HCl 4 mM a pH 7,4 (con una fuerza iónica muy baja), es suficiente para retener en cabeza de columna las especies aniónicas de interés, que suponen la mayoría de las especies platinadas presentes en la muestra. Para la elución de las bio-especies de Pt focalizadas se aplicó un gradiente de fuerza iónica como el que se muestra en el Trabajo 2, siendo la fase móvil B: Tris-HCl 4 mM + acetato amónico 400 mM a pH 7,4. La baja concentración de Tris-HCl y el empleo de una sal de alta volatilidad como el acetato amónico, ha permitido realizar largas series de análisis sin una pérdida significativa en la sensibilidad del ICP-MS. Además, las especies minoritarias que no pudieron ser focalizadas por su carácter catiónico o neutro, pudieron ser recogidas como una fracción previa al comienzo del análisis, con el objeto de poder preconcentrarlas y separarlas más adelante empleando otro mecanismo de separación cromatográfico.

La sensibilidad y resolución obtenidas con la focalización en cabeza de columna, mejoró las obtenidas con las demás técnicas de preconcentración. La focalización posee la ventaja reducir considerablemente la manipulación de la muestra, así como la de ser un método de preconcentración muy rápido una vez obtenidas las fracciones en la primera dimensión cromatográfica. Además, minimiza los procesos de degradación de la muestra, transformación de especies o agregación de las proteínas, características estas muy importantes sobre todo en matrices complicadas como los citosoles celulares.

Las biomoléculas en general y las proteínas en particular tienen tendencia a fijarse en las paredes de los contenedores con suma facilidad, afectando este factor de manera determinante a las especies fármaco:biomolécula de interés. La pérdida de analito por este efecto ha podido observarse con claridad en los experimentos de preconcentración llevados a cabo para los análisis electroforéticos ensayados en el Capítulo III (C.3.1.3). En el caso concreto de la focalización no es necesario el empleo de ningún recipiente para preconcentrar la fracción SEC, una ventaja más que explica la mayor sensibilidad de esta opción. Por último, cabe destacar la simplicidad instrumental de la focalización, no requiriéndose equipos adicionales a los estrictamente necesarios para llevar a cabo la cromatografía de líquidos. Los demás procedimientos precisan de evaporadores, liofilizadores o centrifugas para su ejecución, y consumen gases o material como filtros de corte.

La puesta a punto de esta metodología bidimensional es un importante paso para la purificación mediante técnicas cromatográficas de las bio-especies de Pt procedentes de muestras biológicas complejas. Además, la compatibilidad del intercambio aniónico con una tercera dimensión cromatográfica constituida por fase inversa, hace aún más interesante esta aportación.

D.1.5. Caracterización estructural de las especies intactas fármaco:biomolécula en medios de incubación fisiológicos, suero sanguíneo y citosoles celulares, mediante técnicas estructurales de espectrometría de masas

Preparación de la muestra para la caracterización estructural

Los experimentos *in vitro* llevados a cabo para estudiar la interacción de los fármacos antitumorales de Pt con las biomoléculas del organismo, han de ser realizados en medios similares a los fisiológicos^{136,137} con el fin de obtener resultados que se correspondan con la realidad. Por ello, ha sido habitual el empleo de medios acuosos de alta salinidad que, sin embargo, son incompatibles con las técnicas estructurales de masas.

Para salvar este obstáculo, se ha recurrido a diversos procedimientos de desalado que incluyen diálisis, ultrafiltración o cartuchos de fase inversa. De todos ellos, la diálisis ha sido la que peores resultados ha ofrecido, y por ello ninguna publicación de las aquí presentadas emplea dicha técnica. En el Trabajo 3, referente al estudio de la interacción del cisplatino con la MT, las muestras fueron desaladas con cartuchos de C₁₈, mientras que en el Trabajo 4, los aductos platinados de apo-Tf y HSA fueron desalados con filtros de corte de 50 KDa. En este último caso, los filtros de corte sirvieron además para eliminar el fármaco libre sobrante de las incubaciones, que podría interferir en las posteriores digestiones trípticas y conducir a conclusiones erróneas en los análisis estructurales.

Ambos procedimientos de desalado dieron lugar a recuperaciones muy satisfactorias de las bio-especies platinadas, siendo despreciables las pérdidas de las biomoléculas ensayadas por retenciones irreversibles sobre los filtros de corte o sobre las fases estacionarias de los cartuchos C₁₈ empleados. Concretamente en el caso del empleo de fases estacionarias apolares para la preconcentración de biomoléculas de alto peso molecular, es extremadamente importante la comprobación de este tipo de interacciones irreversibles, ya que pueden conducir a una importante pérdida de muestra. El empleo de pequeñas cantidades de fase estacionaria incluidas en puntas de micropipetas, los llamados comercialmente ZipTip, es una solución a pequeña escala especialmente indicada para péptidos y que es de extraordinario interés cuando se

realizan análisis a pequeña escala, como los llevados a cabo con fuentes de ionización nanoESI (Capítulo III, C.3.2.2.) o en el caso de placas de MALDI.

Además, estos dos procedimientos han permitido preconcentrar la muestra, circunstancia de gran interés ya que las técnicas instrumentales empleadas para la elucidación estructural tienen una sensibilidad mucho menor que la técnica elemental ICP-MS empleada para el seguimiento de las bio-especies con Pt. Gracias a esta característica de los procedimientos de desalado, se ha podido desarrollar una metodología capaz de llevar a cabo análisis en medios salinos similares a los fisiológicos, empleando concentraciones de fármaco muy inferiores a las empleadas por otros autores y cercanas a las que se encuentran en muestras reales.

Si bien existe un equilibrio entre las ventajas e inconvenientes que presentan ambos procedimientos de desalado, el empleo de cartuchos de fase inversa destaca por su capacidad para emplear eluyentes compatibles directamente con las fuentes de ionización de las técnicas estructurales.

Caracterización estructural de los aductos fármaco:biomolécula intactos y de los derivados de cisplatino

A lo largo de la presente memoria se han abordado dos estrategias muy diferentes para caracterizar estructuralmente las bio-especies de Pt. La primera de ellas y más directa, ha sido el análisis de los aductos intactos fármaco:biomolécula mediante técnicas estructurales de masas, tales como ESI-Q-TOF, ESI-LIT o MALDI-TOF. Trabajar con las bio-especies nativas es garantía de conservación del enlace fármaco:biomolécula. Además, supone una reducción de la manipulación de muestra y habitualmente posibilita la fácil preconcentración de las especies. Otra ventaja adicional es el fácil tratamiento de los datos obtenidos de estos análisis.

El aducto cisplatino:GSH (Trabajo 3) se intentó caracterizar a través de MALDI-TOF y ESI-LIT. Los resultados obtenidos con la primera de estas técnicas no fueron satisfactorios ya que, aunque se registraron buenos espectros del GSH libre de fármaco, la ionización del aducto cisplatino:GSH fue muy problemática. Se probó, sin éxito, la variación de distintas condiciones experimentales como la intensidad del láser o el voltaje de aceleración, entre otras. Por el contrario, los análisis del aducto llevados a cabo

mediante nanoESI-LIT, resultaron relativamente sencillos y rápidos, no precisándose del empleo de condiciones experimentales especiales (Trabajo 3).

Otro ejemplo de caracterización directa de una bio-especie de Pt intacta, fue el aducto cisplatino:apo-Tf (Trabajo 4). Los espectros obtenidos mediante MALDI-TOF fueron poco concluyentes (datos no mostrados), ya que únicamente se pudo constatar un desplazamiento de la masa del aducto con respecto a la proteína libre de fármaco, pero en ningún caso se pudo determinar con precisión ese incremento debido a la falta de resolución del analizador de masas. En este caso no hubo problemas de ionización de la muestra empleando condiciones habituales para el análisis de proteínas por MALDI-TOF. El análisis del mismo aducto mediante ESI-Q-TOF, permitió obtener espectros deconvolucionados muy bien resueltos, donde se apreció claramente la unión del fármaco a la apo-Tf, así como la estequiometría del aducto y la forma química del cisplatino que interacciona con la proteína. Las condiciones experimentales empleadas fueron las que quedan reflejadas en la Tabla 1 del Trabajo 4.

Aunque no se trata de aductos fármaco:biomolécula, cabe citar en este apartado la determinación de los derivados del cisplatino en el medio de incubación citosólico empleado en el Trabajo 3. Al igual que en los casos anteriores, los análisis realizados con MALDI-TOF no condujeron a resultados concluyentes. Nuevamente hubo dificultades con la ionización de los derivados del cisplatino y sólo se consiguió detectar el fármaco intacto. La caracterización estructural del cisplatino y sus derivados, se pudo llevar a cabo mediante ESI-LIT.

La metodología analítica desarrollada aporta soluciones para el análisis estructural de los aductos fármaco:biomolécula en medios, proporciones y concentraciones cercanas a las fisiológicas, y por tanto es aplicable a muestras reales.

D.1.6. Caracterización estructural de las especies fármaco:biomolécula a partir de sus digeridos trípticos, mediante técnicas estructurales de espectrometría de masas

La exploración de una metodología alternativa a la caracterización estructural de las bio-especies de Pt intactas, surgió ante la complejidad que presentaban los análisis de algunas biomoléculas de gran tamaño. La complicada ionización de las bio-especies empleando técnicas de ionización blandas o la escasa resolución que presentan los analizadores más empleados a masas tan elevadas, son algunos de los principales problemas que se presentaron en este tipo de análisis.

Por ello, se abordó el desarrollo de la metodología necesaria para el análisis de los digeridos trípticos de los aductos fármaco:biomolécula. La aplicación de dicha metodología fue llevada a cabo con éxito para los péptidos platinados procedentes de los aductos que forma el cisplatino con proteínas del suero sanguíneo como la apo-Tf o la HSA (Trabajo 4).

El análisis de péptidos mediante técnicas estructurales de espectrometría de masas, es instrumentalmente más sencillo y preciso que el de proteínas. Algunas de las ventajas del análisis de este tipo de muestras son la fácil ionización de los analitos, la alta resolución con la que se pueden detectar las masas, la posibilidad de hacer un seguimiento de las especies platinadas a través de su perfil isotópico o la capacidad para realizar sucesivas fragmentaciones inducidas en el instrumento con fines de identificación estructural.

Sin embargo, el gran inconveniente de esta metodología es la posible ruptura del enlace entre el fármaco y la proteína como consecuencia de la digestión. En las tareas de desalado de la muestra, quedan descartados los filtros de corte por el tamaño mínimo disponible para estos filtros, siendo la alternativa más empleada el ZipTip. En el caso que nos ocupa (Trabajo 4), la necesaria separación de los péptidos resultantes de la digestión tríptica mediante una cromatografía de fase inversa acoplada a distintos detectores, cumplió el objetivo de desalar la muestra. Con el fin de trabajar con concentraciones adecuadas de péptidos, se optó por realizar labores de preconcentración previas a la digestión mediante los procedimientos anteriormente expuestos.

La metodología analítica desarrollada para la ejecución de esta estrategia, constó de dos partes. En primer lugar se monitorizaron mediante capLC-ICP-MS los aductos

digeridos para comprobar la existencia de péptidos con Pt. La cromatografía empleada fue de fase inversa (fase estacionaria C_8), y para poder acoplarla al ICP-MS se optó por emplear el formato capilar. Además, de esta manera se pudo aplicar la misma separación cromatográfica a la detección mediante ESI-Q-TOF, y así utilizar la información obtenida en los análisis capLC-ICP-MS para localizar los péptidos con Pt en los espectros de la técnica estructural. En el caso de ESI-Q-TOF, la infusión directa del digerido hubiera sido, probablemente, suficiente para resolver adecuadamente la mayoría de los péptidos procedentes de digeridos sencillos como los llevados a cabo en el Trabajo 4. Sin embargo, se mostró necesario el acoplamiento de una cromatografía previa (RP-capLC-ESI-Q-TOF) ya que los péptidos que se buscaban eran minoritarios en comparación con los que no tenían Pt y una infusión directa de todos los péptidos penalizaba la ionización de los péptidos de interés. Además, de esta manera, la metodología desarrollada está lista para ser aplicada a muestras de una complejidad muy superior, como los digeridos de fracciones de tejidos de organismos vivos.

Además de los datos de capLC-ICP-MS, se utilizaron los perfiles isotópicos de los péptidos monitorizados por capLC-ESI-Q-TOF para localizar aquellos péptidos que incorporaban Pt. Por comparación de los perfiles isotópicos obtenidos con los teóricos para péptidos con una molécula de cisplatino o alguno de sus derivados, se postuló la presencia de Pt en los péptidos separados.

Empleando esta estrategia de caracterización estructural se obtuvieron datos de péptidos que contenían Pt tras una digestión triptica, no sólo de aductos procedentes de incubaciones con patrones, sino también de incubaciones *in vitro* en muestras reales de suero sanguíneo humano, siendo el Trabajo 4 el único encontrado en la bibliografía hasta la fecha, que presenta resultados de péptidos platinados procedentes de muestras reales.

Un paso más en el desarrollo metodológico de esta estrategia está siendo llevado a cabo en la actualidad, tal y como se ha mencionado en el Capítulo IV. Hasta ahora, sólo se puede decir que aquellos péptidos que parecen contener Pt no son fácilmente fragmentables mediante CID, que es la metodología habitualmente empleada para la secuenciación peptídica. Alternativas basadas en otros métodos de fragmentación, como el ETD, y en el estudio de las condiciones de fragmentación más adecuadas para los péptidos con Pt, son líneas de investigación actualmente abiertas. En este sentido, la incubación del fármaco directamente con los péptidos resultantes de la digestión triptica, puede ser de gran utilidad al aportar péptidos platinados mayoritarios en la muestra.

D.1.7. Metodología de separación electroforética como complemento de las separaciones cromatográficas puestas a punto

La preparación del citosol celular en medio salino, a pH controlado (7,4) y con inhibidores de proteasas, junto con su inmediato análisis, minimiza el riesgo de degradación de las especies de Pt presentes en la muestra. Esta suave preparación de muestra es suficiente para abordar separaciones por cromatografía de líquidos de diversos tipos (Trabajos 1, 2 y 3). La adecuada resolución de la gran cantidad de especies presentes en muestras tan complejas como citosoles celulares, requiere de separaciones cromatográficas multidimensionales. Una alternativa con mayor capacidad de resolución, es la separación por 2D-SDS-PAGE¹⁷¹. En un solo proceso separativo se pueden resolver cientos de proteínas, lo que es de sumo interés para el estudio de estas muestras. Sin embargo, uno de los requisitos para alcanzar tal grado de resolución es la adecuada preparación de la muestra, abriendo y desnaturalizando previamente las proteínas.

Con el fin de evaluar el posible empleo de técnicas de separación electroforéticas, se ha comprobado la robustez del enlace fármaco:biomolécula en las condiciones de preparación de muestra habituales en electroforesis en gel (Trabajo 1). Para ello, se han comparado los perfiles cromatográficos obtenidos por SEC-ICP-MS monitorizando ¹⁹⁵Pt, de citosoles nativos de oído y riñón, y de citosoles sometidos a ruptura de los puentes disulfuro con BME y/o desnaturalizados con SDS. En presencia de los agentes desnaturalizantes, se observaron leves desplazamientos de los picos cromatográficos hacia regiones de pesos moleculares menores. Sin embargo, no se detectaron picos cromatográficos correspondientes al fármaco libre. Este hecho demostró la resistencia del enlace fármaco:biomolécula a tratamientos relativamente agresivos como los propios de la electroforesis en gel.

Comprobada la estabilidad de estos aductos, se abordó la separación de las bio-especies de Pt mediante técnicas electroforéticas en gel. En la actualidad estas metodologías aún se están desarrollando, tal y como se ha detallado en el Capítulo III. Los avances realizados en este campo, han puesto de manifiesto la necesidad de preconcentrar las muestras específicamente en las bio-especies de Pt. En una muestra biológica compleja, por ejemplo el citosol de un órgano de rata tratada con cisplatino, las bio-especies de Pt son minoritarias en comparación con el resto de biomoléculas

presentes en la muestra. La limitación de carga que presenta la electroforesis en gel, hace que estas muestras deban estar enriquecidas en las especies platinadas para poder localizarlas en el gel mediante detección por ICP-MS tras digestión del gel o directamente por LA-ICP-MS¹⁷³. Además, esta preconcentración se hace necesaria para poder aprovechar el carácter micropreparativo de esta técnica y poder así realizar posteriores identificaciones de las bio-especies con Pt separadas, mediante la extracción de las mismas, su digestión enzimática y su análisis por técnicas estructurales de masas.

Una de las maneras de enriquecer la muestra en determinadas bio-especies platinadas es la aplicación previa de la metodología cromatográfica bidimensional desarrollada (Trabajo 2). Así, ambas metodologías quedan relacionadas y sirven de complemento una a la otra para alcanzar el objetivo final de la separación e identificación de las especies de interés.

D.2. Aportaciones fundamentales a la comprensión de los mecanismos de actuación de los fármacos antitumorales de Pt

D.2.1. Contenidos de Pt en tejidos y fracciones celulares de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

Comparación de la acumulación y distribución de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en tejidos y fracciones celulares de ratas

El análisis del contenido total de Pt en las muestras objeto de estudio, ha sido el paso necesario previo a los análisis de especiación de Pt. Excepto en la sangre, se ha cuantificado el Pt en el resto de las muestras reales utilizadas. La razón de esta excepción es la gran cantidad de trabajos existentes en la bibliografía que dejan bien definida la cantidad y forma en la que el Pt puede encontrarse en la sangre a diferentes tiempos post-administración^{53,58,60} e incluso en las distintas fracciones sanguíneas⁴⁷.

La cuantificación del Pt en los órganos de ratas tratadas con cisplatino, oxaliplatino y carboplatino (Trabajo 1), ha arrojado interesantes conclusiones que ponen de manifiesto, por ejemplo, la dudosa relación entre cantidad acumulada en el tejido y toxicidad. Los órganos analizados se han elegido en función de la toxicidad inducida por el cisplatino en ellos, como es el caso del riñón y el oído. Además, se han analizado el cerebro y el hígado por ser órganos que pudieran tener comportamientos similares a oído y riñón, respectivamente, y por ser órganos muy irrigados de notable importancia en el organismo. En los Trabajos 1 y 2 se cuantifica por primera vez el Pt presente en muestras de oído tras la exposición *in vivo* a fármacos antitumorales de Pt.

Los tratamientos empleados han sido elegidos para poner de manifiesto diferencias entre las acumulaciones de los distintos fármacos (Trabajo 1, Experimento 1). Las cantidades de cada fármaco inyectadas a las ratas de experimentación han sido representativas de las dosis habituales en humanos, con el fin de conocer los efectos producidos por los fármacos en sus condiciones usuales de aplicación, suponiendo para hombre y rata metabolismos análogos. Para poder mostrar resultados comparables entre fármacos, se han expresado los contenidos totales de Pt como concentración de Pt en tejido seco en función de la cantidad de Pt administrada ((mg Pt / Kg tejido seco) / mg Pt ad.)).

Las concentraciones relativas mostradas en el Trabajo 1 permiten observar que el riñón presenta la mayor concentración de Pt para cualquiera de los fármacos administrados (Trabajo 1, Figura 1), y que el oxaliplatino es el fármaco con mayor poder de acumulación en todos los órganos estudiados. La acumulación de carboplatino es la más pequeña en todos casos y coincide con los datos que presentan a este fármaco como muy fácilmente eliminable por su baja reactividad con las biomoléculas del organismo.

El hecho de que el oxaliplatino se acumule en mayor medida que los otros dos fármacos ensayados y que no tenga efectos nefrotóxicos u ototóxicos, hace cuestionar la idea preconcebida por muchos autores de que la toxicidad es directamente proporcional a la cantidad de fármaco acumulada. Por otra parte, muestras de oído interno más refinadas, conducen a resultados contrarios, es decir, el fármaco más ototóxico (cisplatino) es el que presenta una acumulación relativa mayor (Trabajo 2, Tabla 2). Por ello, la determinación de las especies concretas que causan los efectos tóxicos, sean mayoritarias o no, centra el interés de las líneas de investigación destinadas al estudio de la toxicidad de los fármacos antitumorales de Pt.

También es importante conocer la distribución del Pt en las fracciones celulares de cada tejido y para cada fármaco, con el fin de identificar la fracción que más fármaco acoge, y por tanto, la que puede ser de un mayor interés para desarrollar los estudios de especiación. Haciendo uso, en primer lugar de ultracentrifugación, y después de ultrafiltración, se han obtenido distintas fracciones celulares en las cuales se ha determinado el contenido de Pt por ICP-MS. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas en la distribución de los fármacos entre las distintas fracciones celulares de cada tejido, una razón más para abordar la especiación de estas muestras y así localizar el elemento diferenciador que hace que algunos fármacos sean tóxicos para un determinado tejido. De las fracciones obtenidas por ultracentrifugación, la citosólica es la que presenta un mayor contenido de Pt en el hígado y en el riñón (Trabajo 1, Tabla 1), y por tanto, se perfila como una de las más interesantes para su estudio.

La distribución del Pt cuantificado en la fracción citosólica se ha estudiado mediante ultrafiltración (Trabajo 1, Figura 2). Cabe destacar que en oído y riñón, el mayor porcentaje de Pt acumulado se encuentra en las biomoléculas de peso inferior a 50 KDa. Precisamente en este rango de masas se encuentran biomoléculas de notable interés como el GSH¹³⁶ o las MTs¹³⁷.

Acumulación y eliminación del cisplatino en tejidos de ratas sometidas a tratamientos monodosis

Los estudios llevados a cabo sobre una población homogénea de ratas Wistar y en condiciones de administración controladas, muestran un máximo de acumulación del cisplatino entorno a la primera semana tras el tratamiento, para todos los órganos (Trabajo 1, Figura 3). La velocidad de eliminación del fármaco también es similar para todos los órganos. De esta manera, se observa una primera etapa de eliminación rápida entre los 7 y los 30 días posteriores a la administración, y una segunda etapa mucho más lenta que se monitorizó hasta 90 días después del tratamiento.

El estudio de la relación entre los procesos de acumulación/eliminación y la ototoxicidad (Trabajo 5), muestran que, a pesar de haberse eliminado más del 75% del fármaco al cabo de 90 días, no existe una recuperación de los niveles auditivos de las ratas sometidas a tratamientos monodosis con cisplatino. Por lo tanto, no se puede establecer una correlación entre la acumulación del fármaco y la pérdida de audición. De este modo, cobran fuerza las hipótesis que hablan de daños iniciales irreversibles en el oído, y se vuelven a apreciar evidencias de la escasa relación entre acumulación y toxicidad.

Esta cinética bifásica de eliminación del fármaco ya fue postulada por otros autores²⁰⁸, y sugiere la intervención de la membrana celular en estos procesos. Existen evidencias de que la membrana celular puede estar involucrada tanto en la toma¹¹², como en la eliminación del fármaco de la célula. Concretamente, en esta memoria se presenta una prueba más de que existe una regulación celular de la toma de cisplatino. En el Trabajo 7 se puede observar el distinto grado de platinación del ADN en función de la presencia o ausencia de inhibidores de las proteínas quinasas ERKs. Este efecto no podría tener lugar si el único mecanismo de entrada del fármaco en la célula fuera la difusión pasiva.

Acumulación y eliminación del cisplatino en tejidos de ratas sometidas a tratamientos multidosis

El análisis del contenido de Pt en los órganos de ratas sometidas a tratamientos con dosis múltiples (Trabajo 1, Tabla 2), muestra cómo tras la administración de la primera dosis, la acumulación relativa del fármaco disminuye apreciablemente y se mantiene constante hasta el quinto ciclo, donde aumenta considerablemente, recuperando los niveles de acumulación del primer ciclo. El mencionado descenso de la acumulación relativa entre el primer y segundo ciclo, puede corresponder a la entrada en funcionamiento de ciertos mecanismos de eliminación que mantienen los niveles de Pt controlados. Sin embargo, esta situación se altera para todos los órganos en el quinto ciclo, haciendo pensar en el colapso del mecanismo de detoxificación. El Trabajo 6 muestra de nuevo que la pérdida de audición a lo largo de los ciclos de administración del cisplatino no se correlaciona con la acumulación de Pt en el oído.

La comparación del cisplatino acumulado después del tratamiento monodosis y tras el primer ciclo de la terapia multidosis, muestra que la acumulación derivada del segundo de los tratamientos es alrededor de un 27% inferior para todos los órganos estudiados, a pesar de que la dosis administrada es un 50% menor. De esta manera, se pone de manifiesto de nuevo, la posible existencia de mecanismos de detoxificación celular, los cuales parecen activarse en mayor medida frente a mayores dosis de fármaco.

D.2.2. Fortaleza de la interacción fármaco:biomolécula

La robustez del enlace fármaco:biomolécula debe ser tomada en consideración a la hora de preparar la muestra o diseñar estrategias de análisis. Los experimentos llevados a cabo con el fin de evaluar esta característica, mostraron la alta estabilidad de la interacción entre el fármaco y las biomoléculas presentes en muestras de diferente naturaleza, manteniéndose inalterada al emplear condiciones desnaturalizantes (Trabajo 1), e incluso al someterla a digestiones tríplicas (Trabajo 4). Esta contribución es especialmente interesante ya que apenas existen datos en la bibliografía sobre las

características de los enlaces que se establecen entre el fármaco y las distintas biomoléculas.

D.2.3. Interacción fármaco:biomolécula en tejidos de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

En el Trabajo 2 se aplica la metodología desarrollada para la separación bidimensional por cromatografía de líquidos. Junto con el Trabajo 1 y 3, son los primeros estudios científicos publicados que abordan la separación de las especies platinadas formadas en órganos sometidos a experimentos *in vivo* con fármacos antitumorales de Pt.

La comparación de los perfiles SEC-ICP-MS (monitorizando el ^{195}Pt) de los citosoles de riñón y oído interno de ratas tratadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, permiten visualizar grandes analogías y leves diferencias entre los distintos fármacos, y constatan la necesidad de una segunda dimensión que resuelva mejor las bio-especies con Pt. Según el límite de exclusión de la columna empleada (Superdex 75 10/300 GL), no existen apenas bio-especies con Pt por encima de 100 KDa. También es importante resaltar que no se detecta fármaco libre en ninguno de los citosoles analizados. Entre órganos se aprecian diferencias significativas, si bien en todos los casos hay un agrupamiento de las especies platinadas entorno a dos grupos de pesos moleculares, aproximadamente a 12-20 KDa y a 25-65 KDa, respectivamente (Trabajo 2, Figura 1 y 2).

Una de las ventajas de la detección mediante ICP-MS, es la posibilidad de monitorizar simultáneamente distintos isótopos. Comparando los perfiles cromatográficos de ^{195}Pt , ^{66}Zn y ^{111}Cd , para citosoles blancos, citosoles procedentes de experimentos *in vivo* con cisplatino y un patrón de MT (Trabajo 2, Figura 3), se ha podido postular la posible unión del fármaco a la MT del riñón, acompañado del desplazamiento del Zn unido a la proteína. Este desplazamiento también fue observado y descrito en el Trabajo 3 (Figura 6b). Además, el perfil de Zn del oído interno parece indicar la presencia de MT (Trabajo 2, Figura 3), pero en este caso no se observa el solapamiento de este pico cromatográfico con señal de Pt, por lo que, o no se produce la unión o tiene lugar en proporciones muy pequeñas.

La aplicación de una segunda dimensión de intercambio aniónico (columna Mono-Q H/R 5/5), con una preconcentración previa de las fracciones SEC mediante focalización, permitió la resolución de bio-especies de Pt presentes en citosoles de oído (Trabajo 2, Figura 4 y 5) y riñón de rata que coelúan en la primera dimensión. Aunque estos cromatogramas parecen resolver de manera adecuada las especies con Pt, tras el perfil de Pt existen multitud de biomoléculas mayoritarias que coeluyen y que en el paso final de identificación de la especie platinada aportarían una gran complejidad a la determinación. Por ello, se precisa de nuevas dimensiones de separación para llevar a cabo un correcto aislamiento de los aductos fármaco:biomolécula.

D.2.4. Derivados reactivos del cisplatino en distintos medios fisiológicos

El cisplatino ha sido objeto de los estudios de especiación más exhaustivos por ser éste el fármaco que presenta toxicidades más importantes a la vez que mayores efectos antitumorales. Sin embargo, muchos autores estudian la interacción del cisplatino con biomoléculas presentes en el organismo prescindiendo del estudio de la forma química del fármaco^{85,130,138}. Los resultados extraídos de ensayos donde este factor no está controlado, pueden conducir a conclusiones erróneas, ya que las distintas formas químicas del fármaco presentan diferente reactividad frente a la misma biomolécula.

Los estudios realizados con proteínas del plasma sanguíneo (Trabajo 4) han sido llevados a cabo incubando el cisplatino con las proteínas en un medio muy salino de 0,9% de NaCl y pH 7,4 para simular las condiciones fisiológicas. Bajo estas condiciones el cisplatino evoluciona muy lentamente a sus productos de hidrólisis y en su mayoría la forma original del fármaco ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) es la que se une a las proteínas estudiadas.

Otro caso muy distinto es el supuesto del Trabajo 3, donde se estudia la interacción del cisplatino con biomoléculas citosólicas. El cisplatino en su forma intacta, al entrar en contacto con el medio citoplasmático comienza a evolucionar dado el menor contenido salino de éste (Figura 14). Por ello, en este estudio se prepararon incubaciones en un medio con una concentración de NaCl de 4,62 mM^{136,137}, y se procedió a la identificación de las especies derivadas de la evolución del cisplatino.

La evolución del cisplatino a sus productos de hidrólisis en medio citosólico, se estudió mediante SEC-ICP-MS con una columna Thermo-Hypersil BioBasic SEC-60 de

bajo rango de pesos moleculares (0,1 – 6 KDa). La identificación de los distintos derivados se llevó a cabo mediante ESI-LIT a través de los datos de las masas y de los perfiles isotópicos.

Hasta tres especies derivadas del cisplatino se observan cuando se deja evolucionar el fármaco en las condiciones fisiológicas del citosol (Trabajo 3, Figura 1). La especie mayoritaria en las primeras horas de la incubación se identificó como el fármaco intacto (C-1) (Trabajo 3, Figura 2). En la misma figura se identifican las otras dos especies que van apareciendo según transcurre la incubación. La primera de ellas se identifica según su espectro de masas, como el monoacuo derivado del cisplatino (C-2), lo cual coincide con otros autores que presentan esta especie como la primera que se forma en la hidrólisis del fármaco³⁵. Según los datos bibliográficos³⁷, la especie más retenida y la que aparece a un tiempo de incubación más largo cabe esperar que sea el diacuo complejo o una forma oligomérica del tipo $[\{Pt(NH_3)_2(\mu-OH)\}_n]^{n+}$. A partir de los espectros de masas se postuló una especie que no era ninguna de las dos esperadas, sino un dímero compuesto por una molécula de fármaco intacto y un monoacuo complejo (C-3). Este compuesto C-3 se denominó cisplatino envejecido.

Para comprobar la ausencia del diacuo complejo, se sintetizó e identificó por ESI-LIT, confirmando la ausencia de esa especie en los espectros de las incubaciones de cisplatino en medio citosólico. Ninguna de las especies platinadas detectadas presentó perfil isotópico modificado con Pt y sin cloruros (Trabajo 3, Figura 3).

D.2.5. Interacción del cisplatino con las biomoléculas citosólicas GSH y MT

Caracterización cromatográfica

Una de las biomoléculas de mayor interés en relación con los fármacos antitumorales de Pt, es el GSH. Este tripéptido ha sido relacionado con procesos de detoxificación y además la presencia en su estructura de un grupo sulfidrilo, hace de esta biomolécula un potencial ligando de los complejos de Pt^{22,134}. Incubando el cisplatino con el GSH en las concentraciones y proporciones esperadas en el citosol celular (1:500), y bajo las ya mencionadas condiciones fisiológicas, se aprecian diversos aductos fármaco:GSH (Trabajo 3, Figura 4) que evolucionan con el tiempo. Una de ellas sólo se

forma a largos tiempos de incubación, sugiriendo que esta especie se forma por reacción del GSH con el derivado envejecido del cisplatino (C-3). Por el contrario, la otra especie aparece a bajos tiempos de incubación y crece a lo largo del proceso hasta que comienza a disminuir a tiempos largos, por lo que puede formarse a partir del fármaco original o del monoacuo derivado. La incubación del GSH con cisplatino envejecido artificialmente en el laboratorio (derivado C-3) corrobora los argumentos planteados. Por último, cabe destacar que aún haciendo incubaciones con grandes excesos de GSH y durante largos tiempos, parte del fármaco queda libre en alguna de sus formas. Este hecho manifiesta la limitada reactividad del GSH con el fármaco.

Otra importante biomolécula del citosol celular, es la MT. Esta proteína, como ya se ha descrito, es capaz de coordinar metales desplazando otros previamente coordinados, para detoxificar el medio de posibles contaminantes metálicos¹²⁸. Los ensayos realizados se han llevado a cabo con un patrón de MT de hígado de conejo con un contenido en Zn de 0.8% y en Cd de 6%. Las incubaciones a lo largo del tiempo en medio citosólico, y las separaciones con la misma columna BioBasic SEC-60, han demostrado que al cabo de sólo 4 h de incubación, la mayoría del fármaco se ha incorporado a la MT (Trabajo 3, Figura 6a), por lo que se deduce que no es el derivado envejecido del cisplatino (C-3) el que interacciona con la proteína. De hecho, incubaciones de la MT con cisplatino envejecido obtenido en el laboratorio no conducen a la formación de ningún aducto fármaco:MT. La detección multi-elemental mediante ICP-MS permite confirmar que el pico cromatográfico asignado al aducto cisplatino:MT corresponde a dicha especie por la coincidencia en ese pico de los perfiles de Pt, Cd y Zn. Además, permite observar cómo a medida que transcurre el tiempo de incubación y el fármaco se incorpora a la MT, el perfil cromatográfico del Zn va disminuyendo en intensidad (Trabajo 3, figura 6b). En el caso del Cd no se observó desplazamiento alguno para las proporciones de incubadas. Estas observaciones apoyan las posiciones mantenidas por ciertos autores que también han observado desplazamiento del Zn¹³⁰, sin embargo no coincide con otros que postularon el desplazamiento simultáneo de Zn y Cd¹¹⁷. Incubando simultáneamente el cisplatino con GSH y MT, predomina el aducto fármaco:MT, aún en presencia de un gran exceso de GSH (Trabajo 3, Figura 9d).

Finalmente, se han realizado incubaciones análogas sobre citosoles de diferentes órganos de rata para constatar la formación de las especies descritas y para comprobar la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas a muestras reales. En primer término,

se han incubado citosoles de riñón de rata blanco con cisplatino o con una mezcla de fármaco y GSH, en condiciones análogas a las incubaciones anteriores. El resultado de este ensayo confirma la formación de especies platinadas que eluyen al mismo tiempo de retención que las especies caracterizadas anteriormente en las incubaciones de cisplatino con patrones de GSH y MT (Trabajo 3, Figura 8).

Con el objetivo de detectar las mismas especies caracterizadas *in vitro*, en muestras citosólicas de riñón, hígado y oído interno de ratas tratadas con cisplatino, se procedió a la separación cromatográfica de estas muestras. Estos experimentos *in vivo* muestran especies platinadas coeluyentes con los aductos fármaco:biomolécula detectados en los ensayos *in vitro*. A pesar de ello, se hace necesaria la aplicación de otras metodologías analíticas de separación e identificación para confirmar esta concordancia.

Caracterización estructural

La caracterización estructural de los aductos cisplatino:GSH y cisplatino:MT, se llevó a cabo mediante el empleo de ESI-LIT y ESI-FT-ICR. De todas las bio-especies cisplatino:GSH monitorizadas mediante SEC-ICP-MS (Trabajo 3, Figura 4), únicamente se ha podido detectar y postular la estructura de una de ellas. La especie identificada ya fue descrita por Miao *et al.*¹³⁸ en incubaciones llevadas a cabo en condiciones no fisiológicas. Los resultados mostrados en el Trabajo 3 (Figura 5), confirman la formación de este mismo aducto (estequiometría 2:1 fármaco:biomolécula) en condiciones y proporciones fisiológicas. El único aducto identificado se detectó en incubaciones a 48 h donde la especie mayoritaria es la denominada como G-2. La existencia de otra especie mayoritaria (G-1), presumiblemente de mayor tamaño por eluir a menor tiempo de retención en la separación SEC, podría corresponder con otra estructura de mayor peso molecular postulada en el mismo trabajo de Miao *et al.*¹³⁸, consistente en dos moléculas de GSH ligadas por dos moléculas de cisplatino (estequiometría 1:1). Todos estos puntos por aclarar deberán ser objeto de estudio en futuras investigaciones. Aún así, las claves para razonar la dificultad para detectar por espectrometría de masas los aductos presentados en esta memoria, están íntimamente relacionadas con las bajas

concentraciones empleadas y los medios salinos de incubación, ambos, requisitos para el desarrollo de metodologías analíticas aplicables a muestras reales.

El aducto cisplatino:MT (Trabajo 3), intentó ser caracterizado por MALDI-TOF, ESI-LIT y FT-ICR-MS. Ninguna de las tres técnicas arrojó resultados concluyentes, aunque sin duda los mejores datos se obtuvieron mediante FT-ICR-MS. Las masas de las distintas isoformas de la MT empleada en el estudio, fueron detectadas sin dificultad empleando una preparación de muestra consistente en el desalado de la misma a través de cartuchos de fase inversa (C₁₈) y la puesta en disolución de la proteína en presencia de acetonitrilo (30-70%) y 0,1% de ácido fórmico (Trabajo 3, figura 7). El pH ácido cercano a 2, alcanzado gracias al ácido fórmico, hizo que las masas detectadas fueran las de la MT libre de Zn y de Cd¹³¹. La misma preparación de muestra con el aducto cisplatino:MT aislado, condujo a la ausencia de señal en las masas correspondientes a la MT nativa, lo que probablemente indique que la proteína se ha unido al fármaco. Sin embargo, en este caso tampoco aparecieron nuevas masas correspondientes al aducto formado. De estos resultados se concluye que la presencia del fármaco en la muestra dificulta sustancialmente la ionización de la muestra y que el pH ácido de la muestra analizada por FT-ICR-MS no rompe la interacción del fármaco con la MT, al contrario que en el caso del Zn y el Cd. Por lo tanto, el tipo y los sitios de unión del fármaco a la proteína podrían ser distintos que los descritos para Zn y Cd.

D.2.6. Interacción del cisplatino con las proteínas del suero sanguíneo HSA y Tf

Caracterización cromatográfica

Las proteínas más importantes del suero sanguíneo humano han sido incubadas con cisplatino en condiciones fisiológicas para evaluar la formación de aductos fármaco:proteína (Trabajo 4). Las proteínas HSA, apo-Tf e IgG, han sido incubadas con cisplatino a distintos tiempos, y en concentraciones y proporciones cercanas a las fisiológicas. Las separaciones mediante AE-FPLC-ICP-MS han revelado la formación mayoritaria del aducto cisplatino:HSA a cortos tiempos de incubación. Mucho menos intensa y más lenta ha sido la formación de los aductos cisplatino:apo-Tf, mientras que

igualmente minoritaria ha sido la formación del aducto cisplatino:IgG. En este último caso, su coelución con el fármaco libre, impidió su caracterización cromatográfica.

La evolución del cisplatino a sus acuosos complejos es muy lenta en un medio tan salino como el empleado en estas incubaciones (0,9% de NaCl). Por ello, y dado que ya a las 24 h más del 90% del fármaco se ha unido a la HSA, parece ser el fármaco intacto el que se une a esta proteína (Trabajo 4, datos no mostrados). Por otro lado, la apo-Tf empieza a interactuar de manera significativa con el fármaco a partir de las 48 h (Trabajo 4, datos no mostrados), pudiendo significar este hecho que la forma química del cisplatino que interactúa con la proteína no es el fármaco original, sino algún derivado hidrolizado.

La incubación de un suero sanguíneo humano de voluntarios sanos corrobora que la especie platinada mayoritaria es el aducto cisplatino:HSA, y que apenas existe interacción entre el fármaco y la Tf de la sangre (Trabajo 4, datos no mostrados). El resto del fármaco, bien queda libre o bien se une a proteínas minoritarias que coeluyen con él en la separación cromatográfica empleada.

Caracterización estructural de los aductos intactos

Son muchos los autores que han descrito el efecto que tiene la interacción del cisplatino sobre los puentes disulfuro de la HSA. La ruptura de estos puentes desnaturaliza la proteína, alterando su estructura y funcionalidad de manera notable⁷⁹. Los análisis mediante ESI-Q-TOF (Trabajo 4, Figura 4), muestran una diferencia de masa entre la isoforma predominante de la proteína intacta (66565 Da) y la masa del aducto cisplatino:HSA (67456 Da) de 891 ± 4 Da. Considerando que el resto de fármaco unido a la proteína pueda ser $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$, donde se han perdido ambos grupos salientes del cisplatino, hasta 4 moléculas de fármaco estarían interactuando con la HSA en las proporciones de incubación establecidas. Otros autores han demostrado estequiometrías fármaco:proteína de entre 3,5:1 hasta 10,2:1, empleando excesos de entre 20 y 60 veces de fármaco⁷². Sin embargo en los estudios presentados en esta memoria (Trabajo 4), se han empleado cantidades equimolares y medios similares a los fisiológicos, siendo éstas, unas condiciones más cercanas a las que se alcanzan en la sangre de pacientes tratados. La unión de varias moléculas del fármaco a la HSA y la existencia de un solo

grupo cisteína libre, hacen pensar en otros sitios de unión que pueden ser metioninas o histidinas, ambas con grupos de alta afinidad por el fármaco, o provenir de la ya mencionada ruptura de los puentes disulfuro, que deja libres potenciales ligandos.

Los datos obtenidos mediante ESI-Q-TOF para el aducto cisplatino:apo-Tf, ofrecen resultados más concluyentes, que, sin embargo, entran en confrontación con otros estudios realizados con anterioridad. Los espectros de masas (Trabajo 4, Figura 3), muestran claramente la unión de una, e incluso de dos moléculas de fármaco en su forma $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ a la isoforma mayoritaria de la apo-Tf (79560 Da). De la misma manera, aunque esta vez sobre la pentasialo-Tf (79979 Da), se observa la aparición de una masa desplazada + 227 Da cuando se incubaba la proteína con cisplatino, lo que coincide con la unión, nuevamente, del mismo resto $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Sobre experimentos similares, Khalaila *et al.*⁸⁵ observaron la unión de hasta 4 moléculas de cisplatino intacto tras 20 min de incubación. Sin embargo, a las 3 h, las formas químicas del fármaco unido a la proteína parecen cambiar para perder un cloruro y ser la forma $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^+$ la que quede unida a la Tf. Estas discrepancias pueden deberse a las condiciones experimentales poco reales empleadas por Khalaila *et al.*, como fueron, medios de incubación no salinos, excesos de fármaco y tiempos de incubación muy cortos.

Caracterización estructural de los aductos a través de sus digeridos trópticos

Abordando el problema desde otro punto de vista, se llevaron a cabo digestiones trópticas de los aductos fármaco:biomolécula formados. Para comprobar la resistencia del enlace, se realizó una cromatografía capilar en fase inversa de los digeridos de los aductos y se monitorizó el ^{195}Pt selectivamente con un ICP-MS (Trabajo 4, Figura 5). Mediante estos análisis se comprobó la resistencia del enlace del aducto, observándose múltiples zonas con picos cromatográficos que contenían Pt, previsiblemente péptidos con el fármaco aún ligado. Este hecho confirma que al menos en el caso de la apo-Tf y la HSA, la interacción del cisplatino es robusta y su fuerza pudiera corresponderse con la de un enlace covalente.

El desarrollo de experimentos paralelos empleando RP-capLC-ESI-Q-TOF, permitió localizar al menos 20 péptidos con perfil isotópico modificado por el Pt en cada uno de los digeridos de los aductos cisplatino:apo-Tf y cisplatino:HSA (Trabajo 4, Figura

6). Resultados similares se obtuvieron con los digeridos de los aductos aislados de las muestras reales de suero sanguíneo que fueron sometidas a experimentos *in vitro* con cisplatino, siendo este un ejemplo más de la aplicabilidad a muestras reales de las metodologías analíticas desarrolladas.

D.3. Propuestas para futuras investigaciones

El trabajo realizado a lo largo de los últimos cuatro años, ha permitido desarrollar nuevas herramientas analíticas con las que profundizar en el estudio de los fármacos antitumorales de Pt. A pesar de haberse cumplido de manera satisfactoria los objetivos propuestos al comienzo de este trabajo, nuevas líneas de investigación han surgido fruto del avance metodológico alcanzado y de los conocimientos adquiridos en el tema. Por ello, en este último apartado se citan aquellos trabajos pendientes que suponen nuevos objetivos para el futuro inmediato de esta línea de investigación.

D.3.1. Metodologías para la separación y purificación de bio-especies con Pt

Tercera dimensión cromatográfica

El desarrollo de una tercera dimensión que complemente las separaciones cromatográficas puestas a punto en el Trabajo 2, es de extraordinario interés para la purificación de bio-especies de Pt en muestras biológicas o clínicas de alta complejidad. La ya mencionada electroforesis en gel es una alternativa, pero sin duda, una tercera dimensión cromatográfica basada en un mecanismo de separación ortogonal a los ya empleados, como intercambio catiónico o fase inversa, es una interesante opción. Además, este último tipo de cromatografía es compatible con las técnicas de masas más habituales para la elucidación estructural en metalómica.

La metodología necesaria para preconcentrar y desalar proteínas de bajo peso molecular en un cartucho de fase estacionaria C₁₈ de poro ancho, ya se ha ensayado con éxito en una muestra de MT y de aducto cisplatino:MT (Trabajo 3). Por lo tanto, el primer paso para poner a punto una tercera dimensión cromatográfica basada en fase inversa ya se ha abordado. El trabajo a desarrollar a partir de ahora implicaría:

- El empleo de una columna analítica estándar de fase inversa.
- El estudio de las condiciones de elución para conseguir una separación adecuada de las bio-especies de Pt presentes en muestras reales.
- Y por último, el acoplamiento a técnicas estructurales de masas.

Aplicación de técnicas electroforéticas en gel a la separación de bio-especies con Pt

Las alternativas a la purificación de las bio-especies con Pt en muestras biológicas mediante técnicas cromatográficas pasan por el empleo de técnicas electroforéticas bidimensionales. La 2D-SDS-PAGE es una técnica de separación de elevada potencialidad por su capacidad resolutive y sus propiedades micropreparativas. En este sentido, ya se han realizado algunos experimentos con el fin de evaluar la posibilidad de separar las bio-especies de Pt en geles electroforéticos. Aunque son muchas las dificultades que se han presentado, se ha estimado que esta línea de investigación merece ser explorada en mayor extensión por los importantes beneficios que puede ofrecer.

Los objetivos que se deberán abordar son:

- Puesta a punto de una preparación de muestra para la separación electroforética que preserve la integridad de las bio-especies de Pt y que garantice una concentración suficiente de las mismas para posteriores determinaciones elementales y estructurales.
- Estudio de las condiciones experimentales y tipo de geles electroforéticos que permitan la separación de las especies platinadas de interés sin alterar la interacción fármaco:biomolécula.
- Desarrollo de una metodología basada en LA-ICP-MS que permita hacer un seguimiento de las especies con Pt en los geles.
- Estudio de procedimientos de extracción de las especies retenidas en los geles, evitando de nuevo, modificar la naturaleza de las especies fármaco:biomolécula.

D.3.2. Metodologías para la caracterización estructural de bio-especies con Pt

Identificación estructural de los aductos intactos fármaco:biomolécula

La elucidación estructural de los aductos intactos fármaco:biomolécula, ha conducido a importantes conclusiones en los trabajos del Capítulo II, pero también ha dejado pendiente la detección de especies como el aducto cisplatino:MT (Trabajo 3) o la mejor resolución del espectro cisplatino:HSA (Trabajo 4). La compleja ionización de estas especies de elevado peso molecular es un problema que parece potenciarse con la presencia de Pt en la estructura de la biomolécula. Sin embargo, este tipo de análisis sigue siendo tremendamente atractivo, ya que se trabaja con la especie original. Por tanto, la especie analizada mantiene intacta toda su información y no ha sufrido procesos que hayan podido transformar la forma química del fármaco ni el sitio de unión de éste a la biomolécula. Otras ventajas adicionales son, la considerable simplificación metodológica y de tratamiento de datos, frente a las estrategias de digestión que implican una mayor manipulación de muestra y el manejo de complejos datos espectrales.

Por estas razones, se ha considerado de interés el estudio de los factores que dificultan la ionización de las citadas especies, siendo un posible objetivo futuro la puesta a punto de las condiciones experimentales que permitan la determinación estructural de estos aductos mediante técnicas estructurales de masas.

Secuenciación de péptidos con Pt

También se propone para trabajos futuros, el estudio detallado de los péptidos con perfil isotópico modificado por Pt (Trabajo 4). La secuenciación de estos péptidos minoritarios, permitirá estudiar el sitio y el tipo de unión del fármaco a la proteína. En este sentido ya se han realizado algunas pruebas (Capítulo IV), pero han resultado fallidas debido a la dificultad para fragmentar el péptido mediante CID. Es posible que la presencia de Pt en el péptido no sólo penalice su ionización, sino que también sea responsable de la mala fragmentación obtenida con los métodos usuales empleados en proteómica.

En los futuros estudios dirigidos a la secuenciación de péptidos con Pt, se plantearían los siguientes objetivos:

- Empleo de nuevas metodologías para la fragmentación y secuenciación peptídica. Estudio de las nuevas fuentes de fragmentación basadas en la tecnología ETD.
- Estudio de los patrones de fragmentación de péptidos con Pt a través de muestras de péptidos incubadas con fármacos de Pt.
- Aplicación específica a la identificación de péptidos modificados con Pt, de herramientas informáticas de tratamiento de datos adoptadas de la proteómica para la localización de modificaciones post-traduccionales.

E. Conclusiones



Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en esta memoria se resumen a continuación:

- Se ha desarrollado un método para la cuantificación de Pt total en muestras biológicas sometidas a tratamientos *in vivo* e *in vitro* con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. El empleo de mineralizaciones ácidas en horno microondas en combinación con la medida mediante ICP-MS, permite obtener datos reproducibles y asegura recuperaciones cuantitativas del metal.
- Los métodos basados en ultracentrifugación y ultrafiltración para el fraccionamiento celular de tejidos tratados *in vivo* con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, permite cuantificar el Pt total en cada fracción con excelentes recuperaciones. La distribución de los tres fármacos en cada una de las fracciones celulares y citosólicas de los tejidos estudiados, ofrece resultados muy similares y hace pensar en bio-especies minoritarias como responsables de las toxicidades de los fármacos.
- Los procedimientos de desnaturalización y digestión trípica de muestras procedentes de tratamientos *in vivo* e *in vitro* con cisplatino, han puesto de manifiesto la robustez de los enlaces fármaco:biomolécula.
- La puesta a punto de una metodología cromatográfica bidimensional basada en SEC y AE-FPLC acopladas a ICP-MS, ha posibilitado la resolución de las especies de Pt presentes en muestras biológicas de alta complejidad como son los citosoles de tejidos de ratas tratadas *in vivo* con fármacos antitumorales de Pt. La focalización de la muestra en la segunda dimensión cromatográfica ha resultado ser el procedimiento más adecuado para la preconcentración de la muestra, minimizando su manipulación y la probabilidad de biotransformaciones o degradaciones de las especies platinadas de interés.
- El empleo de técnicas de espectrometría de masas con fuente de ionización “blandas” tipo ESI, ha ofrecido los mejores resultados en el estudio de los aductos cisplatino:biomolécula y de sus digeridos trípicos, así como en la elucidación

estructural de las distintas formas químicas de evolución del cisplatino en medio citosólico.

- El empleo combinado de técnicas cromatográficas y técnicas de detección elementales y moleculares, como ICP-MS y ESI-MS, respectivamente, ha demostrado ser una herramienta analítica excepcional en el estudio de la interacción de los fármacos antitumorales de Pt con las biomoléculas del organismo.
- Una interesante alternativa metodológica para el estudio estructural de los aductos cisplatino:biomolécula, es la digestión tróptica de las bio-especies de interés y su análisis mediante ESI-LIT estudiando los perfiles isotópicos de los péptidos y fragmentos resultantes. La digestión tróptica de los aductos cisplatino:HSA y cisplatino:apo-Tf ha permitido monitorizar péptidos platinados mediante capHPLC-ICP-MS y capHPLC-ESI-Q-TOF.
- La acumulación del cisplatino en oído, cerebro, riñón e hígado de ratas tratadas con cisplatino, muestra un máximo de acumulación de Pt entorno a los 7 días después del tratamiento, y una rápida eliminación del mismo hasta el primer mes. En el caso del oído, este patrón de acumulación no se correlaciona con la pérdida de audición a lo largo del tiempo.
- La administración del cisplatino en ciclos, permite observar la activación de posibles mecanismos de detoxificación celular que mantienen controlada la acumulación del fármaco hasta el quinto ciclo.
- De los fármacos estudiados, el oxaliplatino es el que mayor acumulación relativa presenta en todos los órganos estudiados, seguido de cisplatino y carboplatino. El hecho de que no sea el fármaco más tóxico el que se acumula en mayor medida, hace que no se pueda establecer una relación directa entre acumulación y toxicidad.

- Los métodos analíticos desarrollados para la determinación estructural de los aductos intactos cisplatino:biomolécula mediante ESI-Q-TOF, ESI-LIT y ESI-FT-ICR, han permitido estudiar la interacción del cisplatino con la apo-Tf, así como postular las estructuras de diversos aductos cisplatino:GSH y derivados de la hidrólisis del cisplatino en medio citosólico. Además, con este tipo de estudios se ha demostrado la capacidad del cisplatino para desplazar el Zn de la MT en condiciones fisiológicas, y la estabilidad de los aductos cisplatino:MT en condiciones ácidas suficientemente fuertes como para romper la unión del Cd y el Zn a la MT.
- Mediante la medida por ICP-MS de la cantidad de Pt unido al ADN y Pt intracelular, se ha demostrado para la línea celular leucémica promonocítica humana U-937, la intervención de las proteínas quinasas ERKs en la modulación de la apoptosis celular inducida por el cisplatino a través de la regulación de la entrada del fármaco al interior celular, evidenciando mecanismos alternativos a la difusión pasiva del fármaco.

F. Anexo I



ANEXO I

Referencias bibliográficas más relevantes relacionadas con estudios de análisis bioinorgánico de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

Cita	Técnica empleada	Fármaco	Muestra	Objetivo del trabajo
31	HPLC-UV	Cisplatino	Plasma	Especies de evolución del fármaco
32	HPLC-UV	Cisplatino	Sangre, plasma y PUF	Especies de evolución del fármaco
33	HPLC-UV	Cisplatino	Sangre	Especies de evolución del fármaco
34	HPLC, GFAAS	Cisplatino	Plasma	Especies de evolución del fármaco
35	RP-HPLC-ICP-MS	Cisplatino	Solución acuosa de cisplatino	Interacción del cisplatino con fases móviles
36	RMN	Cisplatino	Solución acuosa de cisplatino y plasma ultrafiltrado	Especies de evolución del fármaco
37	RP-HPLC-ESI-MS	Cisplatino	Solución acuosa de cisplatino	Especies de evolución del fármaco
38	HPLC-ICP-MS	Cisplatino, Carboplatino, Oxaliplatino	Aguas residuales de hospitales	Separación de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y sus especies
39	ESI-FAIMS-IT-MS	Cisplatino	Solución acuosa de cisplatino	Especies de evolución del fármaco
40	RP-HPLC-UV, RMN	Cisplatino	Solución acuosa de cisplatino	Condiciones de análisis de cisplatino y sus especies
41	RP-HPLC-UV, ESI-MS	Carboplatino	Solución acuosa de carboplatino	Especies de evolución del fármaco
42	RP-HPLC-UV-ESI-MS	Carboplatino	Solución acuosa de carboplatino	Especies de evolución del fármaco
45	HPLC-ESI-MS	Oxaliplatino	Solución acuosa de oxaliplatino	Especies de evolución del fármaco
48	ICP-MS, ICP-AES	Cisplatino	Plasma	Cuantificación del fármaco libre

52	ICP-AES, ETAAS	Cisplatino y otros	PUF	Cuantificación fármaco unido a proteína
53	SEC-ICP-MS	Cisplatino	Suero	Separación fármaco libre y unido a proteína
54	HPLC-ICP-MS	Cisplatino	PUF, cultivo celular ultrafiltrado	Especies de evolución del cisplatino
57	Voltamperometría	Cisplatino	Suero, orina	Cuantificación del fármaco
58	RP-HPLC-ESI-MS	Carboplatino	PUF y tejido canceroso	Cuantificación del fármaco libre
59	SEC-ICP-MS	Carboplatino	Plasma	Interacción fármaco:proteína
60	RP-HPLC, FAAS,	Cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y otros	Sangre, células rojas, plasma y líneas celulares	Distribución y biotransformación del fármaco. Citotoxicidad
62	ICP-MS	Oxaliplatino	Sangre y PUF	Distribución del fármaco
65	SEC-ICP-MS, SEC-ESI-MS	Oxaliplatino	PUF, células rojas, orina	Biotransformación del fármaco
66	HPLC-ICP-MS	Oxaliplatino	PUF y patrones de GSH, Met y Cys	Interacción del fármaco con biomoléculas con S
68	ICP-MS	Oxaliplatino	Plasma y PUF	Cuantificación del fármaco
71	ICP-AES, SEC, CD	Cisplatino, transplatino	Incubaciones fármaco con HSA	Interacción fármaco:HSA
73	CE-ICP-MS	Cisplatino	Incubaciones fármaco con HSA	Interacción fármaco:HSA
76	FTIR, UV	Cisplatino	Incubaciones fármaco con HSA	Interacción fármaco:HSA
77	CE-UV	Cisplatino, oxaliplatino	Incubaciones fármaco con HSA y Tf	Interacción fármaco:proteínas suero sanguíneo
80	GFAAS, UV, CD, Fluorescencia	Transplatino	Incubaciones fármaco con HSA	Interacción fármaco:HSA
82	NMR	Cisplatino	Incubaciones fármaco con HSA	Sitios de unión del fármaco a HSA
85	ESI-Q-TOF, UV/Vis	Cisplatino	Incubaciones fármaco con Tf	Interacción fármaco-Tf

86	ESI-TOF-TOF	Cisplatino	Incubaciones fármaco con Tf	Interacción fármaco:Tf
88	HPLC(CE)-UV, NMR	Cisplatino	Incubaciones fármaco con Tf	Interacción fármaco:Tf
91	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Oxaliplatino	Incubaciones fármaco con holo-Tf	Interacción fármaco:holoTf
92	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino	Células rojas e incubaciones fármacos con Hb	Interacción fármaco:Hb
93	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatino	Incubaciones fármaco con Hb	Interacción fármaco:Hb
94	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatino	Incubaciones fármaco con Hb	Interacción fármaco:Hb
95	ESI-Q-TOF	Oxaliplatino	Células rojas e incubaciones fármaco con Hb	Interacción fármaco:Hb
83	SDS-PAGE	Cisplatino	Incubaciones fármaco con γ -globulina	Interacción fármaco- γ -globulina
96	DF-ICP-MS	-	Orina	Cuantificación niveles fisiológicos Pt en orina
98	RP-HPLC-ICP-MS, FAB-TQ, NMR	Cisplatino, carboplatino	Orina e incubaciones fármaco con creatinina, urea y ácido úrico	Biotransformación fármacos en orina
105	ICP-MS	Cisplatino, carboplatino	Sangre, células rojas, orina y tejidos	Cuantificación Pt en fluidos y tejidos a largo plazo
106	Fluorescencia rayos X	Cisplatino	Fluidos y tejidos	Cuantificación Pt en fluidos y tejidos
107	NAA	Cisplatino	Fluidos y tejidos	Cuantificación Pt en fluidos y tejidos
108	Espectroscopía gamma	Cisplatino	Imagen del cuerpo humano	Distribución Pt en tejidos
110	ICP-MS	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y otros	Cultivos celulares con fármacos	Entrada del fármaco en la célula

113	LA-ICP-MS, 1D-SDS-PAGE	Cisplatino	Incubaciones fármaco con células bacterianas	Identificación de dianas del fármaco en sistemas celulares completos
117	RP-HPLC-UV, AAS	Cisplatino	Incubaciones fármaco con MT	Cinética de reacción del fármaco con la MT
120	RP-HPLC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatino	Incubaciones fármaco con nucleótidos del ADN	Especiación de aductos del fármaco con nucleótidos del ADN
121	RP-HPLC-ICP-MS	Cisplatino	ADN de Drosophila Melanogaster tratadas con el fármaco	Especiación de aductos del fármaco con ADN
130	SEC-ICP-MS, ESI-Q-TOF	Cisplatino	Incubaciones fármaco con MT	Estudio del enlace simultáneo de Zn, Cd y Pt a la MT
136	RP-HPLC-UV, AAS	Cisplatino, carboplatino y oxaliplatino	Incubaciones fármaco con GSH	Cinética de reacción del fármaco con GSH
137	RP-HPLC-UV, AAS	Cisplatino	Incubaciones fármaco con GSH, mesna y WR-1065	Cinética de reacción del fármaco con tioles
138	ESI-IT	Complejos de Pt(II) derivados del cisplatino y del cis-Pt(etilendiamina)Cl ₂	Incubaciones de GSH, MAS, AcMAS y MRFA con los complejos de Pt(II)	Interacción de péptidos con S con complejos de Pt(II)

139	RP-HPLC-TQ, RP-HPLC-UV, AAS	Cisplatino	Incubaciones fármaco con GSH en medio acuoso, plasma humano y plasma de rata. Plasma y PUF humano y rata tratados	Caracterización de los aductos fármaco:GSH
141	Difracción de rayos X	Cisplatino	Incubaciones fármaco con superoxodismutasa procedente de beSOD	Estudio estructural de la interacción fármaco:proteína
142	ESI-IT	Carboplatino	Incubaciones fármaco con Citocromo-C	Interacción fármaco:Citocromo-C
149	2D-SDS-PAGE, MALDI-TOF	Cisplatino	Cócleas de ratas tratadas con fármaco	Proteómica de la cóclea tras administración del fármaco

G. Bibliografia



- ¹ M. Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal, en: *Introducción a la Química Bioinorgánica*, ed. Síntesis, Madrid, 2003.
- ² B. Rosenberg, L. Van Camp and T. Krigas. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205 (1965) 698-699.
- ³ B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko and V.H. Mansour. Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature*, 222 (1969) 385-386.
- ⁴ E. Cvitkovic. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. *Cancer Treat. Rev.*, 24 (1998) 265-281.
- ⁵ T. Yamamoto, S. Kakehata, T. Saito and H. Saito. Cisplatin block voltage-dependent calcium current in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Brain Res.*, 648 (1994) 296-298.
- ⁶ R. Ramírez-Camacho, J.R. García-Berrocal, J. Buján, A. Martín-Marero and A. Trinidad. Supporting cells as a target of cisplatin-induced ear damage: therapeutic implications. *Laryngoscope*, 114 (2004) 533-537.
- ⁷ S.Y. Song, K.K. Chary, D.J. Higby and E.S. Henderson. *Cis*-diamminedichloride platinum (II) in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Clin. Res.*, 25 (1977) 411.
- ⁸ R.F. Ozols, B.J. Corden, J. Jacob, M.N. Wesley, Y. Ostchega and R.c. Young. High-dose cisplatin hypertonic saline. *Ann. Intern. Med.*, 100 (1984) 19-24.
- ⁹ M. Al-Sarraf, W. Fletcher, N. Oishi, R. Pugh, J.S. Hewlett, L. Balducci, J. McCracken and F. Padilla. Cisplatin hydration with and without mannitol diuresis in refractory disseminated malignant melanoma: a southwest oncology group study. *Cancer Treat. Rep.*, 66 (1982) 31-35.
- ¹⁰ S. Ostrow, M.J. Egorin, D. Hahn, S. Markus, J. Aisner, P. Chang, A. LeRoy, N.R. Bachur and P.H. Wiernik. High-dose cisplatin therapy using mannitol versus furosemide diuresis: Comparative pharmacokinetics and toxicity. *Cancer Treat. Rep.*, 65 (1981) 73-78.

- ¹¹ L.M. Schuchter. Exploration of platinum-based dose-intensive chemotherapy strategies with amifostine (ethyol). *Eur. J. Cancer*, 32A (Suppl. 4) (1996) 40-42.
- ¹² W.J.F. Van der Vijgh and G.J. Peters. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (ethyol): Preclinical aspects. *Semin. Oncol.*, 21 (1994) 2-7.
- ¹³ L.M. Schuchter, M.L. Hensley, N.J. Meropol and E.P. Winer. 2002 update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.*, 20 (2002) 2895-2903.
- ¹⁴ Y. Tayem, T.R. Johnson, B.E. Mann, C.J. Green and R. Motterlini. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by a carbon monoxide-releasing molecule. *Am. J. Physiol.*, 290 (2006) 789-794.
- ¹⁵ H.D. Francescato, R.S. Costa, S.M. Rodrigues Camargo, M.A. Zanetti, M.A. Labrador and M.D. Bianchi. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.*, 43 (2001) 77-82.
- ¹⁶ L.M. Gregg, J.D. Darin and M.D. Bianchi. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose dependent-study. *Pharmacol. Res.*, 41 (2000) 405-411.
- ¹⁷ L.D. Mora, L.M. Antunes, H.D. Francescato and M.L. Bianchi. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res.*, 47 (2003) 517-522.
- ¹⁸ M.J. Cleare and J.D. Hoeschele, *Plat. Metal Rev.*, 17 (1973) 2.
- ¹⁹ J.S. Casas, V. Moreno, A. Sánchez, J.L. Sánchez, J. Sordo, en: *Química Bioinorgánica*, ed. Síntesis, Madrid, 2002.
- ²⁰ T.W. Hambley. The influence of structure activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coord. Chem. Rev.*, 166 (1997) 181-223.

-
- ²¹ G. Natile and M. Coluccia. Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy. *Coord. Chem. Rev.*, 216-217 (2001) 383-410.
- ²² K. Wang, J. Lu and R. Li. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coord. Chem. Rev.*, 151 (1996) 53-88.
- ²³ Chem Finder 1975-2006, palabras clave "análisis cisplatino", "análisis carboplatino" y "análisis oxaliplatino".
- ²⁴ R.R. Barefoot. Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. *J. Chromatogr. B.*, 751 (2001) 205-211.
- ²⁵ C.J. Boreham, J.A. Broomhead and D.P. Fairlie. A ¹⁹⁵Pt and ¹⁵N study of the anticancer drug, *cis*-diamminedichloroplatinum (II), and its hydrolysis and oligomerization products. *Aust. J. Chem.*, 34 (1981) 659-664.
- ²⁶ T.G. Appleton, R.D. Berry, C.A. Davis, J.R. Hall and H.A. Kimlin. Reactions of platinum(II) aqua complexes. 1. Multinuclear (¹⁹⁵Pt, ¹⁵N and ³¹P) NMR study of reactions between the *cis*-diamminediaquaplatinum(II) cation and the oxygen donor ligands hydroxide, perchlorate, nitrate, sulfate, phosphate and acetate. *Inorg. Chem.*, 23 (1984) 3514-3521.
- ²⁷ T.G. Appleton, J.R. Hall, S.F. Ralph and C.S.M. Thompson. NMR study of acid-base equilibria and other reactions of ammineplatinum complexes with aqua and hydroxo ligands. *Inorg. Chem.*, 28 (1989) 1989-1993.
- ²⁸ S.E. Miller and D.A. House. The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). 1. The kinetics of the formation and anation of the *cis*-diammine(aqua)chloroplatinum(II) cation in acidic aqueous solution. *Inorg. Chim. Acta*, 161 (1989) 131-137.
- ²⁹ S.E. Miller and D.A. House. The hydrolysis products of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). 2. The kinetics of the formation and anation of the *cis*-diamminedi(aqua)chloroplatinum(II) cation. *Inorg. Chim. Acta*, 166 (1989) 189-197.

-
- ³⁰ S.E. Miller and D.A. House. The hydrolysis products of *cis*-diaminedichloroplatinum(II). 3. Hydrolysis kinetics at physiological pH. *Inorg. Chim. Acta*, 173 (1990) 53-60.
- ³¹ A. Andersson and H. Ehrsson. Determination of cisplatin and *cis*-diammineaquachloroplatinum(II) ion by liquid chromatography using post-column derivatization with diethyldithiocarbamate. *J. Chromatogr. B.*, 652 (1994) 203-210.
- ³² A. Andersson and H. Ehrsson. Stability of cisplatin and its monohydrated complex in blood, plasma and ultrafiltrate; implications for quantitative analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 639-644.
- ³³ A. Andersson, J. Fagerberg, R. Lewensohn and H. Ehrsson. Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in humans. *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 824-827.
- ³⁴ M. Verschraagen, K van der Born, T.H. Ursula Zwiers and W.J.F. van der Vijgh. Simultaneous determination of intact cisplatin and its metabolite monohydrated cisplatin in human plasma. *J. Chromatogr. B.*, 772 (2002) 273-281.
- ³⁵ O.Heudi, A. Cailleux and P. Allain. Interactions between cisplatin derivatives and mobile phase during chromatographic separation. *Chromatographia*, 44 (1997) 19-24.
- ³⁶ K.H. Briere, R. Goel, F.H. Shirazi, D.J. Stewart and C.P. Smith. The integrity of cisplatin in aqueous and plasma ultrafiltrate media studied by ¹⁹⁵Pt and ¹⁵N nuclear magnetic resonance. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 37 (1996) 518-524.
- ³⁷ M. Cui and Z. Mester. Electrospray ionization mass spectrometry coupled to liquid chromatography for detection of cisplatin and its hydrated complexes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 1517-1527.
- ³⁸ S. Hann, Zs. Stefanka, K. Lenz and G. Stingeder. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 405-412.
- ³⁹ M. Cui, L. Ding and Z. Mester. Separation of cisplatin and its hydrolysis products using electrospray ionization high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry coupled with ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5847-5853.

- ⁴⁰ M. El-Khateeb, T.G. Appleton, B.G. Charles and L.R. Gahan. Development of HPLC conditions for valid determination of hydrolysis products of cisplatin. *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 319-326.
- ⁴¹ K. Vivekanandan, M.G. Swamy, S. Prasad, G.C. Maikap, R. Mukherjee and A.C. Burman. Identification of degradation products from aqueous carboplatin injection samples by electrospray mass spectrometry. *Int. J. Pharm.*, 313 (2006) 214-221.
- ⁴² R.B. Burns, R.W. Burton, S.P. Albon and L. Embree. Liquid chromatography-mass spectrometry for the detection of platinum antineoplastic complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 367-372.
- ⁴³ M.A. Graham, G.F. Lockwood, D. Greenslade, S. Brienza, M. Bayssas and E. Gamelin. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin. Cancer Res.*, 6 (2000) 1205-1218.
- ⁴⁴ J.T. Reardon, A. Vaisman, S.G. Chaney and A. Sancar. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin and *bis*-acetoammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.*, 59 (1999) 3968-3971.
- ⁴⁵ E. Jerremalm, M. Hedeland, I. Wallin, U. Bondesson and H. Ehrsson. Oxaliplatin degradation in the presence of chloride: identification and cytotoxicity of the monochloro monooxalato complex. *Pharm. Res.*, 21 (2004) 891-894.
- ⁴⁶ J.M. González de Buitrago, E. Arilla Ferreiro, M. Rodríguez-Segade y A. Sánchez Pozo, en: *Bioquímica Clínica*, ed. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 1998.
- ⁴⁷ A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko and B.K. Keppler. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem. Rev.*, 106 (2006) 2224-2248.
- ⁴⁸ F. Morazzoni, C. Canevali, I. Moschetti, R. Todeschini, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, G. Ravasi, A.V. Bedini, F. Milani, M. Palazzi, S. Villa and G. Giudice. Determination of platinum in plasma of patients affected by inoperable lung carcinoma

treated with radiotherapy and concurrent low-dose continuous infusion of cis-dichlorodiammine platinum(II). *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, 35 (1995) 529-532.

⁴⁹ E.E. Cohen, M.W. Lingen and E.E. Vokes. The expanding role of systematic therapy in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22 (2004) 1743-1752.

⁵⁰ P.T. Daley-Yates and D.C.H. McBrien. A study of the protective effect of chloride salts on cisplatin nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 34 (1985) 2363-2369.

⁵¹ N.D. Doolittle, L.L. Muldoon, R.E. Brummett, R.M. Tyson, C. Lacy, J.S. Bubalo, D.F. Kraemer, M.C. Heinrich, J.A. Henry and E.A. Neuwelt. Delayed sodium thiosulfate as an otoprotectant against carboplatin-induced hearing loss in patients with malignant brain tumors. *Clin. Cancer Res.*, 7 (2001) 493-500.

⁵² T.J. Einhäuser, M. Galanski and B.K. Keppler. Determination of platinum in protein-bound CDDP and DBP by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 11 (1996) 747-750.

⁵³ J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B.K. Keppler and R. Lobinski. Investigation of metallodrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 135-144.

⁵⁴ D.N. Bell, J.J. Liu, M.D. Tingle and M.J. McKeage. Specific determination of intact cisplatin and monohydrated cisplatin in human plasma and culture medium ultrafiltrates using HPLC on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 837 (2006) 29-34.

⁵⁵ J. Reedijk. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligand available in the cell?. *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2499-2510.

⁵⁶ E.N. Zhmareva, G.D. Zegzhda, G.B. Kasain and O.A. Livanskaya. Interaction of protein with platinum and palladium compounds with differing biological activities. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 68 (1996) 74-79.

- ⁵⁷ A. Gerl and R. Schierl. Urinary excretion of platinum in chemotherapy-treated long-term survivors of testicular cancer. *Acta Oncologica*, 39 (2000) 519-522.
- ⁵⁸ P. Guo, S. Li and J.M. Gallo. Determination of carboplatin in plasma and tumor by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 783 (2003) 43-52.
- ⁵⁹ R. Xie, W. Johnson, L. Rodriguez, M. Gounder, G.S. Hall and B. Buckley. A study of the interactions between carboplatin and blood plasma proteins using size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 2815-2822.
- ⁶⁰ L. Pendyala and P.J. Creaven. *In vitro* cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer. Res.*, 53 (1993) 5970-5976.
- ⁶¹ S. Uriens and J.P. Tillement. *In vitro* binding of oxaliplatin to human serum proteins. Drug interactions. Debiopharm study report No LPH0022, 1995.
- ⁶² J.G. Morrison, P. White, S. McDougall, J.W. Firth, S.G. Woolfrey, M.A. Graham and D. Greenslade. Validation of a highly sensitive ICP-MS method for the determination of platinum in biofluids: application to clinical pharmacokinetic studies with oxaliplatin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2000) 1-10.
- ⁶³ J.G. Morrison, P. White, S. McDougall, J.W. Firth, S.G. Woolfrey and D. Greenslade. Validation of an inductively coupled plasma (ICP) MS method as applied to measure oxaliplatin-derived platinum in pharmacokinetic studies. *Chromatographia*, 52 (2000) S-104.
- ⁶⁴ M.A. Graham, E. Gamelin, J.L. Misset, S. Brienza, P. Allain, M. Boisdron-Celle, A. Krikorian, D. Greenslade and M. Bayssas. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 39 (1998) 159.
- ⁶⁵ P. Allain, O. Heudi, A. Cailleux, A. Le Bouil, F. Larra, M. Boisdron-Celle and E. Gamelin. Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients. *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 1379-1384.

- ⁶⁶ E. Jerremalm, I. Wallin, J. Yachnin and H. Ehrsson. Oxaliplatin degradation in the presence of important biological sulphur-containing compounds and plasma ultrafiltrate. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 28 (2006) 278-283.
- ⁶⁷ W. Kern, J. Braess, B. Bottger, C.C. Kaufmann, W. Hiddemann and E. Schleyer. Oxaliplatin pharmacokinetics during four-hour infusion. *Clin. Cancer Res.*, 5 (1999) 761-765.
- ⁶⁸ E. Gamelin, A. Le Bouil, M. Boisdron-Celle, A. Turcant, R. Delva, A. Cailleux, A. Krikorian, S. Brienza, E. Cvitkovic, J. Robert, F. Larra and P. Allain. Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 3 (1997) 891-899.
- ⁶⁹ M.A. Graham, S. Brienza, J.L. Misset, E. Cupissol, E. Gamelin and P. Allain. Pharmacokinetics of oxaliplatin given in repeated doses of 130 mg/m² by 2 h infusion every three weeks to cancer patients. Sanofi Research Report No. VAR3149 1998.
- ⁷⁰ B.P. Espósito and R. Najjar. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. *Coord. Chem. Rev.*, 232 (2002) 137-149.
- ⁷¹ L. Trynda-Lemiesz, H. Kozłowski and B.K. Keppler. Effect of *cis*-, *trans*-diamminedichloroplatinum (II) and DBP on human serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, 77 (1999) 141-146.
- ⁷² T. Yotsuyanagi, N. Ohta, T. Futo, S. Ito, D. Chen and K. Ikeda. Multiple and irreversible binding of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) to human serum albumin and its effect on warfarin binding. *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (1991) 3003-3006.
- ⁷³ A.R. Timerbaev, S.S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C.G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz and B.K. Keppler. Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis*, 25 (2004) 1988-1995.

- ⁷⁴ C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev and B.K. Keppler. Capillary electrophoresis in anti-cancer metallodrug research: advances and future challenges. *Electrophoresis*, 24 (2003) 2023-2037.
- ⁷⁵ A.R. Timerbaev, A. Küng and B.K. Keppler. Capillary electrophoresis of platinum-group elements: analytical, speciation and biochemical studies. *J. Chromatogr. A.*, 945 (2002) 25-44.
- ⁷⁶ J.F. Neault and H.A. Tajmir-Riahi. Interaction of cisplatin with serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1384 (1998) 153-159.
- ⁷⁷ A.V. Rudnev, S.S. Aleksenko, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev and B.K. Keppler. Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method. *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 121-127.
- ⁷⁸ A. Sugii, K. Nishimura, K. Harada, M. Nakayama and S. Masuda. High performance liquid chromatography of bovine serum albumin-cis-diaminedichloroplatinum(II) complexes on N-methylpyridinium polymer column. *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (1991) 408-410.
- ⁷⁹ N. Ohta, T. Yotsuyanagi, D. Chen, R. Ono, S. Ito and K. Ikeda. Disulfide bond cleavage of human serum albumin and alterations of its secondary structure by cis-diaminedichloroplatinum(II). *Int. J. Pharm.*, 85 (1992) 39-44.
- ⁸⁰ N. Ohta, D. Chen, S. Ito, T. Futo, T. Yotsuyanagi and K. Ikeda. Effect of *trans*-diaminedichloroplatinum(II) on human serum albumin: conformational changes through partial disulfide bond cleavage. *Int. J. Pharm.*, 118 (1995) 85-93.
- ⁸¹ J. Reedijk. The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds. *Inorg. Chim. Acta*, 198-200 (1992) 873-881.
- ⁸² A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow and P.J. Sadler. Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 14721-14730.

- ⁸³ D. Chen, N. Ohta, M. Ukai, M. Masuda, T. Yotsuyanagi. Binding and aggregation human γ -globulin by cis-diamminedichloroplatinum(II) through disulfide bond. *Biol. Pharm. Bull.*, 17 (1994) 1561-1566.
- ⁸⁴ J. Ni, Y. Wang, Q. Wang, L. Lu and Q. Zheng. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 16 (1996) 246.
- ⁸⁵ I. Khalaila, C.S. Allardyce, C.S. Verma and P.J. Dyson. A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin. *ChemBioChem*, 6 (2005) 1788-1795.
- ⁸⁶ C.S. Allardyce, P.J. Dyson, J. Coffey and N. Johnson. Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 933-935.
- ⁸⁷ M.R. Schlabach and G.W. Bates. The synergistic binding of anions and Fe^{3+} by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis. *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 2182-2188.
- ⁸⁸ M.C. Cox, K.J. Barnham, T.A. Frenkiel, J.D. Hoeschele, A.B. Mason, Q-Y. He, R.C. Woodworth and P.J. Sadler. Identification of platination sites on human serum transferrin using ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 4 (1999) 621-631.
- ⁸⁹ T. Hoshino, M. Misaki, M. Yamamoto, H. Shimizu, Y. Ogawa and H. Toguchi. Receptor-binding, *in vitro* cytotoxicity, and *in vivo* distribution of transferrin-bound cis-platinum (II) of differing molar ratios. *J. Controlled Release*, 37 (1995) 75-81.
- ⁹⁰ T. Hoshino, M. Misaki, M. Yamamoto, H. Shimizu, Y. Ogawa and H. Toguchi. *In vitro* cytotoxicities and *in vivo* distribution of transferrin-platinum(II) complex. *J. Pharm. Sci.*, 84 (1995) 216-221.
- ⁹¹ Y-Y. Zhao, R. Mandal and X-F. Li. Intact holo-transferrin interaction with oxaliplatin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 1956-1962.

- ⁹² R. Mandal, R. Kalke and X.-F. Li. Interaction of oxaliplatin, cisplatin and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of a heme group. *Chem. Res. Toxicol.*, 17 (2004) 1391-1397.
- ⁹³ R. Mandal, C. Teixeira and X.-F. Li. Studies of cisplatin and hemoglobin interactions using nanospray mass spectrometry and liquid chromatography with inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 128 (2003) 629-634.
- ⁹⁴ R. Mandal, R. Kalke and X.-F. Li. Mass spectrometry studies of cisplatin-induced changes of hemoglobin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 2748-2754.
- ⁹⁵ J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer and X.-F. Li. Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 51 (2005) 2274-2281.
- ⁹⁶ J. Begerow, M. Turfeld and L. Dunemann. Determination of physiological platinum levels in human urine using magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with ultraviolet photolysis. *J. At. Anal. Spectrom.*, 11 (1995) 913-916.
- ⁹⁷ Prospecto del fármaco Platinol-AQ (cisplatino). Laboratorios Bristol, Princeton, New Jersey 08543 USA (revisado en 1998).
- ⁹⁸ X. Tang, J.W. Hayes II, L. Schroder, W. Cacini, J. Dorsey, R.C. Elder and K. Tepperman. Determination of biotransformation products of platinum drugs in rat and human urine. *Metal-Based Drugs*, 4 (1997) 97-108.
- ⁹⁹ W. Cacini and Y. Singh. Renal metallothionein and platinum levels in diabetic and nondiabetic rats injected with cisplatin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 197 (1991) 285-289.
- ¹⁰⁰ Prospecto del fármaco Carboplatin. Laboratorios Pfizer, Auckland, New Zealand (revisado en 2005).
- ¹⁰¹ N.D. Tinker, H.L. Sharma and C.A. McAuliffe in: Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy: Proceedings of the fifth international symposium, ed. M. Nicolini, M. Nijhoff, Boston, p 144 (1987).

- ¹⁰² J. Allen, M.A. Graham, J. Firth, S. Woolfrey, D. Greenslade, J.G. Morrison, S. McDougall, P. Ross and D. Cunningham. Biotransformation and pharmacokinetic analysis of oxaliplatin in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 39 (1998) 159.
- ¹⁰³ J.L. Misset and P. Allain. Pharmacokinetics, urinary, and fecal excretion of oxaliplatin in cancer patients. Debiopharm/Sanofi Report No. TDR3500 1995.
- ¹⁰⁴ S. McDougall and J. Allen. In vitro stability of ³H-oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate and urine. Sanofi Research Report No. SPP0111 1998.
- ¹⁰⁵ P. Tohill, H.S. Klys, L.M. Matheson, K. McKay and J.F. Smith. The long-term retention of platinum in human tissues following the administration of cisplatin and carboplatin for cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 28 (1992) 1358-1361.
- ¹⁰⁶ D.J. Stewart, R. S. Benjamin, M. Luna, L. Feun, R. Caprioli, W. Seifert and T.L. Loo. Human tissue distribution of platinum after *cis*-diamminedichloroplatinum. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 10 (1982) 51-54.
- ¹⁰⁷ K. Heydorn, B. Rietz and A. Kraup-Hansen. Distribution of platinum in patients treated with cisplatin determined by radiochemical neutron activation analysis. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11 (1998) 37-43.
- ¹⁰⁸ J. Areberg, S. Bjorkman, L. Einarsson, B. Frankenberg, H. Lundqvist, S. Mattsson, K. Norrgren, O. Scheike and R. Wallin. Gamma camera imaging of platinum in tumours and tissues of patients after administration of ¹⁹¹Pt-cisplatin. *Acta Oncologica*, 38 (1999) 221-228.
- ¹⁰⁹ Z.H. Siddik, M. Jones, F.E. Boxall and K.R. Harrap. Comparative distribution and excretion of carboplatin and cisplatin in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 21 (1988) 19-24.
- ¹¹⁰ A.R. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano and D. Osella. Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *J. Inorg. Biochem.*, 98 (2004) 73-78.

- ¹¹¹ B. Szachowicz-Petelska, Z. Figaszewski and W. Lewandowski. Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumor drugs. *Int. J. Pharm.*, 222 (2001) 169-182.
- ¹¹² D.P. Gately and S.B. Howell. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer*, 67 (1993) 1171-1176.
- ¹¹³ C.S. Allardyce, P.J. Dyson, F.R. Abou-Shakra, H. Birtwistle and J. Coffey. Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems. *Chem. Commun.*, (2001) 2708-2709.
- ¹¹⁴ G. Speelmans, W.M. Rutger, M. Staffhorts, K. Versluis, J. Reedijk and B. De Kruijff. Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*, 36 (1996) 10545-10550.
- ¹¹⁵ J.L. Nitiss. A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs. *PNAS*, 99 (2002) 13963-13965.
- ¹¹⁶ S.J. Lippard, J.M. Berg en: *Principles of Bioinorganic Chemistry*, ed. University Science Books, California, 1994, pag. 113.
- ¹¹⁷ Z.H. Siddik. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22 (2003) 7265-7279.
- ¹¹⁸ E.R. Jamieson and S.J. Lippard. Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2467-2498.
- ¹¹⁹ D. Hagrman, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak and A. Soud. Kinetic study on the reaction of cisplatin with metallothionein. *Drug Metab. Dispos.*, 31 (2003) 916-923.
- ¹²⁰ D. Garcia Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco González and A. Sanz-Medel. Speciation studies of cis-platin adducts with DNA nucleotides via elemental specific detection (P and Pt) using liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry and structural characterization by electrospray mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 861-868.

- ¹²¹ D. García Sar, M. Montes-Bayón, L. Aguado Ortiz, E. Blanco-González, L.M. Sierra and A. Sanz-Medel. In vivo of DNA adducts induced by cisplatin using capillary HPLC-ICP-MS and their correlation with genotoxic damage in *Drosophila melanogaster*. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2007) in press.
- ¹²² J. Reedik, J.M. Teuben en: *Platinum-sulfur interactions involved in antitumor drugs, rescue agents and biomolecules, in Cisplatin, chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, ed. B. Lipper, Weinheim, Wiley-VCH, Zürich, 1999, pag 339-362.
- ¹²³ M. Satoh, D. M. Kloth, S. A. Kadhim, J. L. Chin, A. Naganuma, N. Imura, and M.G. Cherian. Modulation of both cisplatin nephrotoxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis. *Cancer Res.*, 53 (1993) 1829-1832.
- ¹²⁴ <http://www.chemcases.com/cisplat/cisplat17.htm>. Kennesaw State University.
- ¹²⁵ H. Mese, A. Sasaki, R.E. Alcalde, S. Nakayama and T. Matsumura. Establishment and characterization of cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma cell line, A431 cell. *Chemotherapy*, 44 (1998) 414-420.
- ¹²⁶ G. Chu. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 787-790.
- ¹²⁷ M. Margoshes and B.L. Vallee. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4813-4814.
- ¹²⁸ M.J. Stillman. Metallothioneins. *Coord. Chem. Rev.*, 144 (1995) 461-511.
- ¹²⁹ S.J. Lippard, J.M. Berg en: *Principles of Bioinorganic Chemistry*, ed. University Science Books, California (1994), pag. 23.
- ¹³⁰ R. Mandal, G. Jiang and X-F. Li. Direct evidence for co-binding of cisplatin and cadmium to native zinc- and cadmium-containing metallothionein. *Appl. Organometal. Chem.*, 17 (2003) 675-681.

- ¹³¹ G. Van Vyncht, G. Bordin and A.R. Rodriguez. Rabbit liver metallothionein subisoform characterisation using liquid chromatography hyphenated to diode array detection and electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia*, 52 (2000) 745-752.
- ¹³² A. Pattanaik, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, C.F. Shaw III, D.H. Petering, A. Hitchcock and L. Saryan. Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 16121-16128.
- ¹³³ P. Palumaa, O. Zerbe and M. Vasak. Formation of spectroscopic characterization of a novel monomeric cadmium-containing and phosphate-containing form of metallothionein. *Biochemistry*, 32 (1993) 2874-2879.
- ¹³⁴ P.D. Sadowitz, B.A. Hubbard, J.C. Dabrowiak, J. Goodisman, K.A. Tacka, M.K. Aktas, M.J. Cunningham, R.L. Dubowy and A-H. Souid. Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs. *Drug Metab. Dispos.*, 30 (2002) 183-190.
- ¹³⁵ B.A.J. Jansen, J. Brouwer and J. Reedijk. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem.*, 89 (2002) 197-202.
- ¹³⁶ D. Hagrman, J. Goodisman and A-K. Souid. Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308 (2003) 658-666.
- ¹³⁷ J.C. Dabrowiak, J. Goodisman and A-K. Souid. Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols. *Drug Metab. Dispos.*, 30 (2002) 1378-1384.
- ¹³⁸ R. Miao, G. Yang, Y. Miao, Y. Mei, J. Hong, C. Zhao and L. Zhu. Interactions of platinum(II) complexes with sulfur-containing peptides studied by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 1031-1040.
- ¹³⁹ A. Bernareggi, L. Torti, R.M. Facino, M. Carini, G. Depta, B. Casetta, N. Farrell, S. Spadacini, R. Ceserani and S. Tognella. Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation in vitro but not

in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients. *J. Chromatogr. B.*, 669 (1995) 247-263.

¹⁴⁰ O. Heudi, S. Mercier-Jobard, A. Cailleux and P. Allain. Mechanisms of reaction of L-methionine with carboplatin and oxaliplatin in different media: a comparison with cisplatin. *Biopharm. Drug Dispos.*, 20 (1999) 107-116.

¹⁴¹ V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori and P.L. Orioli. Structural investigation of cisplatin-protein interactions: selective platination of His19 in a cuprozinc superoxide dismutase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (2006) 1267-1269.

¹⁴² G. Yang, R. Miao, C. Jin, Y. Mei, H. Tang, J. Hong, Z. Guo and L. Zhu. Determination of binding sites in carboplatin-bound cytochrome C using electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 40 (2005) 1005-1016.

¹⁴³ J. Ruiz Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski and J. Szpunar. Identification of water-soluble selenium-containing proteins in selenized yeast by size-exclusion-reversed-phase HPLC/ICPMS followed by MALDI-TOF and electrospray Q-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 3765-3774.

¹⁴⁴ P. Moreno, M.A. Quijano, A.M. Gutiérrez, M.C. Pérez-Conde and C. Cámara. Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 315-327.

¹⁴⁵ V. Díaz Huerta, M.L. Fernández Sánchez and A. Sanz-Medel. Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 644-648.

¹⁴⁶ I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara, M.A. Palacios and D.A. Roman-Silva. Evaluation of arsenic species-protein binding in cardiovascular tissues by bidimensional chromatography with ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 292-296.

¹⁴⁷ A.I. Cabañero, Y. Madrid and C. Cámara. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal. Chim. Acta*, 526 (2004) 51-61.

- ¹⁴⁸ H.G. Infante, F. Cuyckens, K. van Campenhout, R. Blust, M. Claeys, L. Van Vaeck and F.C. Adams. Characterization of metal complexes with metallothioneins in the liver of the carp *Cyprinus carpio* by reversed-phase HPLC with ICP-MS and electrospray ionization (ESI)-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 159-166.
- ¹⁴⁹ D.E. Coling, D. Ding, R. Young, M. Lis, E. Stofko, K.M. Blumenthal and R.J. Salvi. Proteomic analysis of cisplatin-induced cochlear damage: methods and early changes in protein expression. *Hearing Res.*, 226 (2007) 140-157.
- ¹⁵⁰ P.H. Liberman, C. Schultz, G. Schmidt, M.V. Gómez, A.L. Carvalho, A.C.A. Pellizzon, J.R. Testa, O. Feher and L.P. Kowalski. Auditory effects after organ preservation protocol for laryngeal / hypopharyngeal carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 130 (2004) 1265-1268.
- ¹⁵¹ J. Szpunar. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst*, 130 (2005) 442-465.
- ¹⁵² D. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeven and R. Lobinski. *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1453-1470.
- ¹⁵³ J. Szpunar. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 54-56.
- ¹⁵⁴ H. Haraguchi, H. Matura en: *Bitrel, Wako (Saitama)*, ed. Enomoto, Fujiyoshida (Yamanashi), Japan (2003).
- ¹⁵⁵ J.S. Garcia, C. Schmidt de Magalhaes and M.A. Zezzi Arruda. Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta*. 69 (2006) 1-15.
- ¹⁵⁶ S. Santiago-Rivas, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, J. Moreda-Piñeiro, E. Alonso-Rodríguez, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Malúa and D. Prada-Rodríguez. Pressurized liquid extraction-assisted mussel cytosol preparation for the determination of metals bound to metallothionein-like proteins. *Anal. Chim. Acta*, 603 (2007) 36-43.

- ¹⁵⁷ O. Nygren, G.T. Vaughan, T.M. Florence, G.M.P. Morrison, I.M. Warner and L.S. Dale. Determination of platinum in blood by adsorptive voltammetry. *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1637-1640.
- ¹⁵⁸ K. Heydorn, B. Rietz and A.J. Krarup-Hansen. Distribution of platinum in patients treated with cisplatin determined by radiochemical neutron activation analysis. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 11 (1998) 37-43.
- ¹⁵⁹ Z. Yang, X. Hou and B.T. Jones. Determination of platinum in clinical samples. *Applied Spectroscopy Reviews*. 37 (2002) 57-88.
- ¹⁶⁰ R.J.P. Williams. Bio-inorganic chemistry: its conceptual evolution. *Coord. Chem. Rev.*, 100 (1990) 573-610.
- ¹⁶¹ J. Szpunar. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 125 (2000) 963-988.
- ¹⁶² A.L. Rosen and G.M. Hieftje. Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation. *Spectrochimica Acta Part B.*, 59 (2004) 135-146.
- ¹⁶³ C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski and M Potin-Gautier. Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 645-650.
- ¹⁶⁴ J. Yoshinaga, Y. Shibata, T. Horiguchi and M. Morota. NIES certified reference materials for arsenic speciation. *Accred. Qual. Assur.*, 2 (1997) 154-156.
- ¹⁶⁵ A. Sanz-Medel. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochim. Acta*, 53B (1998) 197-211.
- ¹⁶⁶ A. Rodriguez-Cea, M.R. Fernández, E. Blanco-González, B. Andón and A. Sanz-Medel. Metal speciation analysis in eel (*Anguilla anguilla*) metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 1357-1364.

- ¹⁶⁷ M.E. del Castillo, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Meija and A. Sanz-Medel. Strategies to study human serum transferrin isoforms using integrated liquid chromatography ICP-MS, MALDI-TOF and ESI-Q-TOF detection: application to chronic alcohol abuse. *Anal. Chem.*, 77 (2005) 5615-5621.
- ¹⁶⁸ R. Lobisnki, H. Chassaigne and J. Szpunar. Analysis of metallothioneins using coupled techniques. *Talanta*, 46 (1998) 271-289.
- ¹⁶⁹ A. Makarov and J. Szpunar. Species-selective determination of cobalamin analogues by reverse-phase HPLC with ICP-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 1323-1327.
- ¹⁷⁰ L. Hinojosa Reyes, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso and A. Sanz-Medel. Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 1210-1216.
- ¹⁷¹ M.J. Dunn en: *Gel electrophoresis: Proteins*, ed. Bios Scientific Publishers, Oxford (1993).
- ¹⁷² S. Lustig, J. De Kimpe, R. Cornelis and P. Schramel. Development of native two-dimensional electrophoresis methods for the separation and detection of platinum carrying serum proteins: initial steps. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 484-487.
- ¹⁷³ J.S. Becker, M. Zoriy, J.S. Becker, C. Pickhardt and M. Przybylski. Determination of phosphorus and metals in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 149-152.
- ¹⁷⁴ J.L. Nielsen, A. Abildtrup, J.M. Christensen, P. Watson, A. Cox and C.W. McLeod. Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochim. Acta Part B.*, 53 (1998) 339-345.
- ¹⁷⁵ S. Lustig, J. De Kimpe, R. Cornelis, P. Schramel and B. Michalke. Platinum speciation in clinical and environmental samples: Scrutiny of data obtained by using electrophoresis techniques (flatbed and capillary). *Electrophoresis*, 20 (1999) 1627-1633.

- ¹⁷⁶ M.P. Richards and J.H. Beattie. Analysis of metalloproteins and metal-binding peptides by capillary electrophoresis. *J. Capillary Electrophor.*, 3 (1994) 196-207.
- ¹⁷⁷ A. Prange and D. Pröfrock. Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (2005) 372-389.
- ¹⁷⁸ S.S. Kannamkumarath, K. Wrobel, C. B'Hymer and J.A. Caruso. Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *J. Chromatogr. A.*, 975 (2002) 245-266.
- ¹⁷⁹ B. Michalke. Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A report on technical principles and problem solutions, potential, and limitations of this technology as well as on examples of application. *Electrophoresis*, 26 (2005) 1584-1597.
- ¹⁸⁰ L. Esteban, en: *Espectrometría de Masas en imágenes*, ed. ACK editores, Madrid, 1993.
- ¹⁸¹ A. Montaser, J.A. McLean, H. Liu and J.M. Mermet, in: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ed. A. Montaser, Wiley-VCH, Nueva York, 1998.
- ¹⁸² D.R. Bandura, V.I. Baranov and S.D. Tanner. Detection of ultratrace phosphorus and sulfur by quadrupole ICPMS with dynamic reaction cell. *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1497-1502.
- ¹⁸³ D. Profrock, P. Leonhard and A. Prage. Determination of sulfur and selected trace elements in metallothioneins-like proteins using capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry with octapole reaction cell. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 132-139.
- ¹⁸⁴ S. Hann, Köllensperger, C. Obinger, P.G. Fortmüller and G. Stingeder. SEC-ICP-DRCMS and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 74-79.

- ¹⁸⁵ A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar and A. Sanz-Medel. Quantitative protein phosphorylation analysis: the role of ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 1223-1237.
- ¹⁸⁶ K. Polec-Pawlak, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, A. Prange and R. Lobinski. Analysis for metal complexes with metallothionein in rat liver by capillary zone electrophoresis using ICP double-focussing sector-field isotope dilution MS and electrospray MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 908-912.
- ¹⁸⁷ D. Schaumlöffel, J. Ruiz Encinar and R. Lobinski. Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping. *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6837-6842.
- ¹⁸⁸ J.E. Carr, K. Kwok, G.K. Webster and J.W. Carnahan. Effects of liquid chromatography mobile phases and buffer salts on phosphorus inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometries utilizing ultrasonic nebulization and membrane desolvation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 42-50.
- ¹⁸⁹ D. Schaumlöffel. Capillary liquid separation techniques with ICP-MS detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 351-354.
- ¹⁹⁰ M. Montes-Bayón, K. DeNicola and J.A. Caruso. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 1000 (2003) 457-476.
- ¹⁹¹ D. Schaumlöffel and A. Prange. A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 452-456.
- ¹⁹² J. Li, T. Umemeura, T. Odake and K. Tsunoda. A high-efficiency cross-flow micronebulizer interface for capillary electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5992-5999.
- ¹⁹³ L. Bendahl, B. Gammelgaard, O. Jons, O. Farver and S.H. Hansen. Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation. *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2001) 38-42.

- ¹⁹⁴ J.W. Olesik, J.A. Kinzer, E.J. Grunwald, K.K. Thaxton, S.V. Olesik. The potential and challenges of elemental speciation by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray or ion spray mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B.*, 53 (1998) 239-251.
- ¹⁹⁵ B. Michalke and P. Schramel. Antimony speciation in environmental samples by interfacing capillary electrophoresis on-line to an inductively coupled plasma mass spectrometer. *J. Chromatogr. A.*, 834 (1999) 341-348.
- ¹⁹⁶ B. Gammelgaard and L. Bendahl. Selenium speciation in human urine samples by LC- and CE-ICP-MS separation and identification of selenosugars. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 19 (2004) 135-142.
- ¹⁹⁷ C-F. Yeh and S-J. Jiang. Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 26 (2005) 1615-1621.
- ¹⁹⁸ M. Silva da Rocha, A.B. Soldado, E. Blanco-González and A. Sanz-Medel. Speciation of mercury compounds by capillary electrophoresis coupled on-line with quadrupole and double-focusing inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 513-518.
- ¹⁹⁹ S. Mounicou, K. Polec, H. Chassaingne, M. Potin-Gautier and R. Lobinski. Characterization of metal complexes with metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) with ICP-MS and electrospray (ES)-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 635-642.
- ²⁰⁰ G. Álvarez-Llamas, A. Rodríguez-Cea, M.R. Fernández de la Campa and A. Sanz-Medel. Large volume sample stacking capillary electrophoresis for metallothioneins analysis in eel liver. *Anal. Chim. Acta.*, 486 (2003) 183-190.
- ²⁰¹ B. Michalke, S. Lustig and P. Schramel. Analysis for the stability of platinum-containing species in soil samples using capillary electrophoresis interfaced on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Electrophoresis*, 18 (1997), 196-201.

²⁰² R.A.W. Johnstone and M.E. Rose in: *Mass spectrometry for chemists and biochemists*, ed. Cambridge University Press, Great Britain, 1996.

²⁰³ M. Kunter and N.E. Sherman in: *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*, ed Wiley Interscience, New York, 2000.

²⁰⁴ J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz and D.F. Hunt. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101 (2004) 9528-9533.

²⁰⁵ M. Anniko and A. Sobin. Cisplatin: evaluation of its ototoxic potential. *Am. J. Otolaryngol.*, 7 (1986) 276-293.

²⁰⁶ A. Troyano, C. Fernández, P. Sancho, E. de Blas and P. Aller. Effect of glutathione on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 47107-47115.

²⁰⁷ C. Fernández, A.M. Ramos, P. Sancho, D. Amrán, E. de Blas and P. Aller. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate may both potentiate and decrease the generation of apoptosis by the antileukemic agent arsenic trioxide in human promonocytic cells. Regulation by extracellular signal-regulated protein kinases and glutathione. *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 3877-3884.

²⁰⁸ S.C. Mann, P.S. Andrews and S.B. Howell. Short-term cis-diamminedichloroplatinum (II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 25 (1990) 236-240.