



Thiago de Oliveira Araujo

**Determinação de Biomoléculas Derivadas de
Compostos Oncolíticos à Base de Platina em
Diferentes Linhagens Celulares**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor pelo programa de Pós-
graduação em Química Analítica do departamento de
Química da PUC-Rio.

Orientadores: Prof. Ricardo Queiroz Aucélio
Prof. Reinaldo C. de Campos (*in memoriam*)
Co-orientadora: Profa. Janaína Fernandes

Rio de Janeiro
Outubro de 2014



Thiago de Oliveira Araujo

**Determinação de Biomoléculas Derivadas
de Compostos Oncolíticos a Base de
Platina em Diferentes Linhagens Celulares**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor pelo programa de Pós-
graduação em Química Analítica do departamento de
Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão
Examinadora abaixo assinada.

Prof. Ricardo Queiroz Aucélio

Orientador

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Janaína Fernandes

UFRJ

Prof. Josino Costa Moreira

Fiocruz

Prof. Ricardo Erthal Santelli

UFRJ

Prof. Fatima Ventura Pereira Meirelles

Departamento de Química - PUC-Rio

Prof. Aderval Severino Luna

UERJ

Prof. Cássia Ribeiro Ponciano

Departamento de Física - PUC-Rio

Dra. Marcia Silva da Rocha

INMETRO

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 27 de outubro de 2014

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Thiago de Oliveira Araujo

Graduou-se Bacharel em Química pela Universidade de Brasília (UnB) em 2002 e atua desde então como pesquisador no Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Coordenou o Laboratório de Análise Inorgânica (Labin), no período de 2006 à 2009. Atua intensamente na área de garantia da qualidade em análises químicas, e na pesquisa e desenvolvimento em química analítica e bioanalítica. Atualmente coordena a área transversal de Metrologia Forense na Divisão de Metrologia Química.

Ficha Catalográfica

Araujo, Thiago de Oliveira

Determinação de biomoléculas derivadas de compostos oncolíticos à base de platina em diferentes linhagens celulares / Thiago de Oliveira Araujo ; orientador: Ricardo Queiróz Aucélio ; co-orientadores: Janaína Fernandes, Reinaldo C. de Campos. – 2014.

147 f. : il. (color.) ; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2014.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Cisplatina. 3. Oxaliplatina. 4. Carboplatina. 5. HPLC-ICP-MS. 6. K562. 7. Acetilcolinesterase. 8. Aduto de DNA biomarcador. I. Aucélio, Ricardo Queiróz. II. Fernandes, Janaína. III. Campos, Reinaldo C. de IV. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. V. Título.

CDD: 540

Ao meu irmão, Davi e à minha mulher, Lilian.

Agradecimentos

Primeiramente eu agradeço ao Professor Reinaldo Calixto por confiar a mim o desenvolvimento de um projeto bonito, inovador e relevante. Ele foi um exemplo de paixão pelo trabalho e elegância no convívio com as agruras da pesquisa no Brasil. Obrigado Professor, sinto você não estar aqui para colher comigo mais este fruto de uma semente plantada.

Agradeço ao Professor Ricardo Aucélio, que me acolheu, acreditou e apoiou durante toda nossa caminhada juntos no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por ter dedicado a mim nada além de respeito, confiança e apoio. Sem isso, certamente eu não teria conseguido. Espero conseguir seguir seu exemplo em minha carreira futura.

Agradeço também à Professora Janaína Fernandes, entusiasta da bancada que me conduziu pelas, para mim, tortuosas veredas da biologia celular e molecular. Sempre empolgada, disposta e meticulosa com os experimentos e seus resultados. Muito do meu desenvolvimento nas atividades laboratoriais se devem a você professora, obrigado.

Não tenho como agradecer suficiente à minha alma gêmea, professora, amiga, irmã... minha mulher Lilian. Sempre atenta a meu andamento, advertindo, aconselhando, arregaçando as mangas. Sem ela, ou mesmo sem o apoio dela não daria, eu não chegaria aqui. Ela me apoiou e confortou, estudou comigo e discutiu o assunto... enfim, obrigado meu amor, meu grande amor.

Agradeço a meus filhos, Carolina e Bernardo, pela compreensão, alegria e preces para “papai terminar a tese”. Apoio e interesse em saber, o que o pai está fazendo, quando vai terminar e pela fervorosa torcida, obrigado meus amores.

Agradeço ao meu irmão Davi Araujo e a meus pais João Rita de Araujo e Marieta do Carmo de Oliveira pelo carinho, compreensão e apoio incondicional que me

ofereceram durante toda esta caminhada. Mesmo a distância, foram fundamentais para me orientar, prover forças e estimular para que eu continuasse.

Agradeço de forma sincera pela contribuição, apoio e disponibilidade aos queridos: Danielle Cavalcanti, Rodrigo Araujo, Bruno Silva, Douglas de Oliveira, Manuel de Castro Carneiro, Fernanda Veronesi Marinho Pontes, Daniela Lourenço, Carolina Catta Preta, Marcia Rocha, Lilian Silva, Jefferson Rodrigues, Maria Luiza, Alfredo Sanz Mendel, Valnei Smarçaro, Janaína Caixeiro e Humberto Brandi. Me desculpo com aqueles não mencionados nominalmente, mas também fundamentais para o sucesso deste trabalho, Obrigado.

Agradeço ainda às instituições que me apoiaram. Primeiramente ao Inmetro pelo imenso investimento em minha formação e apoio a meu desenvolvimento profissional. À PUC-Rio pela bolsa de isenção e infraestrutura fornecidas. À UFRJ e CETEM pela infraestrutura. As agências de fomento FAPERJ e CNPq pelo apoio que mantém o funcionamento dos laboratórios envolvidos.

Resumo

Araujo, Thiago de Oliveira; Aucélio, Ricardo Queiroz; Fernandes Janaína. **Determinação de Biomoléculas Derivadas de Compostos Oncolíticos à Base de Platina em Diferentes Linhagens Celulares.** Rio de Janeiro, 2014. 147p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A utilização de drogas à base de platina é o tratamento de primeira linha para diversos tipos de câncer. Pacientes tratados com estas drogas apresentam resultados melhores que os obtidos com outros regimes de quimioterapia para os mesmos tipos de malignidades. As principais limitações para a utilização destes compostos são os efeitos colaterais severos e a resistência dos tumores ao tratamento. A cisplatina foi a primeira droga dessa categoria a ser empregada. Desde o final dos anos 70 até hoje, esta droga vem sendo amplamente utilizada e com sucesso substancial. Acredita-se que o principal mecanismo de ação desta classe de medicamentos seja a ligação de dois sítios ativos da platina com o DNA das células tumorais, impedindo sua multiplicação e finalmente induzindo a apoptose, o que provoca a redução, e em alguns casos a eliminação, dos tumores. Entretanto, devido à complexidade dos mecanismos envolvidos, uma descrição clara da atuação intracelular destas drogas ainda não foi estabelecida. A combinação de técnicas de separação como eletroforese ou cromatografia líquida de alta performance com técnicas de espectrometria atômica tem se apresentado como uma poderosa alternativa para investigação de fenômenos biológicos que envolvem, de alguma maneira, espécies metálicas. A hifenação destas técnicas permite a separação e detecção em linha de biomoléculas contendo metais, possibilitando a obtenção de informações únicas sobre os processos biológicos. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de métodos analíticos utilizando eletroforese em gel de agarose (GE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para a determinação de biomoléculas contendo platina em materiais biológicos. O principal objetivo do trabalho é fornecer ferramentas analíticas para o estudo dos

mecanismos de ação de drogas à base de platina em humanos. Foram utilizados diversos materiais biológicos, como sangue, urina e culturas de células. A cromatografia líquida em fase reversa foi usada na determinação das drogas intactas e de seus produtos de hidrólise; a cromatografia de exclusão por tamanho foi empregada para a avaliação de proteínas presentes nas amostras enquanto a cromatografia de par iônico para separação de fragmentos de DNA. A detecção de platina nos eluatos por ICP-MS permitiu a obtenção de cromatogramas limpos apresentando claramente as moléculas contendo platina. A evidência da aplicabilidade dos métodos desenvolvidos foi avaliada com a prospecção de biomarcadores de eficiência do tratamento com cisplatina. Diversas linhagens celulares foram expostas a diferentes tratamentos com cisplatina e tiveram seus comportamentos avaliados. A determinação de adutos de DNA contendo platina apresentou-se como uma interessante perspectiva para a obtenção de um biomarcador de resistência ao tratamento com cisplatina.

Palavras-chave

Cisplatina; oxaliplatina; carboplatina; HPLC-ICP-MS; K562; aduto de DNA; biomarcador.

Abstract

Araujo, Thiago de Oliveira; Aucélio, Ricardo Queiroz (Advisor); Fernandes Janaina (Co-advisor). **Determination of Biomolecules Derived from Platinum-Based Oncolytic Compounds in Different Cell Lines.** Rio de Janeiro, 2014. 147p. Doctoral Degree Theses – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The use of platinum-based drugs is the first line treatment for many cancers. Patients treated with these drugs present better outcome when compared with other chemotherapy regimens for the same types of malignancies. The major limitations to the use of these drugs are the severe side effects and resistance tumors present to the treatment. Cisplatin was the first platinum-based drug to be approved for human use. Since the late 1970's until today, this drug has been widely used with great success. It is believed that the major mechanism of action of these drugs is the binding of two active sites of platinum complexes with the DNA of the tumor cells, preventing their multiplication and finally inducing apoptosis, that leads to a reduction, and in some cases eliminating, tumors. However, due to the complexity of the mechanisms involved, a clear description of the intracellular action of these drugs has not been established. The combination of separation techniques such as electrophoresis or high performance liquid chromatography with atomic spectrometric techniques has emerged as a powerful alternative for investigation metal-related biological phenomena. The so called *hyphenation* of these techniques allows the separation and detection of biomolecules containing metals, making possible to obtain unique information about biological processes. This work presents the development of analytical methodologies using agarose gel electrophoresis (GE), high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of platinum-containing biomolecules in biological materials. The main objective of this work is to provide analytical tools for the study of the mechanisms of action of platinum-based drugs in humans. Various biological materials such as blood, urine and cell cultures were used. Reverse

phase liquid chromatography was used for the determination of intact drugs and its hydrolysis products; size exclusion chromatography was used to assess the protein profile in samples while the ion-pair chromatography for separation of DNA fragments. The detection of platinum in the eluates by ICP-MS allowed the obtention of clean chromatograms clearly presenting the platinum-containing molecules. The evidence of the applicability of the developed methods was assessed with the search for biomarkers of efficacy of treatment with cisplatin. Several cell lines were exposed to different treatments of cisplatin and their behavior were evaluated. The determination of DNA adducts containing platinum presented an interesting approach for obtaining a marker of resistance to cisplatin treatment.

Keywords

Cisplatin; oxaliplatin; carboplatina; HPLC-ICP-MS; DNA adduct; biomarker.

Sumário

1. Introdução	18
1.1 Contextualização	18
1.2 Objetivos	19
1.2.1 Geral	19
1.2.2 Específicos	20
2. Fundamentação teórica	21
2.1 Algumas características do câncer humano	21
2.2 Tratamento para o Câncer	23
2.3 Drogas à base de platina	24
2.3.1 Cisplatina	26
2.3.1.1 Mecanismo de ação	27
2.3.1.2 Efeitos Colaterais	33
2.3.1.3 Resistência à Cisplatina	34
2.3.2 Carboplatina	37
2.3.3 Oxaliplatina	39
2.4 Determinação de biomoléculas contendo metais: Metalômica.	41
2.4.1 Análise de especiação	42
2.5 Células como Modelos Biológicos	44
2.6 Técnicas utilizadas	46
2.6.1 ICP-MS	46
2.6.2 HPLC e HPLC-ICP-MS	48
2.6.3 Citometria de fluxo	51
2.6.4 Extração de DNA e eletroforese em gel	53
3. Materiais e Metodologia	55
3.1 Materiais	55
3.1.1 Reagentes	55
3.1.2 Materiais	57
3.1.3 Instrumentos	57

3.2	Procedimentos	59
3.2.1	Especiação de platina em drogas com acoplamento HPLC-ICP-MS	59
3.2.2	Cultura de células	61
3.2.3	Determinação de metabolismo celular da cisplatina	61
3.2.4	Extração de DNA e eletroforese em gel	63
3.2.5	Extração do DNA do gel	67
3.2.6	Determinação de fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS.	67
4.	Resultados e discussão	70
4.1	Estudo de separação cromatográfica aplicado a drogas à base de platina	70
4.2	Estudos com células	82
4.3	Experimentos de acumulação celular de Pt	89
4.4	Extração de DNA e eletroforese em gel	91
4.5	Determinação de fragmentos de DNA contendo platina por HPLC-ICP-MS	96
5.	Conclusão	104
6.	Referências Bibliográficas	106
7.	Anexo I: Composição do meio de cultura RPMI 1640	127
8.	Anexo II - Publicações resultantes dos trabalhos desenvolvidos na Tese.	128

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas dos compostos platínicos mais utilizados com atividade oncolítica. a) cisplatina; b) carboplatina; c) oxaliplatina.	25
Figura 2: Produtos da hidrólise da cisplatina após cruzar a membrana celular	29
Figura 3: Ação da cisplatina na fração não nuclear da célula	30
Figura 4: Estrutura do DNA após ligação da cisplatina	31
Figura 5: a) Modelo da estrutura do DNA evidenciando sítios de ligação preferenciais; b) adutos mais recorrentes da ligação da cisplatina com DNA; c) modelo de estrutura química de adutos formados pela oxaliplatina, análogos aos formados pela cisplatina	33
Figura 6: Produtos de hidrólise da carboplatina em meio aquoso	38
Figura 7: Produtos de hidrólise da oxaliplatina.	40
Figura 8: Esquema da estrutura de um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado usado para medições por ICP-MS.	47
Figura 9: Representação esquemática de um sistema de HPLC.	49
Figura 10: Representação esquemática de um citômetro de fluxo.	51
Figura 11: Resultado de avaliação de viabilidade celular por citometria de fluxo	52
Figura 12: Sistema HPLC-ICP-MS da PUC-Rio.	60
Figura 13: Aparato de eletroforese em gel	66
Figura 14: Exemplo de gel de agarose utilizado para separação dos fragmentos de DNA	66
Figura 15: Sistema HPLC-ICP-MS montado no Inmetro.	68
Figura 16: Cromatograma de uma solução contendo $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cisplatina em soro fisiológico.	71
Figura 17: Cromatograma de uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de carboplatina em soro fisiológico.	72

Figura 18: Cromatogramas apresentando as espécies de Pt presentes em uma solução aquosa da mistura de cisplatina e carboplatina.	73
Figura 19: Cromatogramas da separação de espécies de platina em uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ cisplatina em soro fisiológico.	75
Figura 20: Cromatograma apresentando a separação das espécies de platina em uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de carboplatina	76
Figura 21: Cromatograma de uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de oxaliplatina em água	76
Figura 22: Cromatograma das três drogas diluídas em um soro fisiológico a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uma.	77
Figura 23: Cromatogramas da oxaliplatina solubilizada em urina imediatamente após o preparo da solução.	78
Figura 24: Cromatogramas obtido 24 h após a solubilização da oxaliplatina em urina. “A” indica os picos comuns encontrados na urina incubada com oxaliplatina e urina advinda de um paciente tratado com oxaliplatina (ver Figura 25).	79
Figura 25: Urina de uma paciente tratado com oxaliplatina coletada 72 h após a infusão e analisada 1 h após a coleta. “A” representa os sinais comuns aos observados na urina incubada com oxaliplatina por 24 h; e “B” são os picos referentes a metabólitos da oxaliplatina observados apenas nas amostras oriundas de paciente em tratamento com o fármaco.	80
Figura 26: Urina de um paciente tratado com oxaliplatina coletada 72 h após a infusão da droga e analisada 24 h após a coleta após armazenamento à 4°C .	81
Figura 27: Células em cultura. a) H460 e b) Lucena.	82
Figura 28: Resultados de viabilidade celular por citometria de fluxo. Incubação de K562 por 48 h com diferentes concentrações de cisplatina:	84
Figura 29: Resultados de viabilidade celular por citometria de fluxo. Incubação de Lucena por 48 h com diferentes concentrações de cisplatina	84
Figura 30: Índice de apoptose para linhagem Lucena.	85
Figura 31: Índice de morte celular para linhagem K562.	86

Figura 32: Avaliação do funcionamento das bombas de efluxo Pgp por citometria de fluxo. 88

Figura 33: Resultados de eletroforese em gel. Raia *a*: DNA ladder 1 kb; raias *b*, *c* e *d* DNA ladder 1 kb, DNA de culturas de K562 sem tratamento e tratadas por 48 h com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cisplatina extraídos pelo método 1; raias *e*, *f* e *g* o mesmo que nas raias *b*, *c* e *d* com extração pelo método 2. 94

Figura 34: (1) Gel apresentando um padrão de degradação do DNA devido à apoptose induzida por cisplatina, destacando bandas com fragmentos de DNA de 200 PB. (2) Mesmo gel após a remoção das porções contendo os fragmentos de DNA de interesse. 95

Figura 35: Cromatograma de uma injeção de um branco (Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , pH 7,5) com as condições escolhidas para separação dos fragmentos de DNA. 99

Figura 36: Cromatograma obtido para DNA Ladder 100 BP. 100

Figura 37: Cromatograma obtido para a cisplatina pura a 1 mg L^{-1} . 101

Figura 38: Cromatograma do DNA da K562 tratada com cisplatina 102

Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições otimizadas para separação das espécies de Pt das drogas e seus produtos de hidrólise com detecção por ICP-MS	60
Tabela 2: Parâmetros instrumentais para determinação da cinética de entrada e de saída de cisplatina da linhagem K562 e Lucena.	63
Tabela 3: Condições cromatográficas escolhidas para determinação de fragmentos de DNA contendo platina.	68
Tabela 4: Condições cromatográficas otimizadas para separação de drogas à base platina intactas e produtos de hidrólise em meio aquoso e fluidos biológicos.	74
Tabela 5: Resultados do estudo de efluxo de cisplatina pelas células K562 e Lucena.	90
Tabela 6: Condições do ICP-MS para determinação de fragmentos de DNA contendo Pt.	96
Tabela 7: Condições cromatográficas otimizadas para separação de fragmentos de DNA.	98

*É preciso amar as pessoas como se não houvesse amanhã, porque se você
parar pra pensar, na verdade, não há.*

Renato Russo, Pais e Filhos

1. Introdução

1.1 Contextualização

O presente trabalho aborda o desenvolvimento de métodos analíticos como ferramenta para o entendimento da bioquímica envolvida no tratamento de cânceres com drogas à base de platina. Este tipo de fármaco vem sendo utilizado desde a década de 1970 e, devido à complexidade e espectro de sua atuação, os processos bioquímicos responsáveis pela efetividade das drogas e também pela resistência de certos tumores ao tratamento ainda não foram completamente esclarecidos. Pontos que ainda devem ser respondidos são o entendimento dos processos bioquímicos de ação das drogas e o estabelecimento de indicadores de eficácia do tratamento com drogas à base de platina (biomarcadores). Tal conhecimento pode reduzir drasticamente a exposição de pacientes aos severos efeitos colaterais trazidos por esta classe de medicamentos.

Em parte, o não entendimento dos processos celulares deve-se à falta de abordagens analíticas que permitam desvendar os processos que envolvem estes fármacos dentro do organismo. Nesta lacuna, a química analítica pode prestar grande serviço à biologia e à medicina, desenvolvendo estratégias para se extrair informação relevante e que repercutam na avaliação da efetividade dos medicamentos e no ajuste dos tratamentos realizados com estes. Os químicos analíticos contribuem com uma compreensão aprofundada das ferramentas disponíveis e com uma percepção apurada da qualidade dos resultados das determinações químicas. Em trabalhos como este, a parceria com biólogos e médicos, que trazem uma percepção dos processos moleculares, celulares e sistêmicos em organismos vivos, deveria mostrar grande sinergia para conduzir a achados que não seriam possíveis de obter isoladamente.

Neste trabalho foram desenvolvidas abordagens analíticas que objetivaram esclarecer etapas do metabolismo de drogas à base de platina. A hifenação da cromatografia líquida e a espectrometria de massas foram obtidas, assim como

abordagens analíticas que permitiram acessar informações biológicas até então mascaradas por tratamentos de amostras inadequados.

O presente trabalho foi construído com o acúmulo de conhecimentos nas áreas da química analítica e da biologia e exigiu o desenvolvimento de aptidões no tratamento de amostras biológicas, cultura e manutenção de populações de células e uso de técnicas características das análises biológicas. No processo foi desenvolvido um protocolo para detectar um possível indicador do prognóstico do tratamento de células tumorais com drogas à base de platina. A rotina analítica consistiu em extrair o DNA das células selecionadas, separar os fragmentos de DNA de interesse para posterior análise, que possibilitou uma primeira investigação de fragmentos de DNA contendo Pt de células de leucemia tratadas com cisplatina. Vale salientar que os métodos atualmente disponíveis na literatura para determinação de DNA ligado à Pt são precedidos por uma digestão com DNase, que fragmenta o DNA em pares de bases. Esta prática remove a informação biológica que indica a origem do fragmento de DNA, isto é, o tamanho da molécula que contém platina. Com a abordagem proposta aqui não se perde tal informação, permitindo inferir algo sobre a origem dos fragmentos de DNA contendo platina, consequentemente sobre o processo biológico envolvido na produção deste fragmento. Uma vez identificados, estes fragmentos têm potencial para serem utilizados como biomarcadores para resistência ao tratamento.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Desenvolver método baseado na técnica HPLC (HPLC-ICP-MS) de forma a contribuir para a compreensão do mecanismo oncolítico dos compostos de Pt utilizados no tratamento de câncer pela identificação e quantificação de Pt em modelos celulares buscando informação sobre a fração de droga não modificada e biomoléculas derivadas destes compostos;

1.2.2 Específicos

- ✓ Desenvolver método analítico sensível e seletivo para a determinação de Pt por ICP-MS em fluidos biológicos e modelos celulares, após tratamento com compostos antineoplásicos à base de platina;
- ✓ Estudar o metabolismo de drogas à base de Pt em modelos celulares.
- ✓ Desenvolver métodos analíticos sensíveis e seletivos para identificação de espécies de Pt em fluidos biológicos e modelos celulares, após tratamento com compostos antineoplásicos à base de platina;
- ✓ Identificar e otimizar os parâmetros analíticos relativos a determinação instrumental das amostras tratadas por HPLC-UV e HPLC-ICP-MS;
- ✓ Desenvolver uma sistemática para identificação de biomarcadores para determinação da resistência / eficácia do tratamento com drogas à base de platina.

2. Fundamentação teórica

2.1 Algumas características do câncer humano

O que é comumente chamado de *câncer humano* compreende, na realidade, mais de 200 doenças diferentes que, em conjunto, é responsável por, aproximadamente, um quarto das mortes nos Estados Unidos (Siegel, Rebecca, Naishadham, Deepa e Jemal, Ahmedin, 2013). Um em cada três ingleses desenvolverá algum tipo de câncer em seu período de vida (Sasieni *et al.*, 2011) e na Alemanha, com seus 82 milhões de habitantes, mais de 400 mil novos casos são diagnosticados todos os anos com aproximadamente 200 mil óbitos. Como a incidência da maioria dos cânceres cresce com a idade do indivíduo, a tendência desta incidência é de aumento, uma vez que a expectativa de vida continua a subir (Schulz, 2005). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que cerca de 580 mil novos casos da doença sejam reportados em 2014. Os tipos mais comuns de câncer e a previsão de incidência para 2014 no Brasil são: para homens: próstata (70 mil), cólon e reto (15 mil), estômago (13 mil); para mulheres: mama feminina (56 mil), cólon e reto (17 mil), colo do útero (15 mil), traqueia brônquio e pulmão (11 mil) (Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil, 2013).

Os principais tipos de câncer que se apresentam em humanos são os de tecidos epiteliais, chamados carcinomas; os de tecidos conjuntivos, chamados sarcomas; os cânceres do sistema linfático chamados de linfoma; além do de células do sistema imune (leucócitos) chamado leucemia.

Apesar de sua diversidade, os tipos de câncer humanos apresentam diversos aspectos comuns e que os definem como câncer. Tais características são: 1) proliferação descontrolada de células; 2) diferenciação genética; 3) metabolismo alterado; 4) instabilidade genômica; e 5) capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástase) (Schulz, 2005).

Os cânceres são, em geral, hipersensíveis aos estímulos de crescimento¹, por outro lado, eles se tornam independentes destes estímulos externos para continuar crescendo. Ao mesmo tempo, eles são pouco sensíveis aos estímulos de inibição do crescimento. Juntas estas características resultam em uma autonomia de crescimento que caracteriza os cânceres, e estas características tendem a se acentuar na medida em que a doença evolui (Alberts, 2008).

Este comportamento de crescimento do câncer permite que suas células sejam alvejadas por fármacos não específicos, uma vez que, para manter o ritmo aumentado de crescimento e de replicação, as células do tumor possuem um metabolismo muito mais acelerado que o das células normais. Consequentemente, estas células metabolizam uma quantidade maior de fármacos do que as células equivalentes que não sofreram mutação, possibilitando assim que algumas drogas sejam tóxicas às células tumorais sem serem letais para os pacientes (Kroemer e Pouyssegur, 2008).

A capacidade de invasão de outros tecidos e de gerar metástase é o critério definitivo para se discernir um tumor benigno de um tumor maligno. Juntamente com a caquexia² e a supressão do sistema imune, a metástase é a responsável pela maior parte da mortalidade dos cânceres humanos. Na invasão, as células cancerosas crescem em vários pontos e em várias camadas do mesmo tecido e eventualmente extrapolam este tecido passando para os tecidos vizinhos. Isto permite que o tumor cresça de forma praticamente indefinida, o que produz mais rapidamente os efeitos no paciente.

Na metástase, células cancerosas se desprendem do tumor e viajam pela corrente sanguínea ou pelo sistema linfático e aderem em outros órgãos onde formam novos tumores. Entretanto, este processo de aderência em condições favoráveis ao crescimento não ocorre frequentemente, e as células cancerosas ou pequenos grupos de células podem ficar retidos em vasos capilares e sobreviver ali por anos até se adaptar ao novo ambiente e reiniciar seu processo de crescimento descontrolado (Alberts, 2008). Estas células, ou pequenos grupos não podem ser diagnosticados por imagem, mas muitos podem ser identificados por

¹ Crescimento, neste contexto, diz respeito à reprodução celular.

² Caquexia é a perda de apetite, fadiga, fraqueza, associada à perda de massa corpórea que não pode ser revertida através de meios nutricionais, *i. e.* mesmo se o paciente ingere mais calorias, ele continua perdendo massa magra. Em geral é provocada em pacientes de câncer pela demanda do tumor por energia.

biomarcadores presentes na corrente sanguínea (Brenner, Kloor e Pox, 2013). Os órgãos que apresentam maior incidência de metástase são aqueles com sistemas microcapilares extensos como o fígado, o pulmão e os ossos (Schulz, 2005).

2.2 Tratamento para o Câncer

O tratamento a ser indicado para o câncer depende do tipo de tumor, do estágio em que se apresenta e das características e estado de saúde do paciente (Schulz, 2005; Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil, 2013). Em geral uma gama de terapias está disponível, sendo as mais comuns a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia além de combinações destas. Cirurgias e radioterapia são indicadas para cânceres localizados, já as leucemias, linfomas, tumores metastáticos, carcinomas avançados e tumores em tecidos moles requerem quimioterapia.

As abordagens são complementares, uma vez que cada uma apresenta características específicas e os tumores são complexos e diversos. Por exemplo, a aplicação de quimioterapia ou de radioterapia, após um procedimento cirúrgico para combater células que não puderam ser dissecadas, é chamada de tratamento adjuvante. Analogamente, a quimioterapia empregada antes de uma cirurgia com intuito de diminuir o tumor e facilitar sua completa retirada é chamada de terapia neo-adjuvante.

Na quimioterapia, uma grande variedade de drogas pode ser utilizada. Algumas atuam diretamente sobre o câncer, outras atuam melhorando e estabilizando funções do paciente comprometidas pela doença. O componente principal para a maioria dos tratamentos é um agente citotóxico. Neste tipo de terapia, compostos químicos bloqueiam funções celulares básicas como a replicação de DNA ou mitose³ conduzindo estas células à apoptose⁴. As drogas à base de platina são parte importante destes tratamentos. Outro tipo de terapia é conduzido com o uso de “agentes biológicos” que se ligam aos receptores nas células cancerosas que regulam, de forma indireta, a replicação de DNA ou o processo de mitose. Exemplos deste tipo de substância são hormônios e anti-

³ Mitose é o processo de divisão celular dos eucariotos.

⁴ Apoptose é morte celular que ocorre de forma ordenada e demanda energia para a sua execução. Pode ser acionada tanto por mecanismos de controle da homeostase, quanto por danos celulares irreparáveis (como lesão do DNA, por exemplo).

hormônios usados no tratamento de câncer de seio ou de próstata. Outros grupos importantes de agentes biológicos utilizados mais recentemente são as citocinas⁵, os fatores de crescimento, interferons⁶ e interleucinas⁷. Hoje eles são responsáveis por tratamentos de doenças que eram incuráveis há apenas uma década atrás. Alguns atuam diretamente sobre o tumor, outros estimulam o sistema imune a combater as células cancerosas (Schulz, 2005; Alberts, 2008).

2.3 Drogas à base de platina

Desde a descoberta de suas propriedades oncolíticas em meados dos anos 60, a cisplatina tornou-se, inclusive no Brasil, uma droga padrão no tratamento de diversos tipos de tumores, em especial o testicular (Williams e Einhorn, 1980). Apesar das boas respostas obtidas para tumores sólidos como o sarcoma (Rosenberg, Barnett, 1980), o tratamento com a cisplatina é acompanhado de efeitos colaterais severos (danos aos rins, náusea, danos aos ouvidos e ao sistema nervoso periférico), que levaram à investigação de outros compostos de platina que mantivessem a capacidade terapêutica, minimizando os efeitos tóxicos. Entre estes novos compostos estão a carboplatina, a oxaliplatina, a loboplatina e a satraplatina (Weiss e Christian, 1993). Esses compostos apresentam menor toxicidade ao paciente quando comparados com a cisplatina, entretanto, eles são, de forma geral, menos ativos. A carboplatina é o segundo composto platínico autorizado para uso clínico, apresentando excelentes resultados para diversos tipos de tumores, especialmente o câncer de ovário (Calvert *et al.*, 1989; Ozols *et al.*, 2003). A sua atuação é semelhante à da cisplatina, sendo menos tóxica, e apresentando resistência cruzada com a cisplatina, isto é, os tumores resistentes à cisplatina são também resistentes à carboplatina (Go e Adjei, 1999). A oxaliplatina é um complexo platínico de terceira geração, menos tóxico e com atuação distinta da cisplatina (Raymond *et al.*, 1998), sendo atualmente utilizada

⁵ Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes.

⁶ Os interferons são proteínas produzidas por células sob “ataque”, são produzidos pelas células do organismo para defendê-lo de agentes externos como vírus, bactérias e células de tumores.

⁷ As interleucinas são alguns tipos de proteínas produzidas principalmente por células do sistema imune e atuam principalmente na ativação deste contra um agente específico.

como droga de primeira linha no tratamento de carcinoma colo-retal. Na Figura 1 são apresentadas as estruturas das principais drogas à base de platina utilizadas para tratamento do câncer.

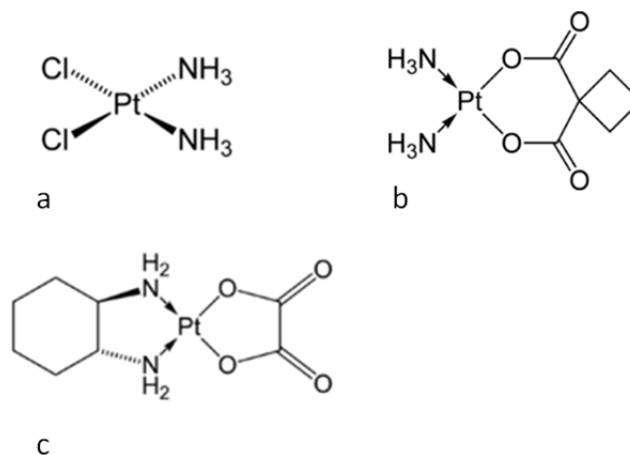


Figura 1: Estruturas dos compostos platínicos mais utilizados com atividade oncolítica. a) cisplatina; b) carboplatina; c) oxaliplatina.

Para explicar os complexos processos de transporte, armazenamento, eliminação e capacidade de interagir com biomoléculas, que determinam o mecanismo de ação citotóxica destas drogas, é preciso entender a reatividade da platina e, conseqüentemente, de seus compostos de coordenação. A platina, não forma íons em meio aquoso tendo apenas água como ligante, mas sim íons complexos envolvendo outros ligantes mais fortes que a água. Tanto os complexos de Pt(II) quanto os de Pt(IV) são importantes em matrizes biológicas. A platina tem uma forte capacidade de ligação com grupos doadores de elétrons como os presentes em aminoácidos e tem a habilidade de formar quelatos (Lee, 1996). No estado de oxidação II, os complexos geralmente são tetra-coordenados e apresentam geometria planar quadrática, uma vez que envolve um sistema de elétrons d^8 . Pode-se destacar, em meio aquoso, os complexos $[PtCl_4]^{2-}$, que tem grande importância na química preparativa e se hidrolisa facilmente em água, formando $[Pt(H_2O)Cl_3]^-$ e $[Pt(H_2O)_2Cl_2]$. Quando a platina está no estado de oxidação IV, complexos hexacoordenados com geometria octaédrica são formados. Em geral, os complexos de platina (II ou IV), apresentam uma elevada estabilidade termodinâmica e uma relativa inércia cinética.

As três drogas à base de platina e comercialmente disponíveis, são na realidade pró-drogas, que somente apresentam a configuração ativa após sua hidrólise, seja no meio extracelular ou meio intracelular. A cinética de ativação das drogas modula sua atividade e seus efeitos colaterais (Desoize e Madoulet, 2002). Deve acrescentar-se que a cisplatina e carboplatina têm uma atividade substancial em células tumorais para sensibilização à radioterapia especialmente em tumores na cabeça e pescoço, pulmão, esôfago, colo do útero, bexiga e no reto (Desoize e Madoulet, 2002).

2.3.1 Cisplatina

A *cis*-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina) foi primeiramente sintetizada em 1844 por Michel Peyrone recebendo o nome de “*Cloreto de Peyrone*”. O composto se apresenta como um pó amarelo com solubilidade em água de 2,53 mg mL⁻¹, a 25°C, e de menos de 1 mg mL⁻¹ a 19°C. A cisplatina é um complexo quadrado planar com dois ligantes cloreto e dois ligantes amino em posição *cis*, como pode ser observado na Figura 1.

Em 1961 Barnett Rosenberg iniciou estudos explorando a exposição de células mitóticas de mamíferos a campos magnéticos. Em testes com a bactéria *Escherichia coli*, ele observou uma diminuição da reprodução celular e o alongamento das bactérias. Rosenberg investigou esta resposta e observou que os eletrodos de platina utilizados se desgastavam com a formação de complexos de platina que eram responsáveis por este efeito nas bactérias. Rosenberg percebeu as possibilidades deste resultado e direcionou sua pesquisa para a busca de um agente antineoplásico, uma vez que estes complexos, ao parar o ciclo celular, poderiam ser de grande valia no tratamento de tumores, considerando que uma das principais características destes é a reprodução descontrolada.

Em 1965 Rosenberg relatou o alongamento da *Escherichia coli* e o associou à presença de metais de transição no meio de cultura (Rosenberg, Vancamp e Krigas, 1965); em 1969 Rosenberg sugeriu um grupo de complexos platínicos como agentes antitumorais, inclusive a cisplatina (Rosenberg *et al.*, 1969). Já em 1971 ele demonstrou a atuação da cisplatina com a drástica redução de um sarcoma implantado em camundongos. Este experimento teve um grande efeito na aceitação da cisplatina como agente antineoplásico (Rosenberg, 1971), e em 1978

a droga já estava aprovada para uso nos Estados Unidos pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uma série de tumores (Rosenberg, B., 1980). Até hoje a cisplatina é utilizada como tratamento de primeira linha contra diversos cânceres e apresenta taxa de cura de até 97% dos casos contra tumores de testículo, por exemplo (Siegel, R., Naishadham, D. e Jemal, A., 2013).

Com a descoberta acidental de Rosenberg, um novo horizonte no tratamento do câncer se abriu. Nenhuma droga (a maioria, compostos orgânicos de origem natural) até então apresentara respostas tão significativas no tratamento da doença. Com os resultados obtidos com a cisplatina, diversos compostos de coordenação contendo platina começaram a ser investigados. O próprio Rosenberg se dedicou a esta busca por anos (Rosenberg, 1973). Além da platina, complexos contendo outros metais como Pd, Au, Fe, Ru (Cutillas *et al.*, 2013), Ir, Mg (Bruijninx e Sadler, 2008), Co e Cu (Gasser e Metzler-Nolte, 2012; Graf e Lippard, 2012) vêm sendo investigados como agentes antineoplásicos. A maioria destes apresentam mecanismos de ação semelhantes ao da cisplatina, porém, alguns apresentam comportamentos bem distintos.

2.3.1.1 Mecanismo de ação

Um entendimento completo dos mecanismos de ação da cisplatina ainda não foi alcançado, e constantemente observam-se dados contraditórios na literatura (Klein e Hambley, 2009). Sem dúvida a cisplatina é a droga à base de platina mais estudada e serve de referência em termos de atividade e princípio farmacológico para as outras drogas de tratamento do câncer. O que se tem praticamente como consenso é que o principal mecanismo responsável pela citotoxicidade da cisplatina é a formação de ligação covalente com o DNA, impedindo a divisão celular e induzindo a célula a apoptose. Entretanto diversas frentes de atuação da droga corroboram para sua eficiência.

A cisplatina é administrada após uma super-hidratação do paciente seguida da administração de diuréticos de modo a diminuir os efeitos nefrotóxicos da droga. Um monitoramento atento do fluxo diurético é obrigatório para o controle da toxicidade, que se configura no maior fator limitante de dose deste fármaco (O'dwyer, Stevenson e Johnson, 2000). Após a aplicação da cisplatina por via intravenosa, devido à concentração de cloreto no plasma sanguíneo, a molécula

não sofre hidrólise e é carregada pelo sangue em sua forma original. Em torno de 90% da cisplatina interage fisicamente com proteínas do plasma como albumina, e o restante é solubilizado. A cisplatina se distribui rapidamente nos órgãos e tecidos, e é encontrada principalmente no fígado e nos rins (O'dwyer, Stevenson e Johnson, 2000). As concentrações plasmáticas da droga decaem rapidamente, sendo a meia vida da platina ultrafiltrável no plasma, isto é, solubilizada em sua forma original, de 20 a 45 min. Aproximadamente 25% do fármaco é excretado na urina nas primeiras 24 h, até 90% é eliminado em até cinco dias e o restante da platina pode ficar retida no organismo por anos.

Muitos estudos têm sido realizados para esclarecer a farmacocinética dos medicamentos à base de platina, mas a maioria deles são baseados na determinação total de Pt. A distribuição espacial de platina em linfócitos de pacientes tratados com cisplatina e em linhas de células cultivadas são quase a mesma: 20% na membrana, de 60% na fracção citosólica, 10% no citoesqueleto e 10% no núcleo (Zayed, Shoeib, *et al.*, 2011).

Enquanto a cisplatina encontra-se no plasma sanguíneo, ela permanece em sua forma original devido à concentração de cloreto neste meio (aproximadamente 100 mmol L^{-1}). Ao atravessar a membrana celular por difusão passiva ou através de transporte ativo auxiliado por proteínas de membrana como as chaperonas de cobre (Blair *et al.*, 2009), a cisplatina encontra um meio com uma concentração de cloreto da ordem de 3 a 20 mmol L^{-1} e sofre hidrólise convertendo-se nas formas mais ativas da droga (Klein e Hambley, 2009; Galluzzi *et al.*, 2012). Na Figura 2 (Klein e Hambley, 2009) estão ilustrados os possíveis produtos de hidrólise que determinarão a atividade da cisplatina no meio celular. Existem evidências de diversas interações das formas ativas da cisplatina com o meio intracelular, podendo-se dividi-las em dois grupos principais, ação no citoplasma e no núcleo.

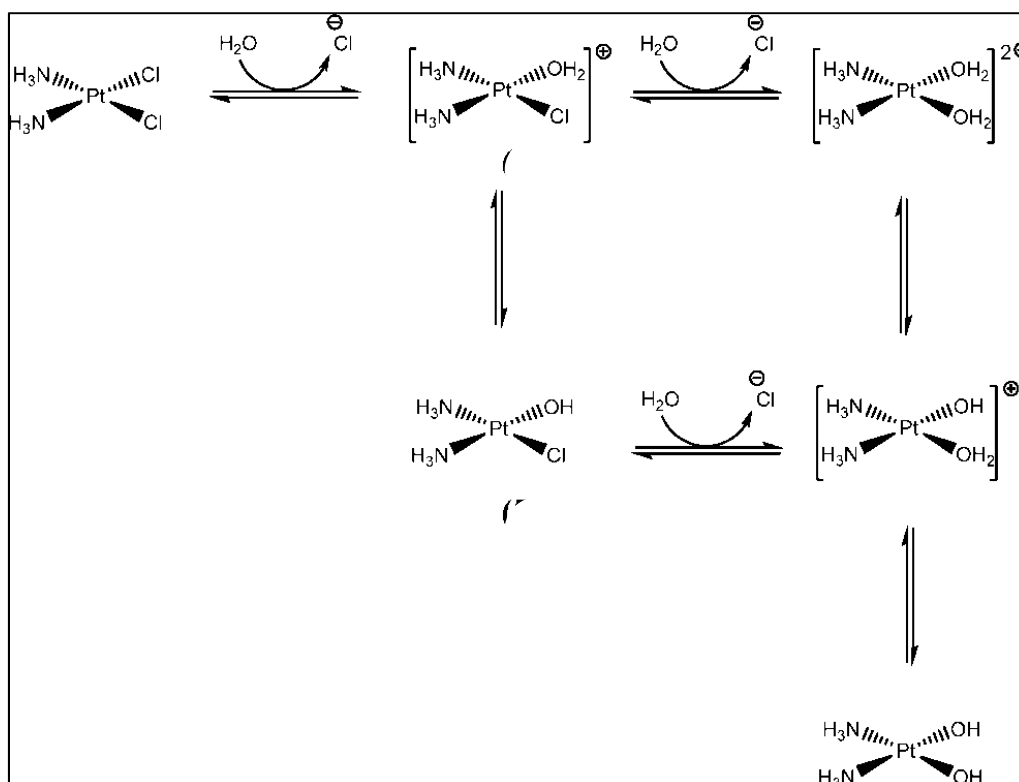


Figura 2: Produtos da hidrólise da cisplatina após cruzar a membrana celular (Klein e Hambley, 2009).

Ao entrar na célula, a cisplatina interage com a membrana plasmática perturbando interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína (Martins *et al.*, 2008). Acredita-se que esta interação pode provocar o recrutamento e ativação da caspase-8⁸ e consequentemente a ativação em cascata das outras caspases conduzindo a célula à apoptose caspase-dependente.

Na fração citoplasmática a cisplatina interage com uma série de espécies nucleofílicas endógenas como a glutathiona reduzida (GSH), metionina, metalotioneínas, além de outras proteínas citoplasmáticas (Barefoot, 2001; Calderon *et al.*, 2003; Finney e O'halloran, 2003; Galluzzi *et al.*, 2012). A ação da cisplatina no citoplasma tem um caráter depletivo de espécies reduzidas, formando um ambiente favorável ao estresse oxidativo, que favorece a atuação da droga no núcleo da célula (Galluzzi *et al.*, 2012), no retículo endoplasmático e na

⁸ Caspase-8 é uma, de um grupo de proteínas codificada pelo gene CASP8. A ativação sequencial das caspases tem um papel central no processo de execução da apoptose celular. O nome "caspase" é derivado dessa função molecular característica: *cysteine-aspartic-acid-proteases*.

mitocôndria. Uma vez que a mitocôndria é atacada por espécies oxidantes, danos a suas macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA mitocondrial (Podratz *et al.*, 2011) induzem a apoptose tanto via caspase quanto por vias independentes de caspase (Martins *et al.*, 2008), (Pabla e Dong, 2008). Na Figura 3 são apresentados os mecanismos de ação não nucleares da cisplatina. Ainda na fração citoplasmática da célula, a cisplatina interage com RNA (Hostetter, Osborn e Derose, 2012), comprometendo a sinalização celular e a expressão gênica.

Considerando o que se conhece até hoje, estes são os principais mecanismos citotóxicos da cisplatina exercidos na fração citoplasmática da célula. Todas as outras interações da droga no citoplasma são consideradas como fontes de resistência, isto é, diminuem a concentração da cisplatina no citoplasma disponível para induzir a apoptose, e serão discutidas mais adiante.

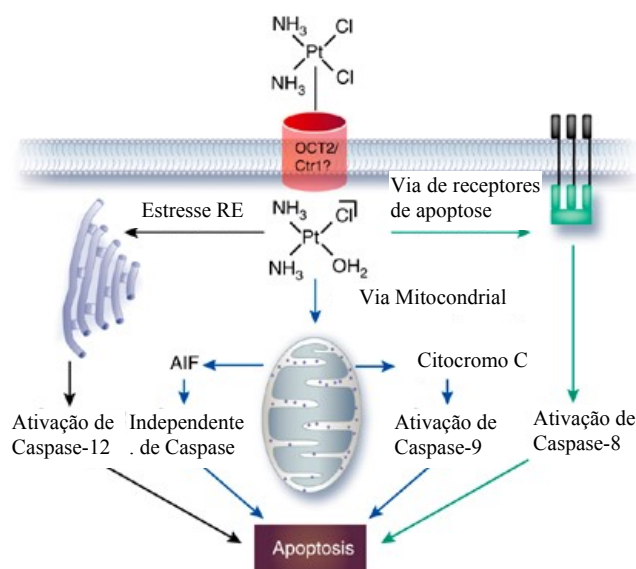


Figura 3: Ação da cisplatina na fração não nuclear da célula (Adaptado de Pabla e Dong, 2008)

No núcleo da célula, a cisplatina se liga ao DNA alterando sua estrutura e impedindo a replicação celular. Na Figura 4 é ilustrada a estrutura do DNA após a ligação da cisplatina (Pabla e Dong, 2008). Os estudos estruturais que determinaram a estrutura dos adutos de Pt-DNA foram conduzidos por difração de raios-x, e por espectroscopia de ressonância nuclear magnética, além de diversos estudos com simulação computacional. Entretanto, todos estes estudos foram feitos com o DNA isolado, purificado e fora de sua estrutura de cromatina, na qual

se encontra no meio celular, logo as conclusões quanto à estrutura não apresentam uma correlação adequada com a configuração real da molécula em meio celular ou com a resposta fisiológica induzida pela droga. Durante muitos anos se acreditou que este era o mecanismo de ação da cisplatina, entretanto, pesquisas mais recentes vêm elucidando, de forma mais clara e realista, o intrincado mecanismo de ação da droga.

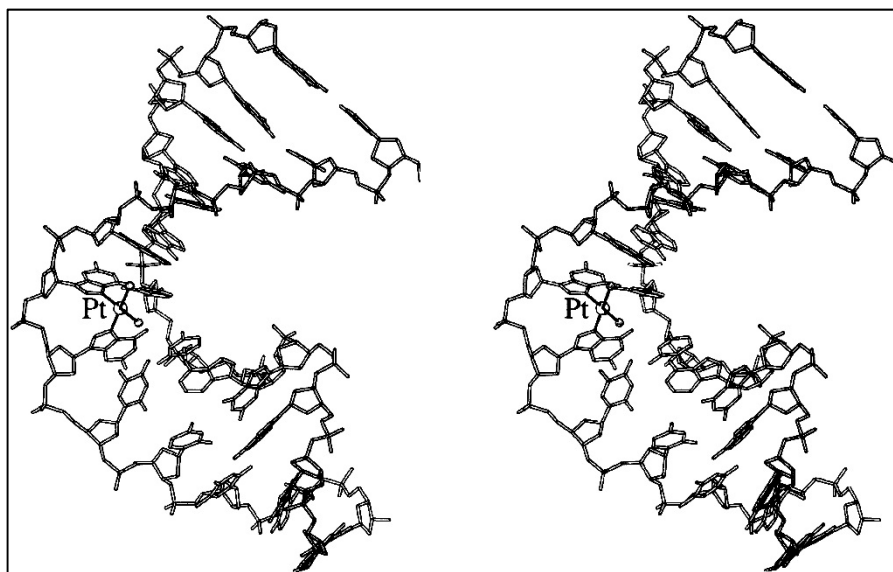
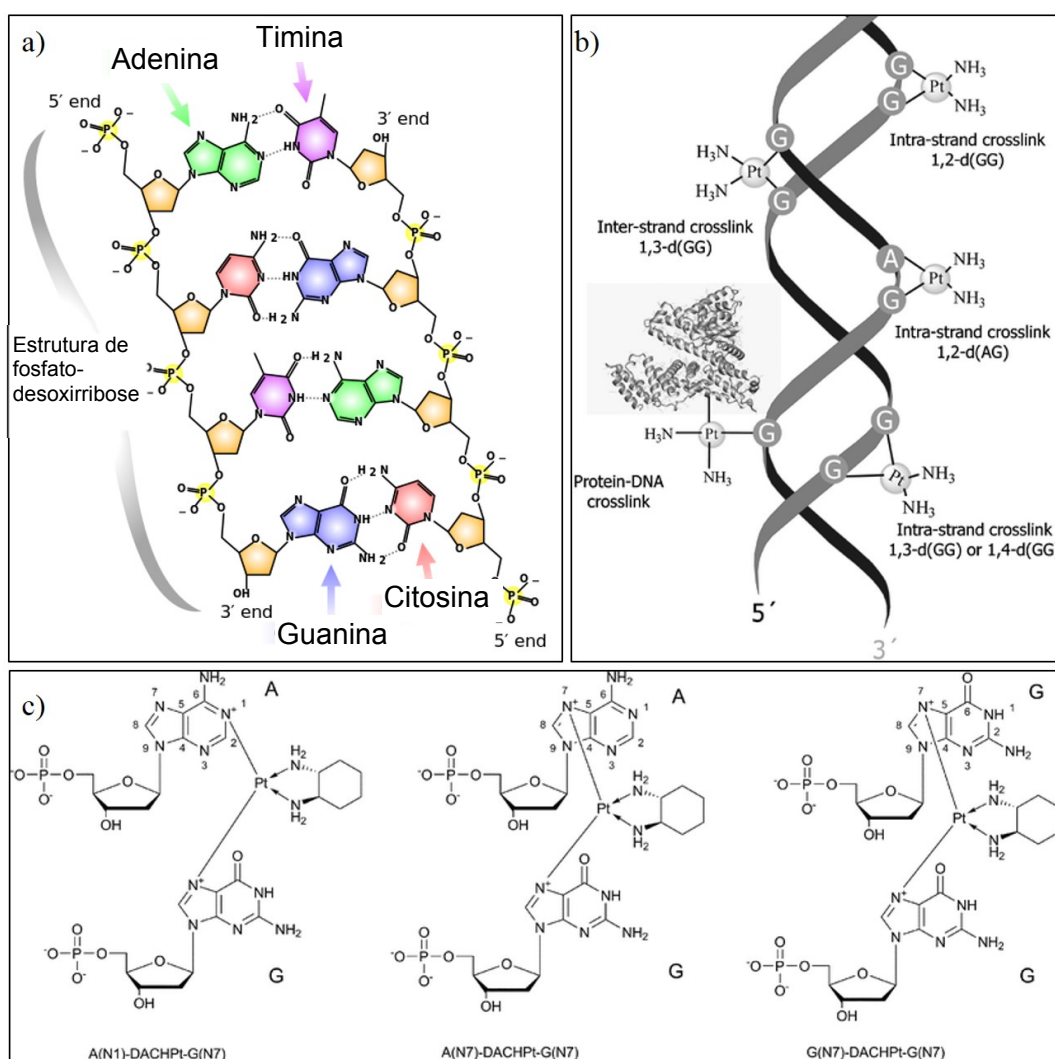


Figura 4: Estrutura do DNA após ligação da cisplatina (adaptado de Gelasco e Lippard, 1998).

Cerca de 1% da cisplatina total absorvida pela célula encontra-se ligada ao DNA nuclear (Gonzalez *et al.*, 2001) A cisplatina interage com o DNA formando uma série de adutos, ligando-se preferencialmente à posição N7 das bases purínicas (adenina e guanina), podendo formar adutos duplos, com ligações em uma única fita ou entre as fitas de DNA. A cisplatina pode ainda formar adutos simples com bases de DNA ou ainda adutos de proteína-DNA. Na Figura 5-b observa-se a representação de alguns desses adutos.

O aduto majoritário é o *cis*-1, 2, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -d(GpG) intrafita, que responde por 65% do total de adutos formados. O segundo mais abundante é o *cis*-1, 2, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -d(ApG) intrafita que responde por 25% dos adutos formados enquanto que entre 5 e 10% dos adutos são *cis*-1, 3, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -d(GpNpG) também intrafita, com uma frequência menor encontra-se os adutos interfita (Todd e Lippard, 2009).

As lesões causadas ao DNA pela cisplatina ativam uma série de mecanismos de reparo, sendo o que envolve o sistema de reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é o que constitui a mais importante via de retiradas de adutos da fita de DNA. Entretanto, mecanismos de reparo de erro de pareamento (MMR) também participam da remoção dos adutos de platina da fita de DNA. Quando as lesões são limitadas, a cisplatina induz uma parada do ciclo celular aprisionando a célula em S ou G2⁹, permitindo ao sistema de reparo reestabelecer a integridade do DNA. Se o dano ao DNA é muito extenso, ou seja, quando não pode ser reparado, a célula evolui para a morte por apoptose ou, dependendo da dose de cisplatina, por necrose.



⁹ G1, S e G2 indicam o estado de uma célula em relação à mitose. As células em G1 estão com seu conteúdo de DNA normal, S indica um estado onde a célula iniciou o processo de duplicação de seu conteúdo genético; e G2 é o estado em que todo o DNA da célula já se encontra duplicado, faltando a essa dividir-se em duas novas células filhas.

Figura 5: a) Modelo da estrutura do DNA evidenciando sítios de ligação preferenciais; b) adutos mais recorrentes da ligação da cisplatina com DNA (Esteban-Fernandez *et al.*, 2010); c) modelo de estrutura química de adutos formados pela oxaliplatina, análogos aos formados pela cisplatina (Zayed, Jones, *et al.*, 2011).

A cascata de sinalização mais importante, que liga a lesão ao DNA causada pela cisplatina à morte celular por apoptose, envolve a ativação em sequência de uma série de proteínas no núcleo e no citoplasma. O processo se inicia por ativação de proteínas que “percebem” e sinalizam o dano presente no DNA, como a *checkpoint kinase 1* (CHEK 1), e por sua vez fosforila a proteína supressora de tumor TP53 (Shieh *et al.*, 2000; Appella e Anderson, 2001; Zhao e Piwnicka-Worms, 2001). Uma vez ativada a TP53 dispara uma série de funções letais no núcleo e no citoplasma que culminam com a apoptose da célula. Além deste mecanismo, diversos outros vem sendo reportados e estudados, entretanto, descrevê-los está além do escopo deste trabalho (Wang *et al.*, 2006; Pabla e Dong, 2008; Galluzzi *et al.*, 2011).

2.3.1.2 Efeitos Colaterais

Entre os efeitos colaterais mais comuns da administração de cisplatina estão os efeitos emetogênicos¹⁰, ototoxicidade, anemia e nefrotoxicidade (O'dwyer, Stevenson e Johnson, 2000).

Os efeitos emetogênicos podem ser muito severos e comprometer o andamento do tratamento com cisplatina. Em geral esses efeitos indesejados são tratados com drogas que atuam no sistema nervoso central, como serotonina ou antagonistas 5-HT₃ como o ondansetron (Eisenberg *et al.*, 2003).

A nefrotoxicidade é, certamente, a maior preocupação em relação à administração da cisplatina. A afinidade desses compostos pelas células renais, e sua alta citotoxicidade culminam na indução de apoptose e também de necrose das células renais, comprometendo os tecidos e a função do órgão de forma reversível ou permanente. A nefrotoxicidade é o mais importante dos fatores limitantes da dose administrada de cisplatina. A disfunção renal induzida pela droga se manifesta clinicamente por insuficiência renal, hipocalemia e hipomagnesemia.

¹⁰ Emetogênicos *i.e.* provocam intensa irritabilidade no trato gastrointestinal, induzindo o reflexo do vômito de forma intensa e difícil de controlar.

Os riscos destes efeitos colaterais são dose-dependentes e podem ser minimizados com uma hidratação intensiva antes e durante a infusão da cisplatina (O'dwyer, Stevenson e Johnson, 2000; Pabla e Dong, 2008). O principal mecanismo de ação nefrotóxica da cisplatina parece estar relacionado com a indução das células epiteliais do túbulo proximal à apoptose, conduzindo a um quadro clínico descrito como necrose tubular aguda. A cisplatina induz apoptose nestas células, principalmente por via mitocondrial. Medicamentos capazes de proteger a mitocôndria das células epiteliais dos túbulos proximais se apresentam como promissores adjuvantes no tratamento de diversos tumores, possibilitando o aumento das doses ministradas de cisplatina (Pabla e Dong, 2008; Podratz *et al.*, 2011).

Alguns efeitos colaterais dos compostos platínicos estão relacionados a interações com biomoléculas ainda no sangue, sendo que os estudos dos possíveis compostos formados, sua estrutura e cinética de formação, podem ajudar a entendê-los e posteriormente evitá-los. Estudos recentes começam a elucidar as estrutura de biomoléculas formadas com a cisplatina ainda no sangue e que transportam o medicamento até as células (Huang *et al.*, 1995). Compostos com grupos tiol, como a L-metionina, a L-cisteína e GSH reagem com as drogas à base de platina administradas a pacientes e existem evidências de que a nefrotoxicidade da cisplatina é aumentada na presença de L-metionina. Mais recentemente o espectro de biocompostos de interesse tem sido delimitado e tanto a estrutura de proteínas ligadas à platina quanto de adutos de DNA tem sido indicados como os mais ativos, tanto na ação oncolítica quanto nos efeitos colaterais (Takahara *et al.*, 1995; Teuben *et al.*, 1999; Kelland, 2000; Timerbaev, Kung e Keppler, 2002; Mcsheehy, S. *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2010).

2.3.1.3 Resistência à Cisplatina

A base da resistência a cisplatina pode ser descrita seguindo o modo de ação molecular da droga, que envolve vários passos até a resposta da célula tumoral. Processos celulares que impedem a apoptose mitocondrial, ou que os danos

causados ao DNA evoluam para apoptose induzida por p53¹¹ (Jamieson *et al.*, 1999; Cohen e Lippard, 2001) são os principais fatores que prejudicam a eficiência da cisplatina, levando a uma má resposta do tratamento. Uma melhor compreensão do mecanismo pelo qual estas moléculas são reguladas, bem como de seus papéis na sensibilidade e na resistência à droga são necessárias e ainda não estão bem estabelecidas na literatura.

Várias moléculas estão envolvidas na resistência à cisplatina, a proteína 1 de ligação ao domínio metil-CpG (MBD1), que desempenha um papel importante na progressão da doença, é uma delas. Esta proteína é recrutada para locais de danos ao DNA induzidos por cisplatina e atua no reparo do material genético da célula, conferindo a esta uma maior resistência ao fármaco. Assim, o silenciamento da expressão da MBD1 prejudica a resposta do sistema de verificação de danos ao DNA, e, conseqüentemente, reduz significativamente a capacidade da célula de reparar o DNA (Xu *et al.*, 2013).

Outro modulador da atividade da cisplatina é a proteína *Jun activating binding protein* (Jab1), uma proteína multifuncional que participa no controle da proliferação das células e na estabilidade de várias proteínas e desempenha um importante papel na resposta celular à cisplatina e a irradiação através do controle de danos ao DNA e rotas de reparo (Pan *et al.*, 2013). A Jab1 regula positivamente a expressão da Rad51¹² por via dependente de p53. O aumento da expressão ectópica¹³ de Rad51 confere resistência celular à cisplatina, à radiação infravermelha e ao UV em células deficientes de Jab1. Pan *et al.* demonstraram que a Jab1 é superexpressa em duas linhagens celulares de carcinoma de nasofaringe relativamente resistentes à cisplatina, radiação infravermelha e UV.

Fatores de transcrição FOXO, funcionando ao longo da cascata de sinalização PI3K-AKT-PTEN(PKB), são essenciais para a proliferação celular, diferenciação, reparação de danos ao DNA e apoptose (Kwok *et al.*, 2010). Pesquisas recentes indicam que o fator de transcrição relacionado FOXM1 é um alvo direto da repressão por proteínas FOXO. A inativação da FOXO ou sobre expressão de FOXM1 está associada com tumorigênese e progressão do câncer. Além disso, os

¹¹ Quando a cisplatina provoca um dano que não pode ser reparado a proteína p53 inicia a cascata de reações que culminam na apoptose celular.

¹² Rad51 é uma proteína que assiste no reparo de quebras nas duas fitas do DNA.

¹³ Expressão ectópica é a expressão, num organismo, de um gene numa localização em que normalmente ela não acontece.

efeitos citostáticos e citotóxicos de um vasto espectro de drogas antineoplásicas, tais como paclitaxel, doxorrubicina, lapatinib, gefitinib, imatinib e cisplatina, são mediadas através da ativação de FOXO3a e/ou a inibição de seu alvo metabólico, a proteína FOXM1. Paradoxalmente, proteínas FOXO também contribuem para a resistência aos medicamentos, por influir na expressão de genes importantes para o efluxo de drogas, bem como a reparação do DNA e os meios de sobrevivência celular em cânceres (Kwok *et al.*, 2010) resistente a drogas.

Outro mecanismo presente em células resistentes à cisplatina é a redução da acumulação intracelular de drogas à base de platina em sua forma ativa. Isto pode resultar da redução da absorção da droga, do aumento do efluxo de drogas ou do sequestro intracelular. Embora um dos mecanismos de captação de cisplatina seja mediado pela proteína transportadora de cobre CTR1, o efluxo é realizada por dois outros canais de escoamento de cobre: as adenosina-trifosfatases tipo p (ATP7A e ATP7B). Samimi *et al.* descreveu que as alterações na expressão destas proteínas têm sido implicadas na resistência à cisplatina e a baixos índices de sobrevivência de pacientes, em alguns tipos de câncer, mais notavelmente no câncer de ovário (Samimi *et al.*, 2003). A chaperona ATOX1 foi recentemente descrita como o transportador que conduz a Pt da CTR1 para ATP7B. A Pt parece competir com a GSH na interação com essa proteína. Adutos estáveis de ATOX1-Pt foram recentemente observados (Galliani *et al.*, 2014).

Outro sistema de efluxo importante, cMOAT/MRP2, têm sua expressão aumentada nas células tumorais. Vários trabalhos demonstraram que este transportador de membrana pode contribuir para a resistência à cisplatina (Xie *et al.*, 2010). MRP2 requer GSH como um cofator, e o seu papel na proteção contra os efeitos citotóxicos da cisplatina pode ser um resultado da sua capacidade para o transporte de conjugados de GSH/cisplatina através da membrana plasmática (Tonigold *et al.*, 2014). GSH pode trabalhar em conjunto com a cMOAT/MRP2 para bombear conjugados de GSH-cisplatina para fora das células de uma maneira dependente de ATP. A resistência à cisplatina através deste mecanismo é completamente dependente de GSH (Arner *et al.*, 2001). De fato, o aumento dos níveis de GSH intracelular são frequentemente observados em tumores resistentes à cisplatina (Singh, Okamura e Ali-Osman, 2010).

Além dos mecanismos de efluxo descritos anteriormente as células também dispõe da P-glicoproteína 1 (Pgp), esta é uma importante proteína de membrana

celular que bombeia muitas substâncias estranhas para fora das células, isto é, uma bomba de efluxo dependente de ATP que atua sobre um amplo espectro de substratos (Aller *et al.*, 2009). A Pgp é uma glicoproteína que, em humanos, é codificada pelo gene ABCB1. A atividade da Pgp sobre a cisplatina não está completamente elucidada, sabe-se que a cisplatina induz um aumento na expressão de Pgp, entretanto a cisplatina não é substrato para a bomba de efluxo, isto é, a proteína transmembrana não é capaz de transportar a cisplatina para fora da célula diretamente. Entretanto observa-se, em células com uma maior expressão da Pgp uma maior resistência à cisplatina.

A capacidade das drogas à base de platina, e também de outros fármacos, para formar ligações com os grupos tiol, os tornam adequados para formar ligações com metalotioneínas (MTs), que são proteínas intracelulares, que contêm a maior quantidade de grupos tiol no citoplasma. O aumento do nível de MT é um mecanismo de resistência a esta classe de medicamentos, uma vez que a ligação da droga à MT, ainda na fração citoplasmática, impede as moléculas ativas de cisplatina de alcançar o seu alvo: o DNA intranuclear das células tumorais (Gumulec, Balvan, *et al.*, 2014; Gumulec, Raudenska, *et al.*, 2014).

A *excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) é uma componente chave da maquinaria de reparo de DNA através da excisão de nucleotídeos (NER). A expressão desta proteína se apresenta marcadamente mais elevada em diversas linhagens tumorais resistentes à cisplatina (Bauman *et al.*, 2013; Ozdemir *et al.*, 2013; Muallem, Braicu, *et al.*, 2014; Muallem, Marnitz, *et al.*, 2014; Torii *et al.*, 2014). A ação da ERCC1 produz fragmentos de DNA de cadeia simples (de cerca de 30 nucleotídeos) contendo o aduto de Pt e proteínas do sistema NER ligadas. DNA polimerases e ligases preenchem a lacuna deixada na fita de DNA, utilizando a fita complementar remanescente como um molde (Friedberg, 2001).

2.3.2 Carboplatina

A *cis*-diammina (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platina(II), comumente chamada de carboplatina, é um análogo da cisplatina desenvolvida pela Bristol-Myers Squibb com a colaboração de um número de oncologistas e institutos acadêmicos. A droga foi introduzida em testes clínicos em 1981 e foi aprovada

pelo FDA para uso em 1989 (Go e Adjei, 1999). Após uma extensa triagem pré-clínica que envolveu um grande número de derivados de platina, a carboplatina foi escolhida principalmente por causa de sua menor toxicidade em comparação com a cisplatina (Lebwohl e Canetta, 1998). Infelizmente, ela apresenta resistência cruzada com a cisplatina. O limitante da dose é a mielossupressão¹⁴ provocada pela administração da carboplatina. A trombocitopenia¹⁵ é o efeito colateral predominante (Go e Adjei, 1999; O'dwyer, Stevenson e Johnson, 2000).

A carboplatina foi amplamente testada em um grande número de ensaios clínicos aleatórios, avaliando-se sua eficácia em comparação à cisplatina. A sua atividade anti-tumoral foi demonstrada contra o câncer de ovário. Uma meta-análise de 11 ensaios clínicos, que inclui mais de 2.000 pacientes, não indicou superioridade de carboplatina sobre a cisplatina (**Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group**, 1991). A combinação de carboplatina com o paclitaxel¹⁶ é de grande interesse, uma vez que a toxicidade desta é reduzida. Esta combinação é utilizada nomeadamente em cânceres do ovário, cabeça e pescoço e bexiga, e em NSCLC¹⁷ (Lokich e Anderson, 1998).

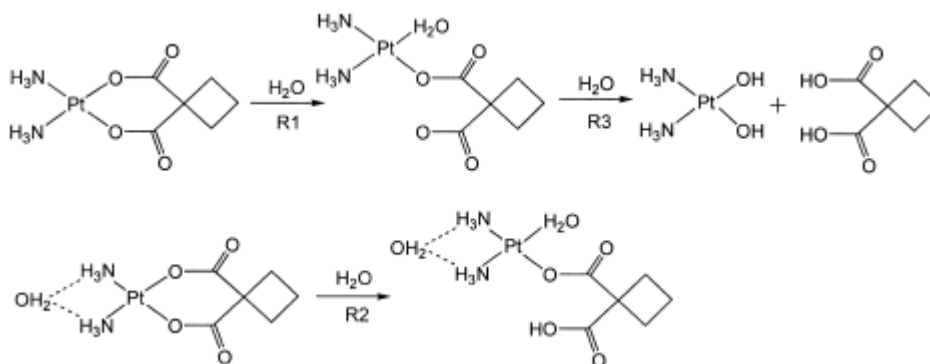


Figura 6: Produtos de hidrólise da carboplatina em meio aquoso (adaptado de (Pavelka, Lucas e Russo, 2007).

¹⁴ Mielossupressão é a diminuição da produção de células sanguíneas pela medula óssea.

¹⁵ Trombocitopenia é a redução do número de plaquetas no sangue, deixando o paciente mais suscetível a hemorragias.

¹⁶ Paclitaxel é um inibidor de mitose utilizado em regimes de quimioterapia combinado com outras drogas.

¹⁷ NSCLC é a sigla em inglês para *Non Small Cell Lung Cancer*.

Na prática, a carboplatina substitui a cisplatina em diversas indicações. A dose é tipicamente calculada com relação à área da superfície corporal do paciente, com uma dose média de 400 mg m^{-2} , em comparação com 100 mg m^{-2} para a cisplatina. Além da sua eficácia e toxicidade inferior, o regime de administração utilizado, com uma única infusão rápida, é mais prático do que a infusão prolongada típico da administração de cisplatina. (Desoize e Madoulet, 2002).

A carboplatina apresenta um ligante abandonador mais estável que os cloretos da cisplatina, o grupo carboxilato, que confere à droga menor toxicidade, porém também uma menor atividade.

2.3.3 Oxaliplatina

A trans-L-diaminociclohexano-oxalato platina(II), comumente chamada de oxaliplatina foi sintetizada por Kidani na Universidade de Nagoya, Japão e foi desenvolvida primeiramente na França, com o apoio dos Laboratórios Roger Bellon, Debiopharm e Sanofi-Synthelabo. Esta droga foi selecionada para o desenvolvimento, pois apresentou uma maior eficácia e uma menor toxicidade do que a cisplatina em estudos pré-clínicos *in vivo* e, o mais importante, não apresentou resistência cruzada com a cisplatina.

O efeito colateral mais proeminente e que limita a dose é a neuropatia sensorial significativa, que não pode ser prevista. No início do processo de desenvolvimento do medicamento, Levi e colegas relataram a superioridade da cronomodulação¹⁸ de perfusões sobre a infusão a velocidade constante nos estudos pré-clínicos e clínicos com oxaliplatina (Boughattas *et al.*, 1989; Caussanel *et al.*, 1990; Levi *et al.*, 2000). Este modo particular de administração resultou numa toxicidade diferenciada. Para regimes de infusão com velocidade constante, observou-se estomatite nos pacientes com maior frequência. Em contraste, para regimes de infusão com cronomodulação, os sintomas observados com maior frequência foram emese e neuropatia sensorial.

A oxaliplatina apresentou resultados interessantes em cânceres de ovário, de mama, câncer de cabeça e pescoço, no linfoma não-Hodgkin, melanoma maligno,

¹⁸ Cronomodulação é variação da velocidade de infusão da droga ao longo de um determinado período.

glioblastoma e NSCLC. A sua eficácia é mais notável contra o câncer resistente a outros derivados de platina. Os melhores resultados até agora têm sido obtidos no tratamento de câncer colo-retal. Além disso, uma sinergia significativa foi observada com leucovorina e fluorouracilo e produz uma taxa de resposta impressionante (De Gramont *et al.*, 1997; Maindrault-Goebel *et al.*, 1999).

A oxaliplatina apresenta um mecanismo de hidrólise particular e o produto final é significativamente diferente do da cisplatina e da carboplatina. A oxaliplatina é menos estável mesmo em concentrações de cloreto mais elevadas como as do plasma sanguíneo. Nesse ambiente, a droga sofre hidrólise espontânea ao entrar em meio biológico aquoso, liberando o grupamento oxalato e mantendo o diaminociclohexano (DACH). A espécie predominante é $\text{Pt}(\text{DACH})\text{Cl}_2$ (Jerremalm *et al.*, 2004). O grupo oxalato pode ser substituído por espécies nucleofílicas como Cl^- , HCO_3^- e mesmo H_2O . Na Figura 7 são apresentadas as espécies mais abundantes em meio aquoso.

A oxaliplatina interage de forma irreversível com os eritrócitos, e apenas 5% da droga injetada fica disponível para entrar na célula. A quantidade de adutos formados é menor que os formados pela cisplatina em doses equivalentes, entretanto o caráter mais hidrofóbico do grupo DACH parece dificultar o reparo dos adutos, tornando a droga mais eficiente (Esteban-Fernández *et al.*, 2010).

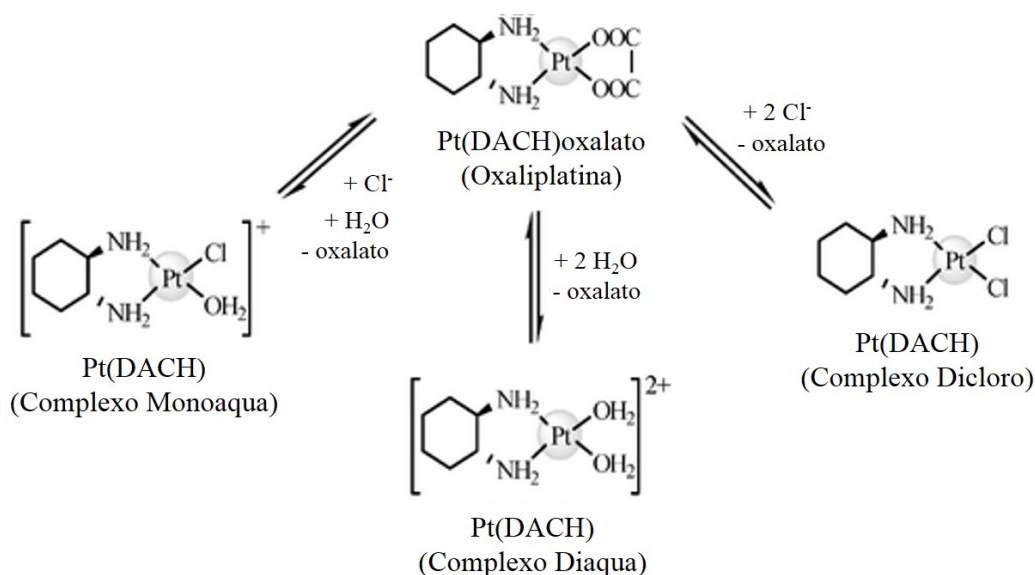


Figura 7: Produtos de hidrólise da oxaliplatina.

Foi demonstrado que a oxaliplatina atua de forma semelhante às drogas análogas cisplatina e carboplatina. A oxaliplatina também exerce seu efeito citotóxico através da formação de adutos de DNA, Zayed *et al.* demonstraram que os adutos formados mais abundantes são G –Pt (DACH) –G, G –Pt (DACH) –A (Zayed, Jones, *et al.*, 2011). Entretanto, a eficiência da oxaliplatina não apresenta correlação com a atividade de GSH ou da glutathione S transferase (GST)¹⁹ (Arnould *et al.*, 2003).

2.4 Determinação de biomoléculas contendo metais: Metalômica.

No decorrer do processo evolutivo, minerais e íons disponíveis na crosta terrestre foram inseridos em processos biológicos fundamentais de todos os seres vivos. Diversos metais participam de processos fisiológicos, sendo que alguns íons metálicos, quando associados a polipeptídeos, podem catalisar reações químicas únicas e atuar em funções fisiológicas específicas. Nos sistemas celulares, os metais atuam como ativadores de proteínas, equilibram forças eletrostáticas, catalisam reações, etc. Assim, a vida está associada aos elementos majoritários e a elementos-traço, além dos elementos típicos das substâncias orgânicas C, H, O, N, P e S. Por outro lado, elementos como Hg, Pb e As, entre outros, podem provocar danos significativos a sistemas biológicos mesmo em baixíssimas concentrações (Calderón *et al.*, 2003).

Neste contexto, os sistemas vivos possuem mecanismos para regulação das concentrações dos elementos essenciais e, ao mesmo tempo, mecanismos de defesa contra elementos cujo efeito acima de uma dada concentração é tóxico. Elementos como Na, K, Ca e Fe desempenham papéis vitais na maioria dos organismos e estão presentes em concentrações bastante altas, ao mesmo tempo elementos como Co, presentes em níveis da ordem de ng kg^{-1} também se apresentam essenciais para a vida. A bioquímica dos elementos majoritários já é bem compreendida e descrita, entretanto ainda se sabe pouco sobre o efeito dos

¹⁹ GST é uma família de enzimas que catalisa a ligação da glutathione à moléculas tóxicas para a célula, como a cisplatina por exemplo. Estas moléculas ligadas a GSH então são reconhecidas pelas bombas de efluxo Pgp e removidas do interior da célula.

metais encontrados em baixas concentrações associados a biomoléculas. Para um melhor entendimento neste campo é necessário um profundo entendimento da química e da biologia envolvida, pois estudos meramente químicos podem conduzir a conclusões irreais em sistemas biológicos (Metallomics: whence and whither, 2012).

A metalômica se apresenta como uma abordagem para estudar elementos em sistemas biológicos, correlacionando as espécies presentes e suas funções. A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define metaloma como a “totalidade das espécies de um metal/metaloide presentes em um sistema biológico definido quanto à sua identidade e/ou concentração”. Já a metalômica é definida como “o estudo do metaloma, interações e conexões funcionais de um elemento e suas espécies com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas em sistemas biológicos” (Lobinski *et al.*, 2010).

No contexto biológico, tornou-se claro que a determinação do conteúdo total de um dado elemento não é suficiente, é necessário conhecer, além do conteúdo total do elemento, sua distribuição nas diferentes formas químicas em que se apresentam (especiação), distribuição esta que irá determinar, por exemplo, sua biodisponibilidade, toxicidade, etc. (Caruso *et al.*, 2003).

2.4.1 Análise de especiação

Para a completa aplicação da Metalômica, os métodos de análise química devem ser capazes de determinar as diferentes espécies presentes nos sistemas biológicos. Para tanto, a análise de especiação deve proporcionar: 1) limites de detecção ainda menores que análise de quantidades-traço totais, pois a parte é sempre menor do que o todo; 2) capacidade de separação das espécies, uma vez que cada espécie participa de forma única nos sistemas biológicos; 3) pré-tratamento “suave” de amostras, pois esta etapa não pode modificar a identidade química das espécies (Michalke, 2003). Todo o conhecimento acumulado relativo à análise de traços passa a necessitar de uma revisão, uma vez que, por exemplo, procedimentos de preservação de analitos em quantidades-traço para a determinação do conteúdo total geralmente não são aplicáveis quando da especiação.

Dentre os métodos para determinação de analitos em quantidades-traço e de análise de especiação, de longe, os mais frequentes são os que se utilizam da espectrometria atômica para detecção seletiva de elementos. Entretanto, não resta dúvida que os avanços mais impressionantes em termos de capacidade de detecção associam-se às técnicas de massa cuja principal vantagem é associar limites de detecção instrumentais extremamente baixos, rapidez, possibilidade de discriminação isotópica e modos multi-elementares de análise (Heumann, 2004). A detecção por espectrometria de massa é facilmente acoplável a técnicas de separação (eletroforese capilar, CG e, principalmente, no presente caso, HPLC), permitindo a fácil hifenação em linha, dado que a vazão de saída da fase móvel é compatível com a vazão de entrada da amostra no espectrômetro. Técnicas hifenadas como HPLC-ICP-MS e LC-MS têm sido muito utilizadas na análise de especiação (Szpunar *et al.*, 1999; Kelland, 2000; Timerbaev, Kung e Keppler, 2002; Mcsheehy, Shona *et al.*, 2003; Rogers, Ray e Hieftje, 2010), aplicando-se diversas técnicas de separação por diferença de tamanho (SEC), troca aniônica, fase reversa, pareamento iônico, entre outras (Esteban-Fernández *et al.*, 2010; Hann *et al.*, 2010). Nas suas primeiras versões, interferências espectrais (espectro de massa) de espécies poliatômicas eram mais frequentes. Entretanto, a melhor resolução de massa dos analisadores quadrupolares comerciais (os mais populares) aliada à introdução de células de colisão ou reação, em muito diminuíram este problema, permitindo a análise de amostras mais complexas. O ICP-MS conta ainda com a possibilidade de calibrações por diluição isotópica, um método de quantificação considerado absoluto (Sanz-Medel, Montes-Bayon e Luisa Fernandez Sanchez, 2003).

Para a análise de especiação a diluição isotópica pode ser utilizada de duas formas particulares, com fortificação com a espécie específica ou com uma espécie não específica (Koellensperger *et al.*, 2008). No primeiro caso, a molécula que se quer quantificar deve ser sintetizada utilizando o elemento enriquecido, tornando possível a co-eluição de ambos, o analito na fração fortificada e o analito originalmente presente na amostra. Neste caso, o método pode ser considerado como primário, de mais alta qualidade metrológica. No segundo caso a calibração por diluição isotópica requer correções no processo de detecção que podem comprometer a qualidade dos resultados (Herrmann *et al.*, 1994). Mesmo vários anos após as primeiras publicações sobre especiação utilizando a diluição

isotópica, a calibração espécie não específica é muito mais comum e aplicável, uma vez que há fornecedores comerciais de material enriquecido isotopicamente para a maioria dos elementos, enquanto padrões moleculares marcados isotopicamente são raros de se encontrar comercialmente e difíceis de se sintetizar nos próprios laboratórios de pesquisa (Rodríguez-González e García Alonso, 2010).

Na análise de especiação, a confiabilidade das análises deve ser avaliada com as mesmas ferramentas de validação típicas dos métodos de análise química. O emprego de controles, padrões internos e avaliação com materiais de referência certificados é fundamental para a demonstração da adequação dos métodos ao uso proposto. Entretanto, ainda são poucos os materiais de referência com certificação para diferentes espécies, e às vezes, a própria padronização é questionável, dado o desconhecimento da forma exata em que se apresenta o elemento, isto entre outras situações análogas (Caruso *et al.*, 2003; Michalke, 2003) ainda impõe uma grande incerteza associada a estas medições, suscitando diferentes conclusões e divergências entre grupos de pesquisa.

Os avanços recentes da metalômica e da análise de especiação são notáveis. Diversos regulamentos técnicos e legislações já contemplam a determinação de espécies de As, Se e Cr. A aplicação da especiação aos compostos de platina, considerando sua ampla utilização no tratamento do câncer, é condição obrigatória para se contribuir com a elucidação dos mecanismos de ação e resistência dessa classe de fármacos. Frente à diversidade dos mecanismos envolvidos e à dificuldade dos processos biológicos a serem compreendidos, poucos estudos foram realizados. Mesmo os estudos *in vitro* realizados com material biológico não são totalmente representativos, e a falta de estudos *in vivo* ainda é uma das maiores dificuldades para o entendimento deste problema (Esteban-Fernández *et al.*, 2010).

2.5 Células como Modelos Biológicos

A utilização de células como modelo é uma técnica de pesquisa bem estabelecida. Através de modelos celulares, por exemplo, pode-se estudar reações que ocorrem nas células alvo de um tratamento com um fármaco citotóxico. Esta abordagem é extremamente vantajosa, pois culturas de células são rapidamente

renovadas assim como diversos estudos podem ser conduzidos simultaneamente. A desvantagem é que não se pode observar o comportamento sistêmico dos fármacos ou das próprias células em seu ambiente natural, uma vez que a vizinhança influencia o metabolismo celular, a ausência da matriz extracelular real pode introduzir erro sistemático nos resultados. No entanto, como um modelo inicial, esta é uma abordagem largamente empregada e útil.

A cultura de células envolve a manutenção destas em um ambiente que se aproxime das condições naturais, provendo nutrientes, estabilidade térmica e espaço físico para que estas cresçam e se mantenham saudáveis. Para células de mamíferos, em geral utiliza-se estufas com variabilidade térmica menor ou igual a 1°C, com concentração controlada de CO₂ e protegidas da incidência de luz.

Diversas linhagens celulares foram utilizadas neste trabalho: 1) células leucêmicas da linhagem K562 sensível à cisplatina; 2) células leucêmicas homologas à K562, linhagem *Lucena* resistente à cisplatina; 3) células de câncer de pulmão linhagem H460; e 4) células de câncer de colo retal linhagem HCT-116. A K562 foi a primeira linhagem celular de leucemia mieloide imortalizada. Esta linhagem é derivada de uma paciente do sexo feminino portadora de leucemia mieloide crônica em crise blástica²⁰. As células são arredondadas e não aderentes (Lozzio e Lozzio, 1975; Drexler, 2001). A Lucena 1 é uma linhagem celular resistente a diversas drogas e foi selecionada a partir da linhagem K562. As células que constituem esta linhagem foram inicialmente selecionadas para resistência a vincristina²¹. Esta linhagem apresenta diferenças em sua expressão proteica, e em seu citoesqueleto. Quando comparada à K562, ela apresenta resistência à radiação UV e a diversas drogas, incluindo a cisplatina (Rumjanek *et al.*, 2001). A HCT116 é uma linhagem celular maligna isolada de um paciente do sexo masculino com carcinoma de cólon. As células são do tipo epitelial, aderentes e se apresentaram tumorigênicas em ratos. A H460 é uma linhagem celular obtida a partir do fluido pleural de um paciente do sexo masculino com câncer de células grandes de pulmão. Esta linhagem é aderente, tumorigênica e não

²⁰ Crise blástica é a fase final da evolução da leucemia mieloide crônica, e comporta-se como uma leucemia aguda, com rápida progressão e sobrevivência curta.

²¹ Vincristina é um alcaloide da vinca utilizado como quimioterápico, com atividade antimitótica.

apresenta grandes mutações em seu DNA se comparada a células grandes de pulmão normais (Banks-Schlegel e Quintero, 1986).

2.6 Técnicas utilizadas

2.6.1 ICP-MS

A espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) pode ser utilizada para determinar a composição isotópica e concentração de grande parte dos elementos da tabela periódica. Ao serem nebulizadas, a partir de uma solução líquida, as amostras passam por processos que levam à secagem da névoa, atomização e ionização ao longo de seu tempo de residência no plasma de alta temperatura. Uma fração dos íons que penetram no espectrômetro de massa são então separados e determinados. Como existe uma função de calibração estabelecida entre a quantidade de analito em soluções padrões e o sinal produzido na detecção, a quantificação pode ser realizada com exatidão. A sensibilidade da técnica varia em função dos elementos, como resultado das diferenças de: 1) facilidade de ionização; 2) níveis de fundo de elementos no ambiente; 3) o efeito imposto pela matriz da amostra e 4) as interferências de combinações de átomos que formam íons com a mesma razão massa/carga que o elemento a ser detectado.

Na Figura 8 é apresentada a estrutura de um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado. O equipamento possui um sistema de introdução de amostra, responsável por admitir uma quantidade suficiente de amostra com características adequadas para não perturbar o plasma a ponto de extingui-lo ou desestabiliza-lo, além de uma tocha com uma vazão suficiente de argônio para manter o plasma aceso. O plasma é iniciado através de uma descarga Tesla através do fluxo de argônio. Esta descarga retira elétrons de alguns átomos de argônio e um campo magnético oscilante gerado por uma bobina de indução acoplada a um gerador de radiofrequência estabiliza os cátions de argônio e os elétrons. Uma reação em cadeia se estabiliza rapidamente nesta região formando o plasma. As temperaturas alcançadas no plasma variam entre 6000 e 10000 K, e, virtualmente todas as moléculas que chegam ao plasma são dissociadas e os elementos ionizados. Desta forma o ICP é uma fonte de íons muito abundante,

adequada para a determinação de aproximadamente 70% dos elementos da tabela periódica.

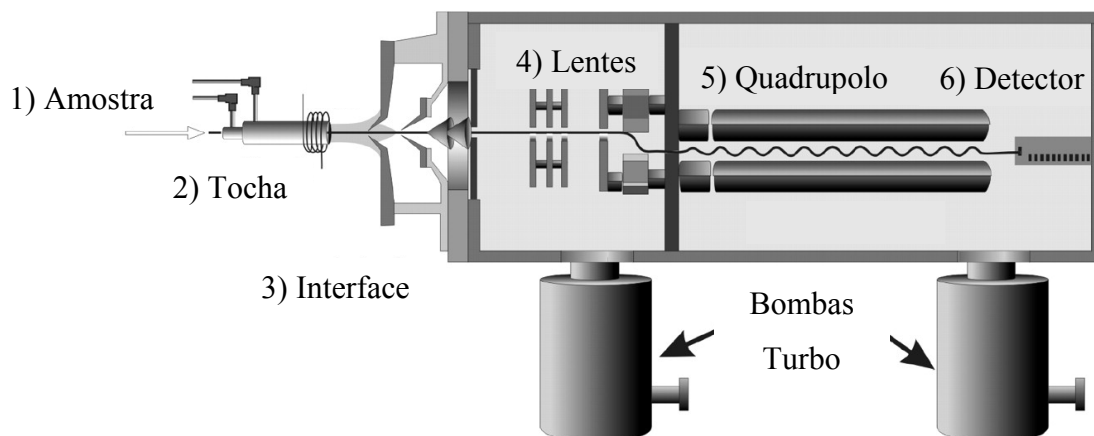


Figura 8: Esquema da estrutura de um espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado usado para medições por ICP-MS.

Os íons são conduzidos ao analisador de massa através de uma interface de pressão intermediária à pressão atmosférica da fonte de ICP e o alto vácuo característico da operação do espectrômetro de massa. A diferença de pressão e/ou uma diferença de potencial aceleram os íons que deixam o plasma em direção ao detector. Após a passagem pela interface, o feixe de íons é colimado e as partículas tem sua energia cinética ajustada em uma lente iônica.

Alguns elementos sofrem interferência de isóbaros ou de íons poliatômicos produzidos pelas condições extremas do plasma. No caso das interferências poliatômicas, elas podem ser contornadas com a escolha de isótopos livres de interferência para se realizar o monitoramento do elemento de interesse, ou com a utilização de células de colisão/reação que eliminam estas espécies do feixe de íons. O princípio de funcionamento destas células consiste na passagem do feixe de íons através de uma região contendo um gás de colisão/reação que resulta na desestabilização das espécies poliatômicas interferentes.

Os íons entram então em um analisador de massa do tipo quadrupolo que emprega um campo elétrico cuja magnitude é variada continuamente e cuja polaridade se alterna sucessivamente de modo a estabilizar a trajetória de íons, com uma razão massa/carga definida, até o detector. Todas as outras espécies

iônicas que não tem a mesma razão massa/carga são desestabilizadas e desviadas do caminho do detector. O detector converte a energia de colisão dos íons em sinal elétrico que é amplificado para ser registrado.

As determinações por ICP-MS são extremamente sensíveis permitindo a detecção de Pt em níveis ng kg^{-1} . Sua característica multielementar permite a utilização de padrões internos e o monitoramento tanto de vários elementos de interesse, quanto o de diferentes isótopos do mesmo elemento, oferecendo informações valiosas sobre as amostras e permitindo diversas abordagens analíticas para a determinação e quantificação elementar em matrizes biológicas. Por exemplo, esta é uma ferramenta extremamente útil na determinação da concentração total de metais em sangue, o que é fundamental para a realização de estudos farmacocinéticos, pois a concentração elementar total fornece informação sobre a absorção e efluxo das drogas pelas células. Além disso, essas informações são fundamentais para a realização de balanços de massa.

2.6.2 HPLC e HPLC-ICP-MS

A análise de especiação consiste na determinação de todas as espécies químicas que contém um determinado elemento em uma amostra. Para fazer a especiação da platina é necessário o emprego de técnicas de separação capazes de isolar cada uma destas espécies para posterior detecção por uma técnica de espectrometria atômica. A principal ferramenta utilizada para este fim é o acoplamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a técnica de ICP-MS.

A técnica HPLC utiliza uma bomba para produzir uma vazão contínua de fase móvel líquida em alta pressão (15 a 300 bar) com o mínimo de oscilação. A fase móvel conduz a amostra através de uma coluna cromatográfica onde os analitos de interesse são idealmente separados (por causa de interações diferenciadas entre as espécies químicas, a fase móvel e a fase estacionária da coluna) em zonas para serem detectadas em sequência ao passarem pelo sistema de detecção, o que produz, ao fim da corrida, um cromatograma. Uma representação esquemática de um cromatógrafo a líquido é apresentada na Figura 9.

As fases móveis são degaseificadas, pois em um sistema em alta pressão os gases dissolvidos produzem oscilações indesejáveis que provocam ruído (flutuações) na linha de base dos cromatogramas. Quando mais de um solvente está disponível num sistema, a composição da fase móvel é definida, de forma fixa (eluição isocrática) ou com a variação de proporção relativa de solventes (eluição com gradiente), pelo ajuste das válvulas que admitem um percentual de cada componente no sistema, sendo homogeneizadas num misturador. A amostra pode ser introduzida manualmente no sistema em alta pressão através do carregamento de solução da amostra numa válvula multicanal. Um volume pré-estabelecido é introduzido em uma alça de amostragem (“loop”), e com um movimento da válvula, o fluxo de fase móvel passa por dentro do “loop” conduzindo a amostra à coluna cromatográfica.

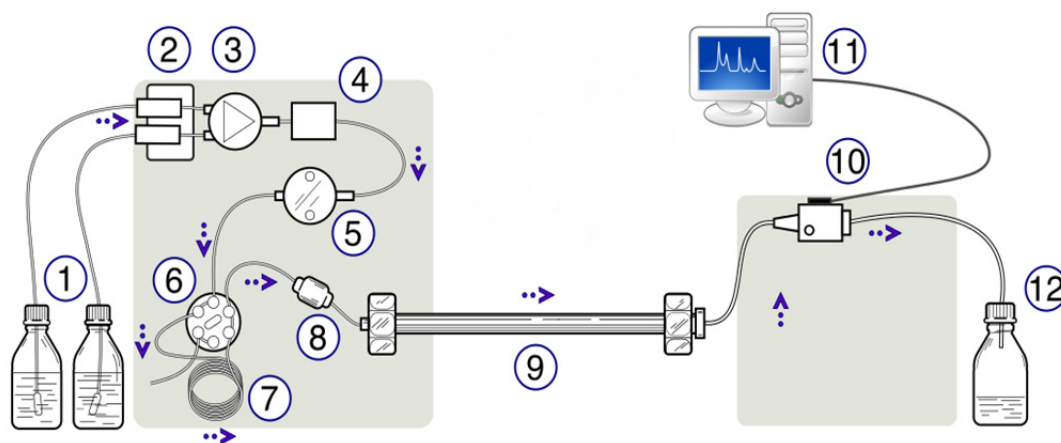


Figura 9: Representação esquemática de um sistema de HPLC. 1) fases móveis, 2) degaseificador, 3) válvula de mistura (determina a composição da fase móvel), 4) câmara de mistura, 5) bomba HPLC, 6) válvula multicanal para introdução de amostra, 7) alça de amostragem para introdução de amostra, 8) pré-coluna, 9) coluna cromatográfica, 10) sistema de detecção, 11) computador para integração dos dados, 12) rejeito.

Com base nos diferentes mecanismos de separação, a cromatografia líquida pode apresentar diferentes subdivisões. Considerando-se a separação baseada nas diferenças das afinidades de troca iônica, a técnica de separação é conhecida como cromatografia de íons (IC) (Ettre, 1993). Para tanto, os seguintes princípios de separação associam-se a IC: troca iônica, formação de par iônico e exclusão iônica (Schwedt, 1985). Dentre os diferentes tipos de cromatografia de íons, a cromatografia de pareamento iônico (IPC) recebe uma atenção especial, uma vez

que possibilita a separação de diferentes íons, moléculas orgânicas ionizadas e íons complexos, utilizando o mesmo mecanismo de separação. A essência deste modo de separação consiste na modificação dinâmica da superfície da fase estacionária apolar empacotada para a adsorção de íons hidrofóbicos possibilitando a separação de solutos iônicos orgânicos e/ou inorgânicos (Cecchi, 2008). Para tanto, é usualmente adicionado, junto à fase móvel, um reagente de pareamento iônico (IPR).

O mecanismo para IPC de aplicado a separação de fragmentos de DNA segue o modelo de partição, em que a formação dos pares iônicos ocorre em solução (formados entre íon e molécula parcialmente carregada do DNA e entre o mesmo com o IPR) seguida pela retenção do par iônico pela fase estacionária (Gjerde, Hanna e Hornby, 2002). Uma série de variáveis influem no comportamento de retenção das espécies envolvidas, sendo a escolha das fases estacionária e móvel as mais críticas. A maioria das separações são feitas com fases estacionárias convencionais de alquil-sílica, em geral C18 e C8. Na fase móvel, um modificador orgânico, o qual é adicionado para aumentar a solubilidade do analito, melhora a interação da fase estacionária apolar empacotada e ajustando a retenção e seletividade do analito. A eluição por gradiente evita o uso de condições extremas de pH e resulta em sinais mais estreitos e resultados rápidos. Aditivos, que são reagentes utilizados para mascarar íons de metais que prejudicam a eficiência cromatográfica, podem ser adicionados. A estrutura e concentração do IPR devem ser ajustados caso a caso, pois possuem diferentes estruturas e carga, logo apresentam diferentes efeitos sobre a retenção do analito. O pH da fase determina o grau de ionização dos solutos e, com isso, a magnitude das interações eletrostáticas podendo ser utilizado para regular a seletividade (Cecchi, 2008). Finalmente, a volatilidade do contra íon IPR é importante quando a IPC é hifenada à espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS), além de influenciar a retenção do analito (Cecchi, 2008).

Os principais parâmetros que devem ser ajustados ao acoplar-se um sistema de HPLC a um de ICP-MS são: i) a escolha da fase estacionária e suas características físicas, ii) a composição da fase móvel, iii) o tipo de eluição e sua vazão; além de iv) a temperatura do sistema de separação. Deve-se também estabelecer uma estratégia para o monitoramento da estabilidade do sinal do ICP-

MS ao longo da corrida cromatográfica. Uma vez que corridas utilizando fases móveis orgânicas, gradientes de composição e corridas muito longas, podem gerar instabilidades no sistema ICP-MS por causa da deposição de fuligem sobre os cones e lentes iônicas, ou desestabilização do plasma devido a uma grande carga de compostos orgânicos provocando sua extinção. A padronização interna com uma espécie química adequada minimiza tais problemas.

A determinação de fragmentos de DNA contendo platina por HPLC-ICP-MS é importante para a investigação de biomarcadores. Como o principal mecanismo de ação das drogas à base de platina é baseada em sua ligação ao DNA, esta técnica permite a avaliação dos produtos da interação da droga com o sistema biológico, permitindo fazer especulações sobre os efeitos e a resistência celular.

2.6.3 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica adequada para a contagem, avaliação e classificação de partículas em suspensão em um líquido. Os citômetros de fluxo, como são chamados os equipamentos utilizados para esse fim, têm como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão forçando-as a passar por uma câmara de foco hidrodinâmico (Figura 10) que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido (sheath fluid) e saiam desta câmara, uma atrás da outra, de modo que uma única célula, por vez, seja interceptada por um feixe de laser (Figura 10). Ao interagir com o laser, dois tipos

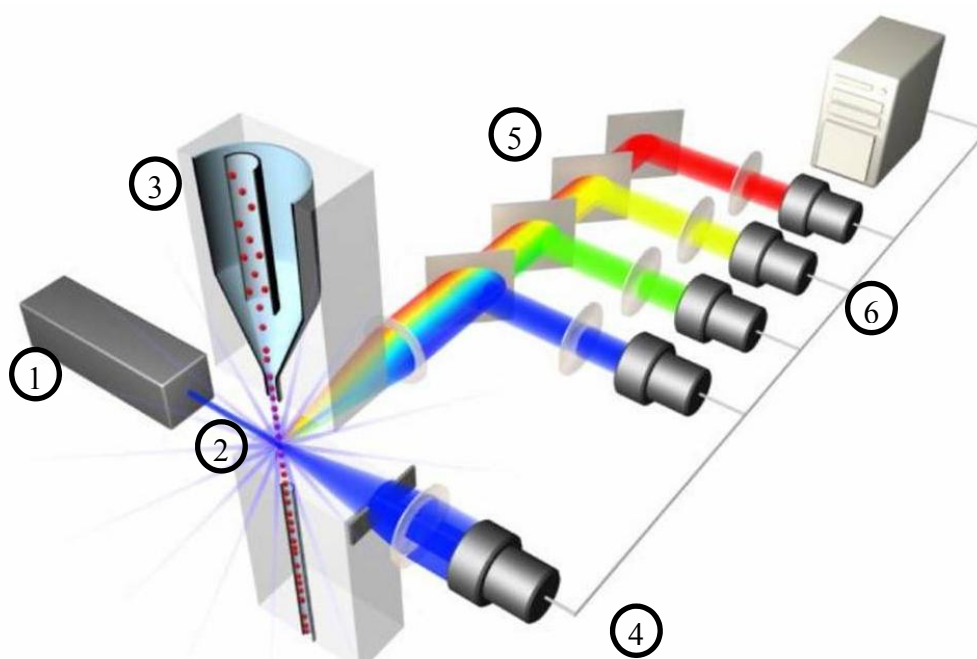
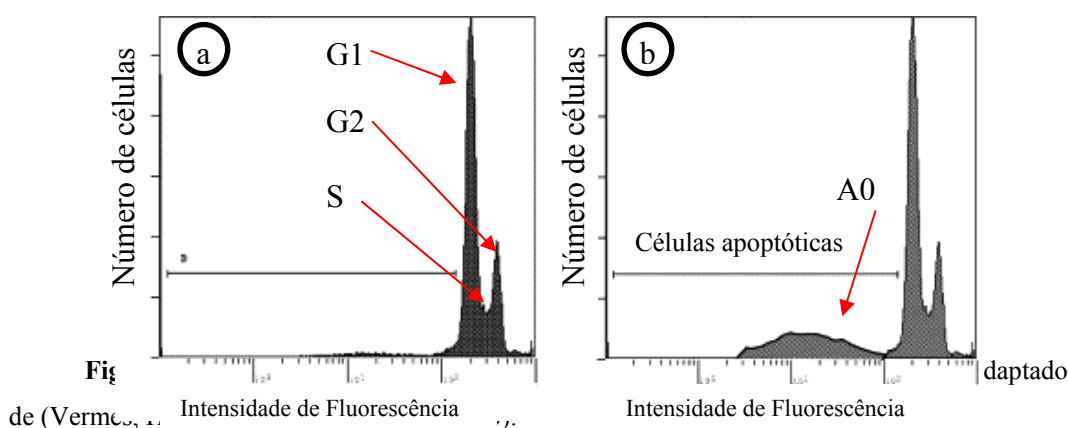


Figura 10: Representação esquemática de um citômetro de fluxo. 1) laser, 2) ponto de leitura, 3) foco hidrodinâmico, 4) detector frontal, 5) espelhos dicroicos, 6) detectores.

de fenômenos físicos ocorrem e fornecem informações acerca da célula.

O primeiro fenômeno é o espalhamento da luz, que ocorre de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula; o espalhamento frontal é captado no detector frontal e está relacionado com o tamanho das células, já o espalhamento a 90° é detectado em um dos detectores laterais e está relacionado com a granularidade da célula ou partícula.

O segundo fenômeno é a fluorescência. No caso, quando as células previamente marcadas com agentes fluorogênicos, são excitadas pelo laser, elas emitem radiação eletromagnética com comprimento de onda maior que a da radiação de excitação (fluorescência), que é utilizada para se examinar aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das células. Uma série de lentes colocadas próximas desta zona de interceptação coleta parte da luz, emitida isotropicamente. O feixe tem seus comprimentos de onda separados por espelhos dicróicos, geralmente os equipamentos comerciais podem detectar quatro comprimentos de onda simultaneamente. Estes feixes são direcionados a tubos fotomultiplicadores que convertem fótons em sinais elétricos que são amplificados e transformados em informação digital.



A análise de viabilidade celular por citometria de fluxo pode ser feita marcando as células com um intercalante de DNA fluorescente. Em amostras onde as células estão íntegras (Figura 11a) observa-se um sinal de maior intensidade, relativo a células em seu estado normal (G1) e um pequeno vale referente à células que estão iniciando o processo de replicação de seu material genético (S). Além disso, um segundo sinal (G2), referente a células que já

finalizaram a duplicação de seu DNA, mas ainda não se separaram pela mitose, é observado. Nas amostras onde as células estão entrando em apoptose (Figura 11-b), observa-se o aparecimento de uma banda na região sub-G1 (A0). Esta banda é oriunda de células que entraram em apoptose e tem seu conteúdo de DNA diminuído devido à perda de fragmentos de menor massa molecular, ou de corpos apoptóticos contendo quantidades de DNA menores que uma célula normal resultando, nos dois casos, em uma menor intensidade de fluorescência.

2.6.4 Extração de DNA e eletroforese em gel

A extração de DNA da célula é uma etapa importante para determinação da eficácia das drogas à base de platina, uma vez que o principal mecanismo citotóxico é a formação de adutos de DNA. É importante garantir que nenhuma fração seja perdida, e também que não haja degradação do material genético extraído.

A extração do DNA baseia-se no rompimento das membranas celulares, degradação das proteínas que mantem o DNA enovelado e inativação das enzimas que degradam o DNA. Em seguida, o DNA é precipitado alterando-se a força iônica da solução, com adição de solventes onde o DNA é menos solúvel e com a diminuição da temperatura. Uma vez precipitado, o DNA é separado do sobrenadante por centrifugação, lavado e ressuspenso no solvente adequado para as análises posteriores (Herrmann *et al.*, 1994), (Van Der Burg *et al.*, 2011), (Zeugin, 1985).

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas carregadas em um campo elétrico. Na eletroforese em gel, as moléculas são separadas conforme seu tamanho, forma e carga. As moléculas de DNA apresentam cargas negativas nos grupos fosfato devido à sua ionização em meio aquoso. Esta carga é uniformemente distribuída ao longo da molécula fazendo do DNA um polieletrólito, o que favorece a separação por eletroforese. Para a separação de DNA, utiliza-se geralmente o gel de agarose devido a suas características mecânicas, tamanho de poro e custo. As moléculas de menor razão massa/carga, que reflete indiretamente a sua massa molecular migram mais rapidamente. Quanto maior a concentração de agarose no gel, mais lentamente a migração

acontecerá, e moléculas muito grandes, como o DNA genômico inteiro, podem nem mesmo entrar no gel.

A separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel não permite a determinação da presença de metais ligados a estes fragmentos. Para este fim pode-se extrair os fragmentos do gel e se proceder uma análise por HPLC-ICP-MS.

3. Materiais e Metodologia

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

A cisplatina utilizada nos experimentos foi o fármaco comercial Tecnoplatin, da marca Zodiac (Brasil). Utilizou-se uma ampola de 100 mL com 50 mg de cisplatina, resultando em uma concentração da droga de 500 mg L^{-1} e uma concentração de Pt de $325,1 \text{ mg L}^{-1}$. A carboplatina utilizada foi o fármaco comercial Tecnocarb, também da marca Zodiac (Brasil). Utilizou-se um frasco-ampola contendo 450 mg de carboplatina em 50 mL, isto é, 9 g L^{-1} , representando uma concentração de platina de $4,7 \text{ g L}^{-1}$. A oxaliplatina utilizada também foi o fármaco comercial na forma de pó produzido pelo laboratório Eurofarma (Brasil). Cada frasco ampola contém 50 mg de oxaliplatina e a reconstituição foi feita segundo informações do fabricante.

A água utilizada, excetuando quando especificado, foi do tipo ultrapura, com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C , obtida com um sistema ultrapurificador de água da marca Millipore (EUA) modelo Milli-Q A10 gradiente.

Para o preparo das amostras de drogas contendo platina utilizou-se cloreto de sódio (Merck). Para o preparo das fases móveis utilizadas para separação das drogas em solução utilizou-se ácido fórmico (Sigma-Aldrich), hidróxido de amônio (Vetec), e metanol (Merck). Os gases argônio 5.0, hélio 5.0 e hidrogênio 5.0 (White Martins, Brasil) foram usados.

Para a cultura de células e experimentos de citometria de fluxo, utilizou-se as linhagens K562 e Lucena (gentilmente cedidas pela Professora Vivian Rumjanek, UFRJ), HCT-116 (Sigma-Aldrich) e o H460 (gentilmente cedida pela professora Morgana Castelo Branco, UFRJ). O meio de cultura RPMI - 1640²² foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA) ou da Gibco (EUA) assim como o soro fetal

²² Composição apresentada no anexo I.

bovino e a penicilina com estreptomicina. O etanol 70% foi o de grau comercial e o tampão fosfato-salino²³ (PBS) foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro) ou da Sigma-Aldrich. Hipoclorito de sódio foi o de grau comercial. Iodeto de propídeo (IP), hidrocloreto de verapamil e Rhodamina 123 foram da Sigma-Aldrich. O dióxido de carbono 99,5% foi da White Martins. O argônio (grau 5.0) foi da Lynde gases (Brasil).

Para a extração de DNA e eletroforese em gel utilizou-se nonil fenoxipolyetoxietanol (NP-40®) (Merck), EDTA (Sigma-Aldrich), tampão tris(hidroximetil) aminometano (Tris) da Sigma-Aldrich, ácido clorídrico (Vetec), dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma-Aldrich, RNase²⁴ (Affymetrix, USA), Proteinase-K²⁵ (Sigma-Aldrich), acetato de sódio (Vetec), N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine (SYBR Green®) da Molecular Probes, Inc., USA. O etanol absoluto, o ácido acético e o ácido bórico foram obtidos da Merck. Agarose de alta pureza, *DNA ladder* 100 Bp²⁶, *DNA ladder* 50 Bp²⁷ foram da Sigma-Aldrich.

Para extração dos fragmentos de DNA do gel de agarose para posterior análise por HPLC-ICP-MS utilizou-se o GenElute™ Gel Extraction kit (Sigma-Aldrich) composto por uma solução de preparo da coluna, uma solução de solubilização de gel, uma solução para lavagem, uma solução de eluição dos fragmentos de DNA e colunas de preconcentração. Além das soluções contidas no kit utilizou-se etanol absoluto e isopropanol, ambos da Sigma-Aldrich.

Para a análise de fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS utilizou-se acetonitrila (Sigma-Aldrich), metanol e trietil-amina da Merck, EDTA (Vetec), ácido acético (Merck) e DNA ladder 100 BP (Sigma-Aldrich).

²³ O PBS utilizado é comercializado pronto, tem uma concentração de 10 mmol L⁻¹ de fosfato e pH de 7,4. A concentração de outros sais como NaCl, ou KCl pode apresenta pequenas variações.

²⁴ Enzima para clivagem de RNA presentes em extrato celular afim de evitar contaminação do DNA extraído.

²⁵ A proteinase-k é utilizada para remoção das proteínas associadas ao DNA, que conferem sua estrutura cromossomal, liberando a dupla fita como uma molécula linear.

²⁶ Em uma tradução livre, é uma escada de DNA, *i.e.* mistura de moléculas de DNA com diferentes tamanhos de fita, variando de 100 pares de base (BP). A menor cadeia apresenta 100 BP e a maior 1000.

²⁷ Similar ao DNA ladder 100 BP, a menor cadeia, neste caso, apresenta 50 BP e a maior 3500.

3.1.2 Materiais

Para todos os procedimentos utilizou-se tubos de centrifuga descartáveis de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha, Corning, EUA, ou TPP, Suíça), tubos tipo eppendorf 1,5 e 2,0 mL (Eppendorf, Alemanha ou Brand, Alemanha). Para as culturas de células utilizou-se placas descartáveis de cultura de 6, 12 e 24 poços (TPP, Suíça). Pipetas automáticas de volume fixo de 200, 500 e 1000 μL (Kacil, Brasil) e pipetas automáticas de volume variável de 100 a 1000 μL , 20 a 200 μL , 10 a 100 μL , 1 a 10 μL , 0,5 a 10 μL , e 0,1 a 2 μL (Gilson, EUA, Eppendorf, Alemanha, ou Labmate, Brasil) foram usadas.

O gelo seco foi produzido utilizando-se uma câmara de expansão para CO_2 desenvolvida e gentilmente cedida pelos pesquisadores do Laboratório de Metrologia Térmica do Inmetro.

As fases móveis foram filtradas com membranas 0,45 μm de diâmetro de poro, hidrofílicas e hidrofóbicas de acordo com as características da fase móvel e um suporte para filtração (Millipore, EUA). Como fases estacionárias foram testadas colunas Zorbax C18 (150 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, partícula de 5 μm , Agilent, Japão); PRP-X100 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5,0 μm , Hamilton, USA); Discovery HS F5 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, partículas de 5,0 μm , Sigma-Aldrich, EUA) e Discovery HS F5 (150 mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, partículas de 3,0 μm , Sigma-Aldrich, EUA), Superdex 200 10/300 (GE, EUA).

3.1.3 Instrumentos

As determinações de platina foram feitas com espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado 7500 cx (Agilent, Japão) equipado com um amostrador automático modelo A90, um nebulizador tipo Meinhard[®] de microvazão (100 $\mu\text{L min}^{-1}$), câmara de nebulização tipo Scott acondicionada em um sistema Peltier de controle de temperatura, cones de níquel, e uma célula de reação/colisão tipo octapolo. A otimização dos tempos de lavagem, enchimento e estabilização foi realizada utilizando-se um cronômetro digital.

As separações cromatográficas das drogas em solução aquosa foram obtidas com um sistema cromatográfico a líquido de alta eficiência série LC1200 (Agilent Technologies, Japão) equipado com uma bomba quaternária, um degaseificador de fase móvel, um forno para controle de temperatura das colunas. A detecção das espécies de Pt foi realizada exclusivamente por ICP-MS visto que o acoplamento HPLC-ICP-MS foi usado.

Para a cultura de células utilizou-se uma capela do fluxo laminar HLFS 09S (Veco, Brasil) e uma estufa para cultura DS-LE (LTS, Brasil). Um microscópio óptico (Leica, Alemanha) foi utilizado para avaliação visual das culturas. As células foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Boeco, Alemanha). As células foram depositadas utilizando-se uma centrífuga refrigerada 5810 R (Eppendorf). As determinações de viabilidade e estudos de funcionamento de bombas de membrana das culturas foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScalibur 200 (Becton Dickinson, EUA).

Para a extração de DNA e para a eletroforese em gel utilizou-se uma centrífuga 5415 R (Eppendorf) e um banho termostatzado (Nova Ética, Brasil). Para quantificação do DNA utilizou-se um espectrofotômetro de absorção molecular no UV/vis Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para fornecer a diferença de potencial para as separações eletroforéticas foi utilizada uma fonte estabilizada ajustável PowerPack (BioRad, EUA). Os géis foram revelados e posteriormente cortados utilizando-se uma câmara de transiluminação no UV para registro ChemiDoc MP System também da BioRad.

Para a separação cromatográfica dos fragmentos de DNA foi utilizado um sistema cromatográfico a líquido de alta eficiência Flexar (Perkin Elmer, EUA) composto por um gerenciador de fases móveis com degaseificador, um amostrador automatizado, forno para estabilização térmica das colunas e bomba HPLC quaternária. A detecção de espécies contendo platina, fósforo e ródio foi feita utilizando-se o espectrômetro de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado e com célula de reação modelo Elan DRC II (Perkin Elmer, EUA) equipado com nebulizador Mira Mist, com uma câmara de nebulização ciclônica e com controle de temperatura Isomist[®] (Glass Expansion, EUA). Os cones de amostragem e “skimmer” foram ambos de platina. O acoplamento entre os dois equipamentos foi feito através de uma válvula automática EV750-100-S2 (Cetac, EUA) e por uma bomba peristáltica Minipuls III (Gilson, França), utilizada para

adequação da vazão de fluido admitido no ICP-MS e introdução de solução de padrão interno. As determinações de pH das fases móveis foram realizadas em um pHmetro MP 230 (Mettler Toledo, Suíça). As fases móveis foram degaseificadas em um banho ultrassônico modelo Ultra Cleaner 1400A (Unique, Brazil).

3.2 Procedimentos

3.2.1 Especificação de platina em drogas com acoplamento HPLC-ICP-MS

A especificação de platina em drogas, seja na forma original ou na forma de produtos de hidrólise, é fundamental para o entendimento de suas farmacocinéticas, possibilitando o entendimento da estabilidade das drogas em diferentes meios. Além disso, neste trabalho se estabeleceu o acoplamento das técnicas de HPLC e ICP-MS na PUC-Rio (sistema ilustrado na Figura 12), uma vez que tal procedimento nunca havia sido realizado ali. Inicialmente os métodos foram desenvolvidos e testes realizados para verificar a confiabilidade do sistema HPLC-ICP-MS.

As soluções estoque das drogas foram diluídas em solução aquosa de NaCl 0,9% ou diretamente em água. As diluições posteriores foram conduzidas imediatamente antes do início dos experimentos.

Um dos componentes da fase móvel consistiu de uma solução aquosa preparada com NH_4OH para obter-se uma concentração final $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, onde se adicionou ácido fórmico para ajustar o pH em 4,5. Metanol foi adicionado para se obter uma proporção final, em volume, de 4%. No canal A do sistema cromatográfico utilizou-se água ultrapura, no canal B utilizou-se a fase móvel descrita e no canal C utilizou-se metanol. Na otimização das condições de separação, os parâmetros investigados foram: colunas cromatográficas, vazão da fase móvel e o programa de gradiente. Os parâmetros foram variados um de cada vez até se obter as condições de separação para as drogas. As condições que permitiram isso são apresentadas na Tabela 1.

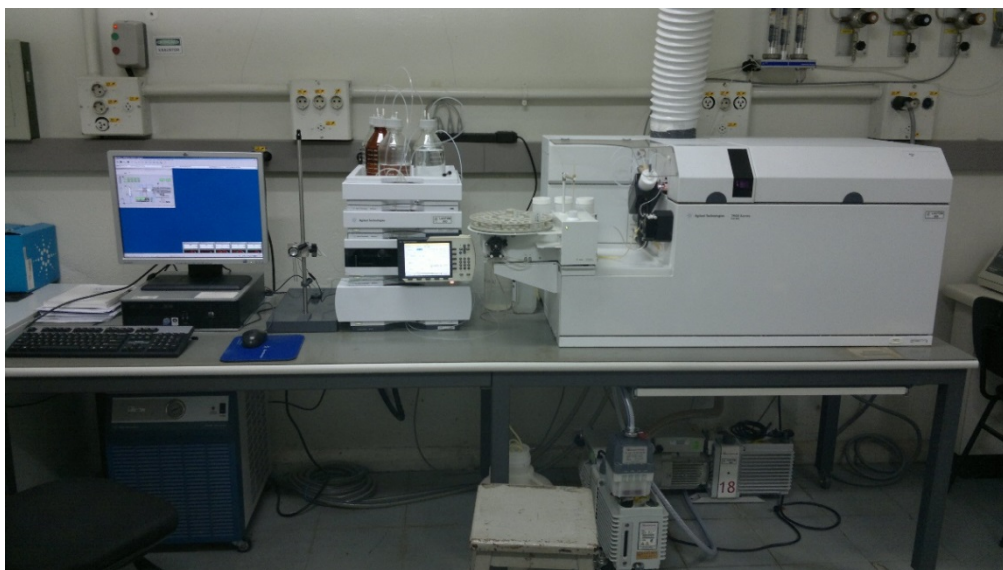


Figura 12: Sistema HPLC-ICP-MS da PUC-Rio.

Tabela 1: Condições otimizadas para separação das espécies de Pt das drogas e seus produtos de hidrólise com detecção por ICP-MS

Coluna	Discovery HS F5 (150 x 2.1 mm)		
Fase móvel A	H ₂ O		
Fase móvel B	20 mmol L ⁻¹ formato de amônio		
Fase móvel C	MeOH		
Vazão	0,50 mL min ⁻¹		
Volume de Injeção	5 µL		
Temperatura do forno	45 °C		
Gradiente			
Tempo (min)	A(%)	B(%)	C(%)
0,0	80	20	0
6,0	73	20	7
13,0	73	20	7
13,5	80	20	0
20,0	80	20	0

3.2.2 Cultura de células

As células foram cultivadas em estufa para incubação celular à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Elas foram cultivadas em placas de poliestireno estéreis de 6, 12 e 24 poços. A quantidade de células utilizadas nos experimentos foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer e microscópio ótico. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, enriquecido com 10%, em volume, de soro fetal bovino. As culturas foram tratadas com doses adequadas de penicilina e estreptomicina.

Toda a manipulação das culturas para manutenção, expansão, exposição às drogas e troca de meio de cultura foram conduzidas em uma capela de fluxo laminar esterilizada previamente com luz UV.

3.2.3 Determinação de metabolismo celular da cisplatina

A viabilidade das células foi determinada utilizando-se um citômetro de fluxo de bancada. No estudo de viabilidade celular, avaliou-se o índice de morte celular tratando as culturas com concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 50 µg mL⁻¹ de cisplatina.

A metodologia consistiu em marcar as células tratadas e os respectivos controles com iodeto de propídeo. As amostras foram inseridas no equipamento por auto-aspiração. Entre uma amostra e outra, o equipamento foi lavado com solução de hipoclorito de sódio e com água. O líquido utilizado para carrear as células foi PBS comercial (10 mmol L⁻¹ e pH 7,4). Os dados foram obtidos e tratados utilizando-se o software BDCellQuest Pro (Becton, Dickinson, EUA). No estudo de cinética as células foram expostas à cisplatina por intervalos variando de 0 a 72 h.

Para um melhor entendimento do sistema celular K562/Lucena, realizou-se um estudo do mecanismo de efluxo da cisplatina do meio intracelular através de bombas de membrana.

Este estudo foi conduzido avaliando-se cinco situações distintas através da citometria de fluxo. Na primeira situação mediu-se o controle para avaliar a autofluorescência da célula. Em seguida (segunda situação) expôs-se a célula à

rodamina (um fluorocromo²⁸), que é reconhecido pela proteína de membrana Pgp que posteriormente remove a rodamina da célula. Na terceira situação, a célula foi exposta à cisplatina e ao fluorocromo para avaliar a interferência da droga no comportamento das bombas de efluxo. Em uma quarta etapa, as células foram expostas à rodamina e a um inibidor de Pgp (verapamil). Nesta etapa pode-se avaliar a importância destas bombas por meio da medição da fluorescência da célula. Caso a atuação das bombas seja relevante, quando as bombas são inibidas a fluorescência medida deve ser maior, pois a acumulação da rodamina na fração citoplasmática não é diminuída pela ação da Pgp. O último cenário experimental foi a combinação do fluorocromo, verapamil e cisplatina.

Além dos experimentos com citometria de fluxo, a determinação, por ICP-MS, da concentração total de platina no meio de cultura, nos tampões de lavagem e de incubação, e no “pellet” de células foram feitos para se conhecer as quantidades de Pt que foram absorvidas pelas diferentes linhagens.

Para a determinação da absorção da droga pelas células, utilizou-se o seguinte desenho experimental:

As células foram incubadas por 48 h em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo 10 mg mL^{-1} de cisplatina. Após centrifugação da cultura, o sobrenadante (meio de cultura) foi coletado para determinação da concentração de cisplatina. O “pellet” foi lavado com PBS a 4°C, que após nova centrifugação, foi coletado para análise. Este procedimento foi realizado duas vezes para remover toda cisplatina não absorvida pelas células.

O “pellet” foi então ressuspensão em PBS e incubado na estufa de cultura por 1 h. Decorrido o período de incubação, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante recolhido para determinação da concentração de cisplatina. O “pellet” resultante foi digerido em ácido nítrico 1:1 por 1h, diluído com uma solução aquosa de HNO_3 a 2% a uma razão 1:10 para a determinação da concentração de cisplatina.

A concentração de platina nas diversas amostras foi determinada por ICP-MS utilizando uma curva analítica e monitorando-se os isótopos 194 e 195 da Pt. As condições do sistema são apresentadas na Tabela 2 abaixo.

²⁸ Fluorocromos são agentes que emitem luz após excitação luminosa. Os fluorocromos são substâncias que causam fluorescência em outras substâncias, ou seja, corantes usados para marcar ou diferenciar outros compostos com “etiquetas” fluorescentes.

Tabela 2: Parâmetros instrumentais para determinação da cinética de entrada e de saída de cisplatina da linhagem K562 e Lucena.

Parâmetro	Valor
Potência de radio-frequência	1500 W
Gás de arraste	0,9 L /min
Gás <i>Make-up</i>	0,28 L/min
Bomba do Nebulizador	0,1 rps
Temperatura da câmara de nebulização	2°C

3.2.4 Extração de DNA e eletroforese em gel

O procedimento para extração de DNA foi adaptado para recuperar fragmentos de DNA de células apoptóticas, isto é, para recuperação de fragmentos de DNA com baixo peso molecular (até 50 pares de base ou aproximadamente 32650 g mol^{-1}). As culturas de células foram transferidas da placa de cultura para um tubo apropriado para centrifugação de 1,5 mL ou tubos de centrifuga de 15 mL. Em seguida centrifugou-se as culturas a 3000 rpm por 5 min. Desprezou-se o sobrenadante, com cuidado para não perder parte do “pellet” de células. O “pellet” foi cuidadosamente lavado com PBS gelado (4°C) e tratado, por 10 s, com o tampão de lise (1% NP-40; 20 mmol L^{-1} EDTA; 50 mmol L^{-1} Tris-HCl com pH 7,5). Utilizou-se 10 μL de tampão de lise para cada 10^6 células, sendo que foi empregado um volume mínimo de 50 μL para amostras que continham menos que 5×10^6 células. Nesta etapa foi incluído um controle de recuperação de DNA, DNA ladder 50 BP, e todos os procedimentos foram aplicados ao controle.

Após a aplicação do tampão de lise, centrifugou-se a suspensão por 5 min a 1600 G, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente para evitar a coleta de “debris”²⁹ celulares. Ao “pellet” de “debris” celulares foi adicionado o mesmo volume de tampão de lise utilizado anteriormente e efetuou-se uma nova centrifugação sob as mesmas condições descritas, o sobrenadante foi coletado e

²⁹ Debris celulares são fragmentos não solúveis de membrana plasmática, citoesqueleto, membrana nuclear, organelas, etc.

adicionado à alíquota anterior, em seguida, o “pellet” de “debris” foi descartado. Adicionou-se SDS ao sobrenadante em quantidade adequada para obtenção uma solução aquosa a 1%, e então o sobrenadante foi tratado por 2 h com $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de RNase a 56°C . Em seguida, realizou-se a digestão com $2,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteinase K por 2 h à 37°C .

O procedimento aplicado até aqui produz uma solução contendo os fragmentos de DNA, resíduos de RNA e de proteínas, além das enzimas utilizadas na digestão. Para purificação do DNA é necessário precipita-lo de forma específica. Para isso empregou-se dois métodos descritos a seguir:

Método 1: Após a digestão com proteinase adicionou-se um volume de acetato de amônio 10 mol L^{-1} , equivalente a metade do volume de amostra contido no tubo, e agitou-se até obter uma solução homogênea. Em seguida, adicionou-se um volume de etanol absoluto, a -20°C , equivalente a 2,5 vezes o volume total contido no tubo. A solução foi deixada em um freezer a -20°C por 1 h, após este período a mesma foi centrifugada por 15 min a 12000 g e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% a -20°C sem a ressuspensão do precipitado. O etanol foi desprezado e o tubo foi deixado aberto para secagem por 15 min. O precipitado foi ressuspensão em $200 \mu\text{L}$ de tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , pH 7,0 ou água.

Método 2: Após a digestão, adicionou-se um volume de acetato de sódio 3 mol L^{-1} , equivalente a um décimo do volume de amostra contido no tubo, e agitou-se até obter uma solução homogênea. Em seguida, adicionou-se um volume de etanol absoluto, a -20°C , equivalente a três vezes o volume total de amostra, misturou-se até a obtenção de uma solução homogênea e levou-se ao gelo seco por 20 min.

Após a incubação em gelo seco, a solução foi centrifugada por 15 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado cuidadosamente (sem ressuspendê-lo) com 1 mL de etanol 70% gelado, centrifugou-se por 2 min a 13000 rpm e descartou-se o sobrenadante. O tubo contendo o precipitado foi deixado aberto por 15 min para secagem do restante do solvente. O precipitado foi ressuspensão em $20 \mu\text{L}$ de tampão Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , pH 7,0 ou água.

A quantificação do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria de absorção molecular em 258 nm. Esta técnica não requer nenhum preparo de amostra, apenas a calibração interna do instrumento e a medição do branco. Para

esta determinação, pipetou-se 2 μ L do tampão (aquele no qual o DNA foi ressuspendido) no caminho ótico do espectrofotômetro. Em seguida, 2 μ L da amostra de DNA foram colocados no caminho ótico do equipamento para se realizar a medição.

A separação de DNA foi realizada inicialmente utilizando-se eletroforese em gel. Utilizou-se uma fonte e cuba para eletroforese. Inicialmente preparou-se uma solução 1,2% de agarose (de alta pureza) utilizando-se um tampão tris-acetato EDTA (TAE) ou tris-borato EDTA (TBE). A solução foi aquecida em um forno de micro-ondas até a obtenção de uma solução homogênea. Esta foi vertida sobre o suporte para moldar o gel, aguardou-se 15 min para a polimerização. O gel foi inserido na cuba de eletroforese de tal maneira que todo o gel ficasse coberto pelo tampão (o mesmo utilizado para a confecção do gel). As amostras e DNA ladder de 50 BP foram pipetados em seus respectivos poços. A cuba foi conectada à fonte para aplicação do campo elétrico com a polaridade desejada. Utilizou-se uma diferença de potencial de 70 V, por 90 min. As corridas eletroforéticas foram acompanhadas através de corantes visíveis próprios para eletroforese em gel (ver Figura 13) e foram interrompidas quando o indicador laranja chegasse à 2/3 do comprimento do gel.

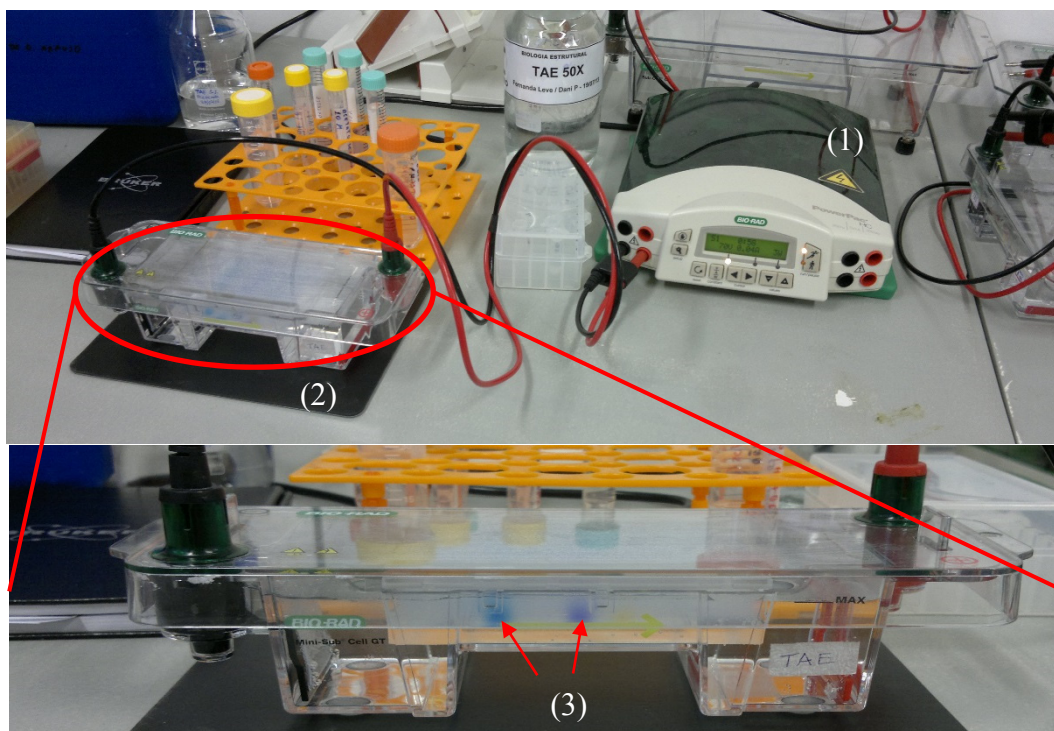


Figura 13: Aparato de eletroforese em gel: 1) fonte de potencial, 2) cuba de eletroforese com o gel submerso em tampão, 3) gel imerso em tampão durante uma corrida, é possível visualizar os indicadores para saber quanto a amostra percorreu do gel.

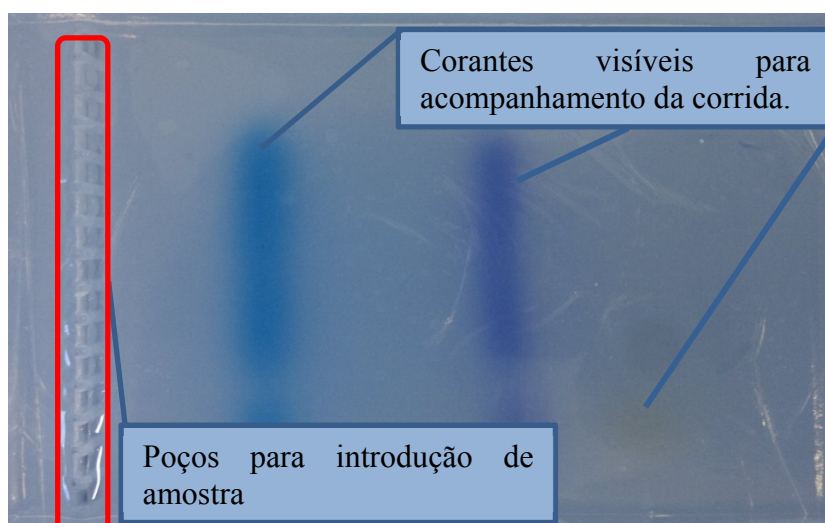


Figura 14: Exemplo de gel de agarose utilizado para separação dos fragmentos de DNA

Após a finalização da corrida, posicionou-se os géis em uma câmara para registro num sistema ChemiDoc MP para fotoregistro das bandas de DNA transiluminadas no UV.

3.2.5 Extração do DNA do gel

Para as amostras que seriam utilizadas para experimentos de HPLC-ICP-MS, o gel foi cortado utilizando-se o sistema ChemiDoc MP para transiluminação, possibilitando a identificação das regiões dos géis correspondentes a cada amostra contendo os fragmentos de DNA menores que 100 pares de base. Os fragmentos de DNA foram extraídos do gel de agarose utilizando-se um kit GenElute[®], seguindo os procedimentos do fabricante descritos a seguir:

Primeiramente a solução, identificada como *wash solution*, foi diluída com 12 mL de etanol absoluto, e separada para uso posterior. Pesou-se as frações de gel de interesse em um tubo Eppendorf de 2 mL. Adicionou-se 300 µL de *Gel Solubilization Solution* para cada 100 mg de gel de agarose contido em cada tubo. Os tubos foram fechados e levados a um banho termostático, à 55 °C por aproximadamente 10 min, até que todo o gel fosse dissolvido. A coluna de preconcentração do DNA (*Binding column*) foi colocada em um tubo de 2 mL onde adicionou-se 500 µL da solução *column preparation* e centrifugou-se o sistema por 1 min a 14000 g, descartando-se posteriormente o filtrado. Ao tubo contendo o gel solubilizado, adicionou-se um volume de isopropanol igual ao da porção de gel. A solução foi então colocada na coluna de preconcentração em alíquotas de 700 µL e o sistema foi levado à centrifugação por 1 min à 14000 g. O filtrado foi descartado. Este procedimento foi repetido até que toda a solução contendo os fragmentos de DNA fosse utilizada. A coluna de preconcentração foi lavada adicionando-se 700 µL da solução de lavagem e levando-se o sistema à centrifugação por 1 min à 14000 g, desprezando-se posteriormente o filtrado. Inseriu-se a coluna de preconcentração em um tubo de 1,5 mL, pipetou-se 50 µL da solução de eluição (*Elution solution*) no centro da membrana da coluna e encubou-se o sistema por 1 min. O sistema foi levado à centrifugação por 1 min à 14000 g. Depois disso, a coluna foi desprezada e o eluato, contendo os fragmentos de DNA, armazenado a 4 °C para ser posteriormente introduzido diretamente no cromatógrafo sem nenhum preparo adicional.

3.2.6 Determinação de fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS.

As determinações dos fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS foram realizadas no Inmetro e o sistema hifenado (ilustrado na Figura 15) foi implementado no Laboratório de Análise Inorgânica (LABIN).

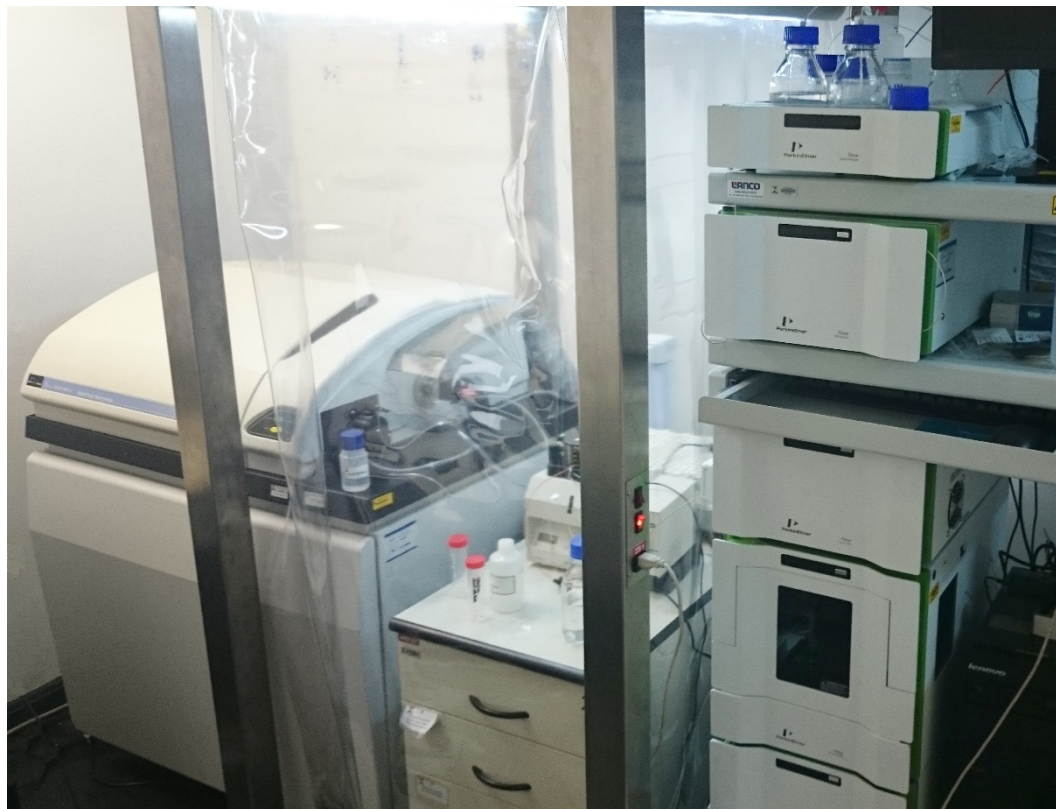


Figura 15: Sistema HPLC-ICP-MS montado no Inmetro.

Para a determinação dos fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS foi desenvolvido um método utilizando-se a cromatografia de par iônico. Os principais parâmetros ajustados foram: a fase estacionária utilizada, a concentração da fase móvel e o gradiente a ser utilizado para permitir a separação consistente dos fragmentos de interesse. O método foi otimizado utilizando-se um DNA ladder de 100 BP. O resumo das condições escolhidas é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Condições cromatográficas escolhidas para determinação de fragmentos de DNA contendo platina.

Coluna HPLC	Discovery HS F5 (150 x 2.1 mm)
--------------------	--------------------------------

Fase móvel A	Acetato de Trietilamônio 0,5 M	
Fase móvel B	Acetato de Trietilamônio 0,5 M em 25% ACN	
Vazão	0,17 mL min ⁻¹	
Volume de Injeção	5 µL	
Temperatura do forno	40 °C	
Gradiente		
Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,0	100	0
25	70	30
1	0	100
1	0	100
1	100	0
15	100	0

4. Resultados e discussão

4.1 Estudo de separação cromatográfica aplicado a drogas à base de platina

No desenvolvimento do método cromatográfico para a separação das espécies de platina, as primeiras tentativas basearam-se nos experimentos apresentados por Hann *et al.* (Hann *et al.*, 2005; Falta *et al.*, 2011) e objetivavam a separação das drogas contendo platina em sua forma intacta e dos seus produtos de hidrólise. Além disso, visou-se detectar outras espécies de platina que se formam em meio aquoso e com fluidos biológicos como urina. Nessa etapa, também se estabeleceu o acoplamento entre um sistema de HPLC com o sistema ICP-MS, implementando o seu funcionamento na PUC-Rio. As condições de operação do sistema ICP-MS para determinação de platina (^{194}Pt) foram as indicadas na Tabela 2.

Iniciou-se os experimentos utilizando-se uma coluna para cromatografia de troca de íons Hamilton PRP-X100, e com fase móvel aquosa composta por 20 mmol L⁻¹ de NH₄OH com pH ajustado para 4,5 com uso de ácido fórmico, e 4% v/v de metanol. Durante a corrida cromatográfica, para favorecer a eluição das espécies com mais afinidade com a fase estacionária, realizou-se um gradiente com metanol, introduzindo-o através de um canal da bomba quaternária. A proporção de metanol puro na fase móvel foi aumentada de 0 até 10% entre o sexto e o oitavo minuto da corrida, em seguida, a composição original foi retomada. Este regime se mostrou eficaz para separação de cisplatina e carboplatina intactas. Na Figura 16 é apresentado o cromatograma obtido para uma solução aquosa contendo 200 µg L⁻¹ de cisplatina. Já na Figura 17 é apresentado o cromatograma obtido para uma solução contendo 50 µg L⁻¹ de carboplatina e na Figura 18 pode-se observar o cromatograma obtido para uma solução contendo uma mistura das duas drogas em uma solução aquosa contendo 0,9% NaCl.

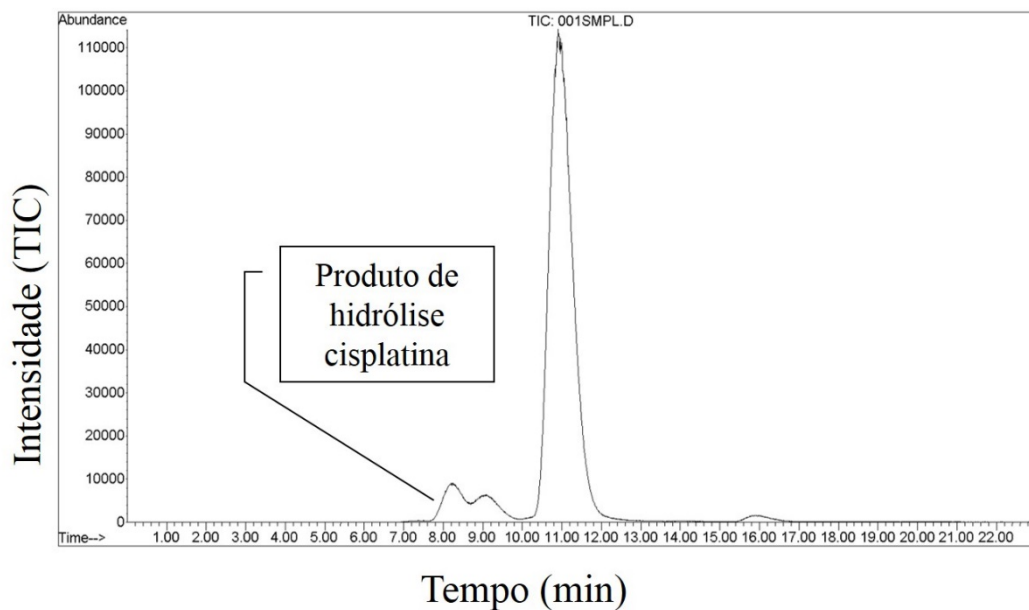


Figura 16: Cromatograma de uma solução contendo $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de cisplatina em soro fisiológico.

Os cromatogramas obtidos apresentaram boa resolução e permitiram identificar sinais de espécies de platina previstas para a amostra. No cromatograma mostrado na Figura 16 observou-se aos 8 min e aos 9 min sinais relativos aos principais produtos de hidrólise da cisplatina, os complexos monoaqua e diaqua, e aos 11 min observou-se o sinal referente à droga intacta.

No cromatograma da Figura 17 se identificou um sinal referente à carboplatina intacta aos 16 min. Aos 11 min observou-se um sinal de cisplatina formada pelos ions cloreto e a carboplatina após a hidrólise. Já aos 8 min e 9 min observaram-se sinais menores referentes aos complexos monoaqua e diaqua, produtos de hidrólise comuns à cisplatina e à carboplatina.

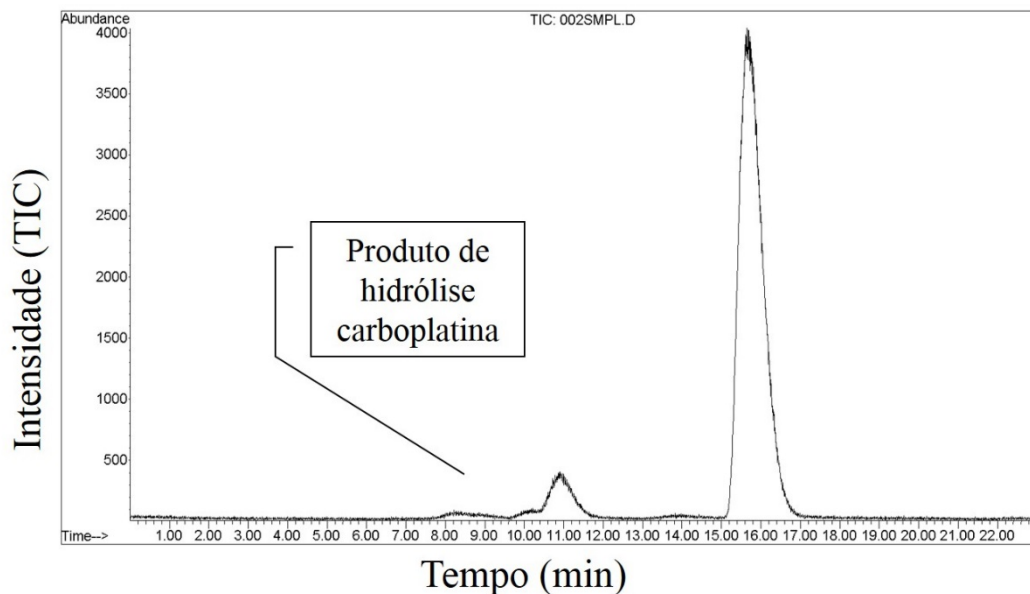


Figura 17: Cromatograma de uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de carboplatina em soro fisiológico.

Os tempos de eluição para as diferentes drogas intactas foram adequados para uma separação das duas drogas num mesmo cromatograma e não se esperava sobreposição de picos, tornando o método adequado para a separação dessas drogas. Na Figura 18 é apresentado o cromatograma de uma amostra contendo as duas drogas (cisplatina e carboplatina).

Os resultados apresentados na Figura 18 foram coerentes com o esperado, uma vez que a cisplatina e a carboplatina se decompõe nas espécies monoaquá e diaquá principalmente, e a carboplatina se degrada formando cisplatina em meio com alto teor de cloreto. Os tempos de retenção das drogas foram bastante consistentes nos cromatogramas obtidos com as soluções isoladas e com a mistura de drogas. Como a coluna utilizada tinha fase estacionária menos polar (característico de cromatografia de fase reversa), mas modificada quimicamente para a separação de ânions, observou-se que quanto mais rico em elétrons é a molécula, maior seu tempo de retenção. No caso, a carboplatina possui dois grupos carbonila que lhe conferem maior interação com a coluna em relação à cisplatina.

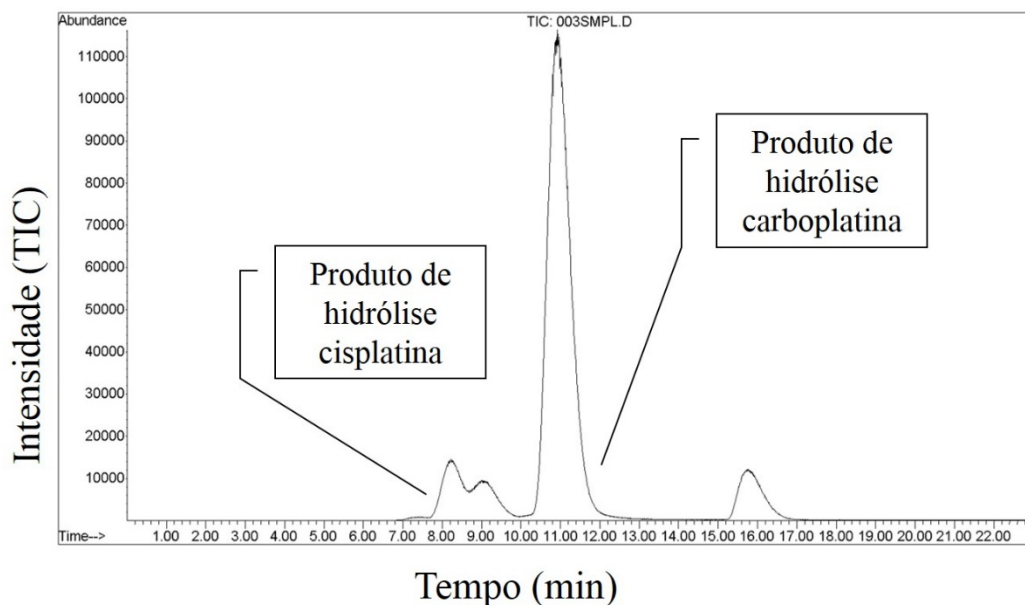


Figura 18: Cromatogramas apresentando as espécies de Pt presentes em uma solução aquosa da mistura de cisplatina e carboplatina.

Estas condições experimentais não se mostraram adequadas para a observação da oxaliplatina, ou para a separação desta das outras drogas. Variações na concentração do tampão da fase móvel e nos gradientes utilizados não foram suficientes para obter-se uma separação adequada da oxaliplatina. O caráter menos polar desta droga, aparentemente, favoreceu forte interação com a coluna fazendo com que se observa-se banda com uma longa cauda desde os 7 min, seguida de um aumento contínuo da altura da linha de base até o fim do cromatograma aos 22 min. Após 10 min de condicionamento a linha de base retornava à sua altura original.

Em seguida, iniciou-se os trabalhos com a coluna Discovery HS F5, que apresenta um grupamento pentafluorofenil ligado à cadeia C18, conferindo à coluna típica de cromatografia de fase reversa um caráter mais polar que permitiria a separação de espécies com diferentes polaridades. Com o ajuste da fase móvel, através de gradientes de metanol, foi possível separar, em uma única corrida cromatográfica, as três drogas estudadas. Este estudo teve um caráter de avaliação do sistema cromatográfico implementado.

As condições cromatográficas para a coluna Discovery HS F5 foram ajustadas de tal forma a maximizar a separação das espécies, melhorando a resolução dos sinais obtidos. A minimização do tempo total de corrida

cromatográfica (medido em função do tempo de retenção da espécie mais retida) foi de fundamental importância, pois permite maior frequência analítica, economia de argônio e de solventes e diminuição de problemas com o sistema ICP-MS devido à introdução de compostos orgânicos no plasma. Para se minimizar a quantidade de matéria orgânica introduzida no plasma, e que poderia causar instabilidades no mesmo além da deposição de carbono em partes críticas do sistema, a quantidade de metanol foi minimizada no gradiente de eluição. Na

Tabela 4 são apresentadas as condições cromatográficas escolhidas para separação de uma mistura de cisplatina, carboplatina e oxaliplatina e seus respectivos produtos de hidrólise.

Tabela 4: Condições cromatográficas otimizadas para separação de drogas à base platina intactas e produtos de hidrólise em meio aquoso e fluidos biológicos.

Coluna		Discovery HS F5 (150 x 2.1 mm)	
Fase móvel A		Água	
Fase móvel B		20 mmol L ⁻¹ formiato de amônio	
Fase móvel C		Metanol	
Vazão		0,50 mL min ⁻¹	
Volume de Injeção		5 µL	
Temperatura do forno		45 °C	
Gradiente			
Tempo (min)	A(%)	B(%)	C(%)
0,0	50	50	0
6,0	43	50	7
13,0	43	50	7
13,5	50	50	0
20,0	50	50	0

Utilizando-se as condições cromatográficas indicadas obteve-se a separação das espécies de platina advindas da hidrólise da cisplatina em soro fisiológico, carboplatina e oxaliplatina.

Como previsto, no cromatograma da cisplatina, apresentado na Figura 19, observam-se dois sinais. O primeiro, com tempo de retenção de 5,5 min, relativo à

cisplatina intacta e o segundo, com tempo de retenção de 7,0 min, foi produzido pelos produtos de hidrólise do fármaco. Devido à baixa extensão da hidrólise no meio salino, esse sinal é menos intenso que o da droga intacta. O cromatograma da carboplatina (Figura 20) apresentou um sinal bem definido da droga intacta, no tempo de retenção de 11 min, e um sinal muito sutil decorrente de degradação da droga aos 9 min.

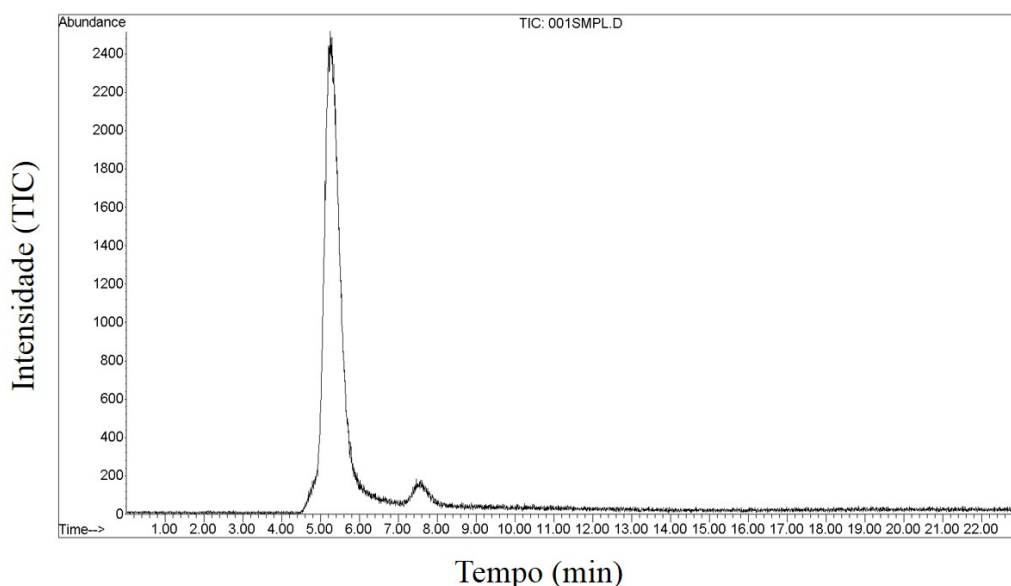


Figura 19: Cromatogramas da separação de espécies de platina em uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ cisplatina em soro fisiológico.

O cromatograma da oxaliplatina (Figura 21) também indicou sinais de que a droga se apresenta hidrolisada já em solução. Pode-se observar o sinal relativo à droga intacta, no tempo de retenção de 17 min, e um pequeno indício de degradação no sinal com retenção em 7 min.

O cromatograma da mistura das três drogas (Figura 22) mostrou claramente os sinais das drogas intactas, e as espécies hidrolisadas. Embora os tempos de retenção dos sinais nos cromatogramas das drogas isoladas não tenham indicado sobreposição destes com produtos de hidrólise, na análise da mistura de drogas, não foi possível identificar se existe co-eluição de espécies nas zonas do cromatograma da mistura, em especial dos produtos de hidrólise em torno de 7 min. Seria necessária uma análise por espectrometria de massa com ionização por eletrospray de modo a se detectar e identificar as espécies moleculares presentes em cada sinal cromatográfico.

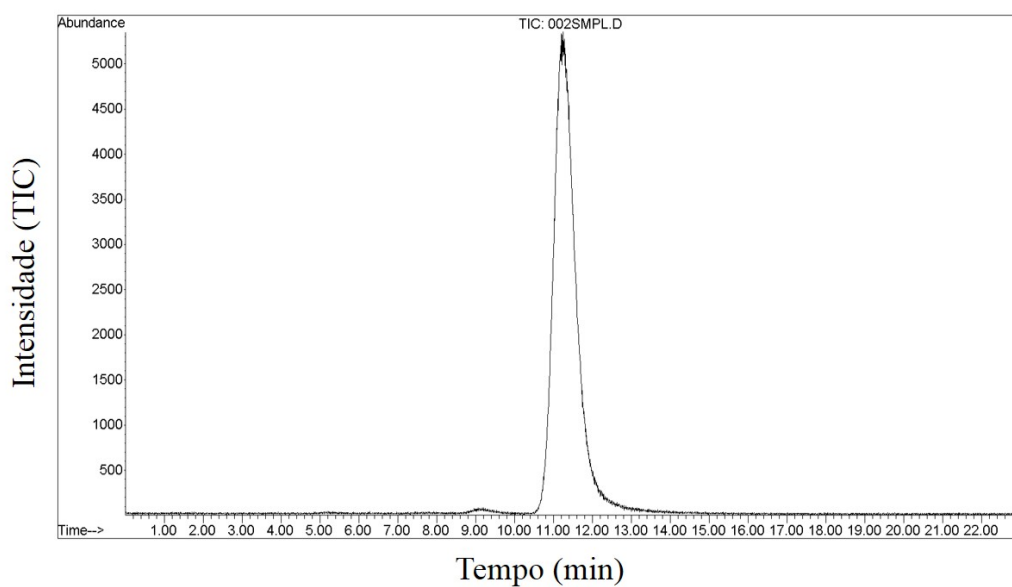


Figura 20: Cromatograma apresentando a separação das espécies de platina em uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de carboplatina

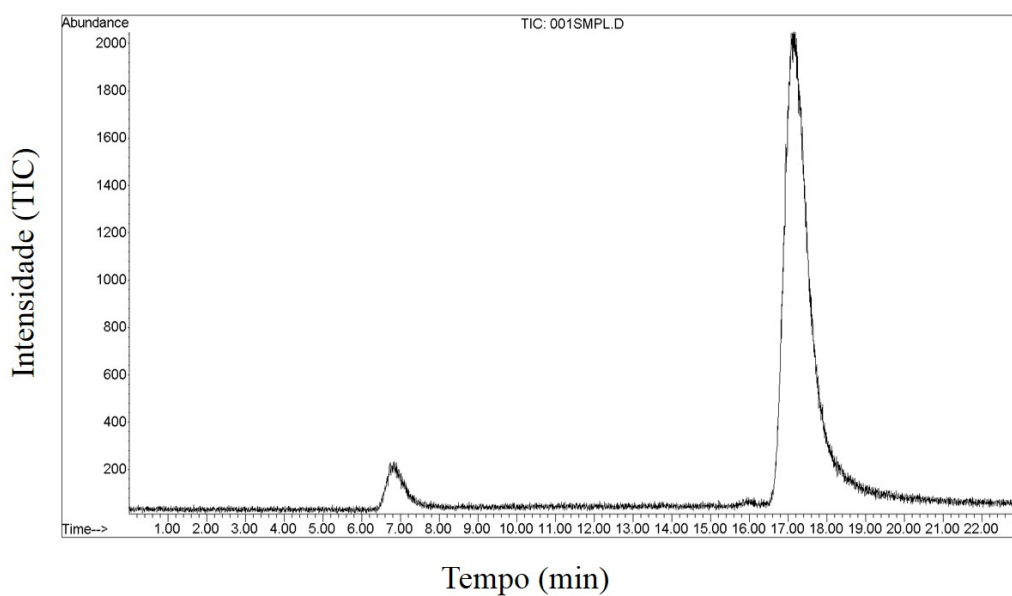


Figura 21: Cromatograma de uma solução de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de oxaliplatina em água

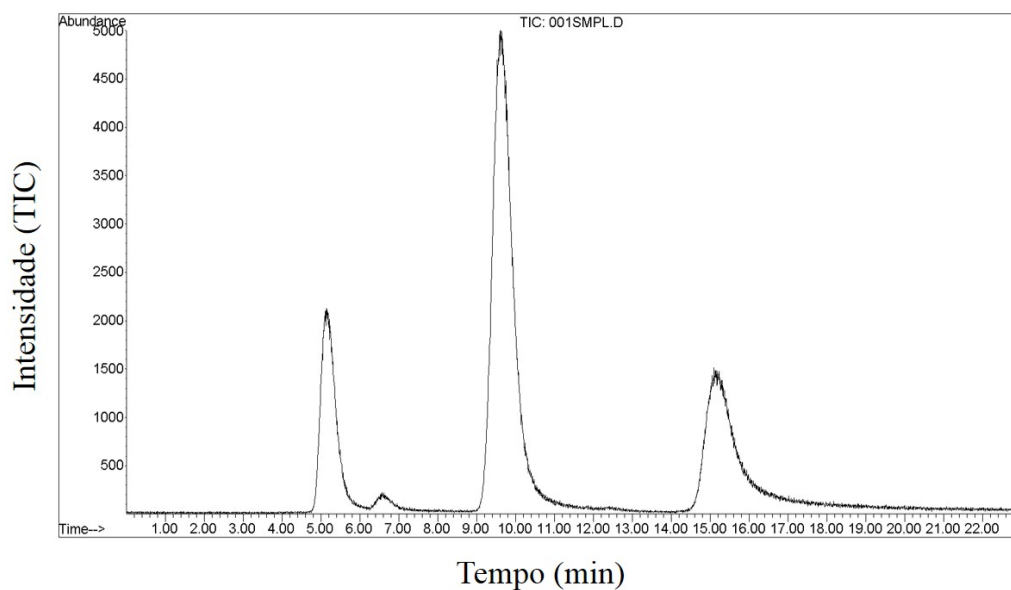


Figura 22: Cromatograma das três drogas diluídas em um soro fisiológico a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uma.

Nas condições escolhidas para a separação cromatográfica e para a determinação de Pt, iniciou-se testes em matrizes biológicas. Para tanto, coletou-se urina isenta de platina de um voluntário (já que este não é um elemento presente em quantidades mensuráveis nos fluídos biológicos de um indivíduo saudável) e incubou-se oxaliplatina nesta matriz a uma concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Fez-se a análise de especiação da platina na urina em dois momentos distintos: logo após a adição da droga à urina e após 24 h de incubação da droga na matriz. Os resultados são apresentados nos cromatogramas nas Figura 23 e 24.

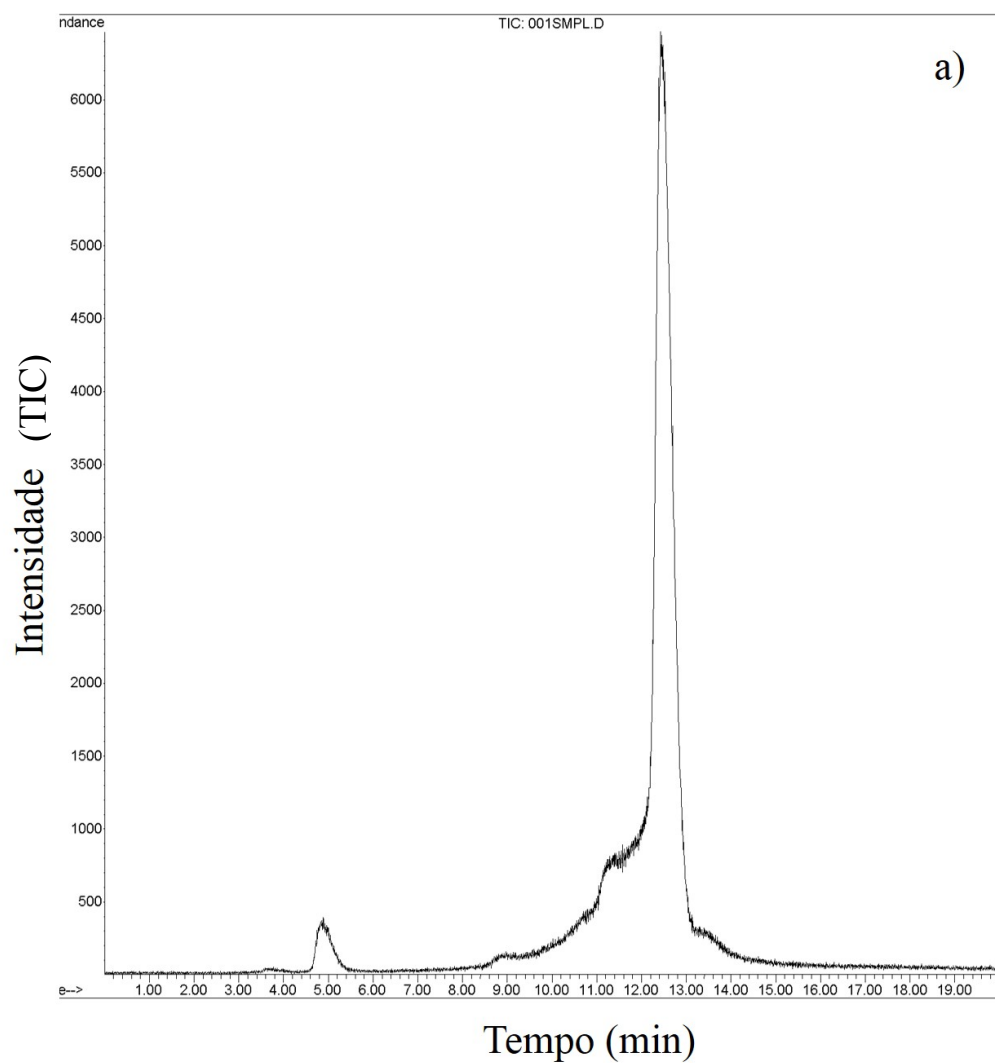


Figura 23: Cromatogramas da oxaliplatina solubilizada em urina imediatamente após o preparo da solução.

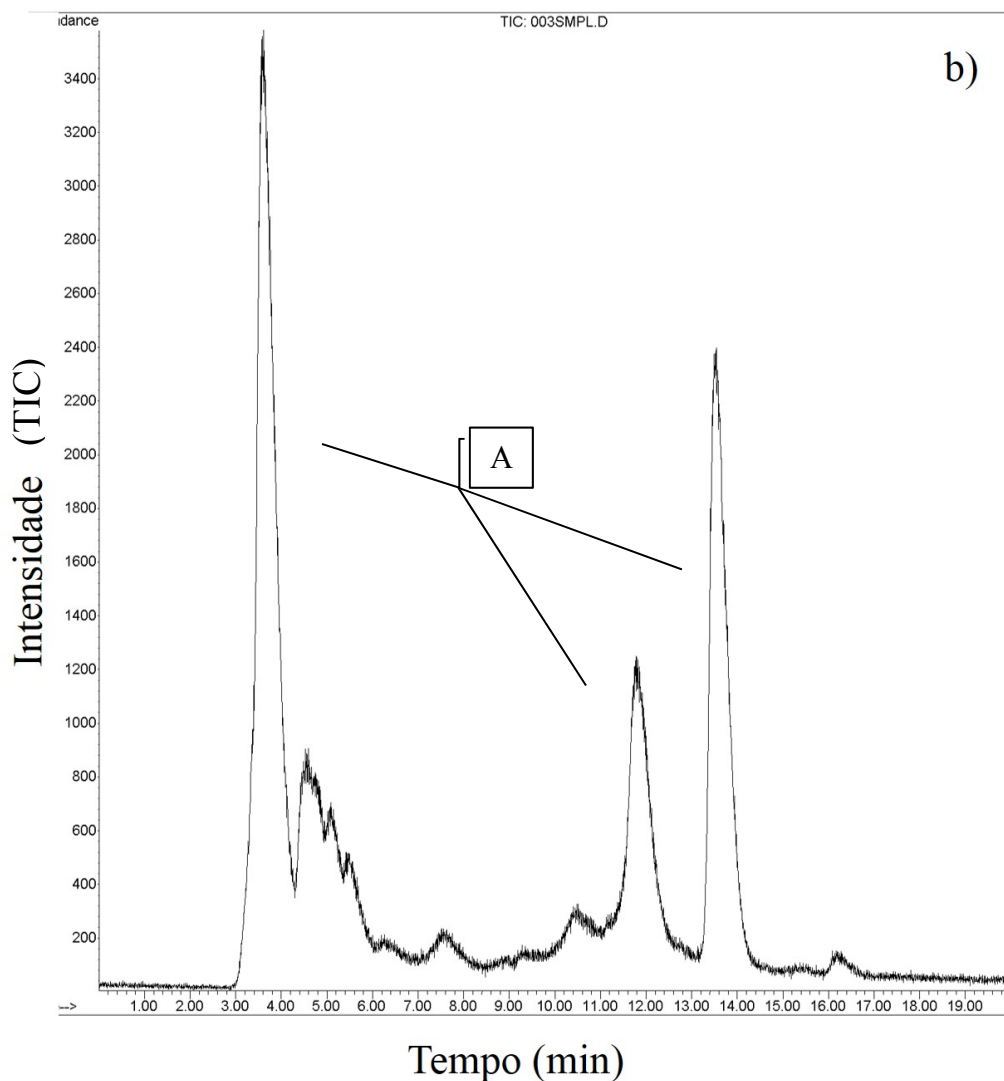


Figura 24: Cromatogramas obtido 24 h após a solubilização da oxaliplatina em urina. “A” indica os picos comuns encontrados na urina incubada com oxaliplatina e urina advinda de um paciente tratado com oxaliplatina (ver Figura 25).

Imediatamente após a fortificação com a droga, a amostra foi filtrada com uma membrana com poros de 0,45 μm de diâmetro e injetada no sistema cromatográfico (Figura 23). Observou-se um cromatograma muito semelhante ao da oxaliplatina pura em água (Figura 21). Após 24 h de incubação, uma grande quantidade de espécies na amostra, oriundas da reação da droga com minerais e biomoléculas contidas na urina, foram também detectadas (Figura 24).

Outro experimento foi realizado com a urina de um paciente em tratamento com oxaliplatina. A amostra foi coletada 72 h após a infusão da segunda seção de quimioterapia. A amostra foi conduzida ao laboratório e uma alíquota foi analisada aproximadamente 1 h após sua coleta. Em seguida a amostra foi

acondicionada em geladeira a 4°C. No tempo de 24 h após sua coleta, outra alíquota foi analisada. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 25 e na Figura 26.

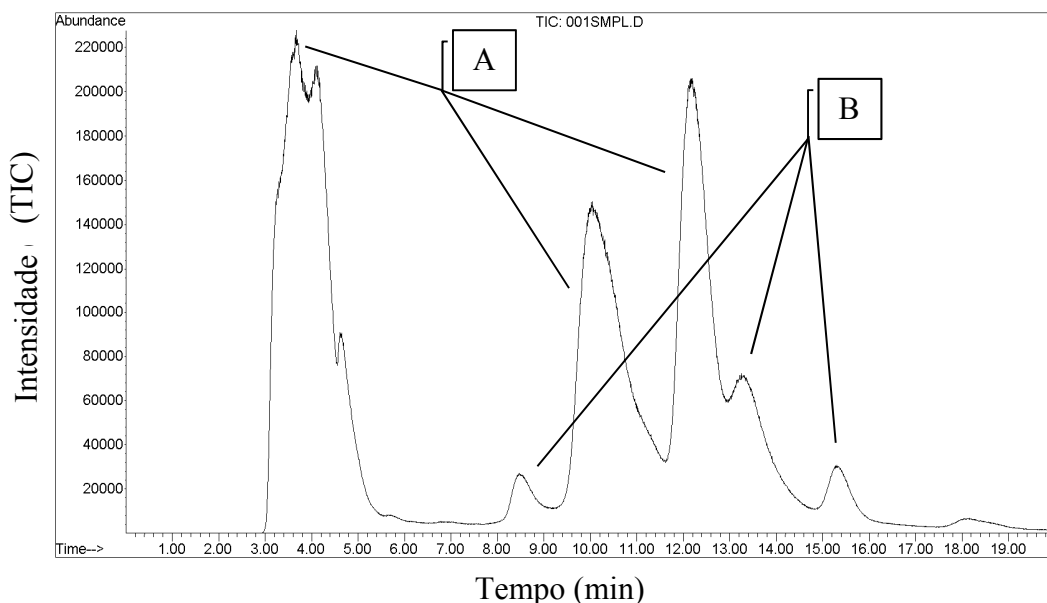


Figura 25: Urina de uma paciente tratado com oxaliplatina coletada 72 h após a infusão e analisada 1 h após a coleta. “A” representa os sinais comuns aos observados na urina incubada com oxaliplatina por 24 h; e “B” são os picos referentes a metabólitos da oxaliplatina observados apenas nas amostras oriundas de paciente em tratamento com o fármaco.

No cromatograma obtido logo após a coleta da amostra detectou-se sinais com os mesmos tempos de retenção observados na amostra de urina incubada, por 24 h, com oxaliplatina. Os sinais comuns aos dois cromatogramas estão marcados com a letra A nas Figura 24 e Figura 25. O cromatograma da urina do paciente também apresentou diversas biomoléculas oriundas do metabolismo da oxaliplatina, que não puderam ser observadas na incubação *in vitro* da droga em urina (marcadas na Figura 25 como B), permitindo inferir-se a presença de metabólitos da droga oriundos de outras partes do corpo, que chegaram ao trato urinário através da filtração sanguínea nos rins.

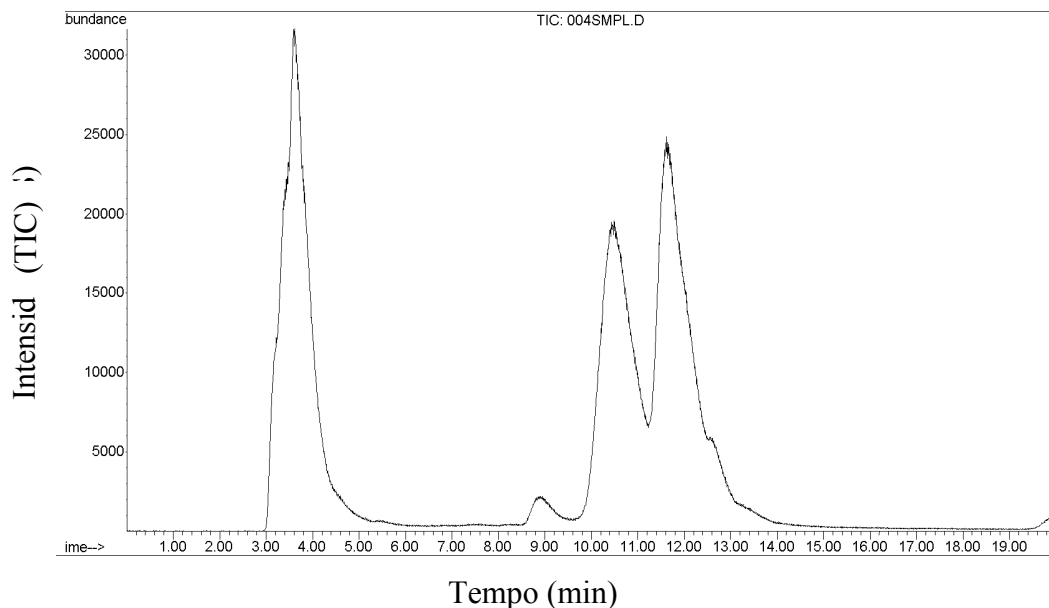


Figura 26: Urina de um paciente tratado com oxaliplatina coletada 72 h após a infusão da droga e analisada 24 h após a coleta após armazenamento à 4 °C.

Analisando-se a mesma amostra 24 h após a sua coleta, foi possível constatar a degradação de alguns metabólitos observados na análise realizada no dia da coleta. A modificação no número de sinais presentes nos cromatogramas, especialmente os referentes a metabólitos da oxaliplatina marcados na Figura 25 com a letra B, indicando a instabilidade destes metabólitos.

Estudos para conservação da amostra em diversas temperaturas foram realizados acondicionando-as nas temperaturas de 20; 4 e -20. As amostras acondicionadas nas três temperaturas testadas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, após 24 h de armazenamento, como o mostrado na Figura 26. Nesta etapa do trabalho foi possível avaliar a reatividade das drogas à base de platina em fluidos biológicos e a instabilidade das amostras reais, explicitando complexidade da especiação da platina em urina e a necessidade de se encontrar uma maneira adequada para preservação da amostra. Os estudos também indicaram a dificuldade em encontrar um biomarcador confiável e estável presente nesta via, pois a rápida degradação dos metabólitos presentes na urina torna a sua determinação difícil.

Com estes experimentos também foi possível verificar o funcionamento apropriado e a estabilidade do sistema HPLC-ICP-MS implementadas na PUC-

Rio. As corridas cromatográficas não geraram instabilidades no plasma nem perdas de sinal perceptíveis no decorrer das análises realizadas já que não foram observados depósitos de fuligem ou de sais sobre os cones do sistema de ICP-MS e não houve necessidade de modificação das diferenças de potencial aplicadas às lentes iônicas, indicando que as mesmas permaneciam limpas durante os experimentos. Logo a metodologia se mostrou robusta e adequada para os estudos posteriores (Araujo, 2011).

4.2 Estudos com células

Na tentativa de melhor compreender o metabolismo das drogas à base de platina iniciou-se o cultivo de células de diversas linhagens para, posteriormente expô-las às drogas e em seguida avaliar os efeitos obtidos. Na Figura 27 são apresentadas as microscopias de duas linhagens de células em cultura utilizadas no trabalho. A primeira (Figura 27-a) é da linhagem H460, que se trata de uma linhagem celular de câncer de pulmão aderente, isto é, para se estabilizar e reproduzir a célula necessita estar em contato com a parede do frasco de cultura e com outras células vizinhas. A segunda linhagem, Figura 27-b, é a Lucena, que é uma leucemia não aderente, em que as células crescem envolvidas apenas pelo meio de cultura.

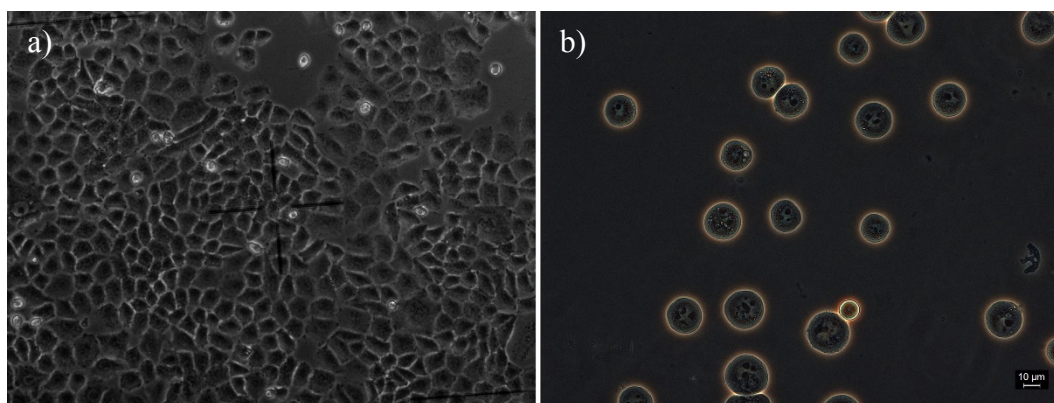


Figura 27: Células em cultura. a) H460 e b) Lucena.

Primeiramente avaliou-se o índice de morte celular provocado por diversas concentrações de cisplatina. Este estudo foi fundamental para a determinação da dose a ser administrada às culturas de modo a proporcionar um índice de morte celular mensurável utilizando-se a concentração da droga próximo aos níveis utilizados na clínica. Os estudos para avaliação do nível de apoptose foram

conduzidos utilizando-se oito (8) concentrações entre 0,1 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cisplatina. Após a exposição à droga, as células foram marcadas com iodeto de propídeo e avaliadas por citometria de fluxo que produziu os diagramas apresentados nas Figura 28 e Figura 29.

Os experimentos por citometria de fluxo mostram que, inicialmente, a cultura de K562 apresenta viabilidade normal, a maior parte em G1 indicando que a cultura está estável. Um percentual de células em S indicou que uma fração destas células iniciou o processo de duplicação de seu material genético para a divisão celular por mitose. O outro pico em G2 é referente às células que já têm todo seu material genético duplicado e estão prontas para a divisão celular. Quando a concentração de cisplatina foi aumentada (ver Figura 28-B) observou-se uma diminuição do pico de G1 e um aumento do pico em G2. Essa parada de ciclo indica o típico dano ao DNA provocado pela cisplatina, quando o sistema de reparo tenta reestabelecer a estrutura do DNA, enquanto isso não ocorre mitose.

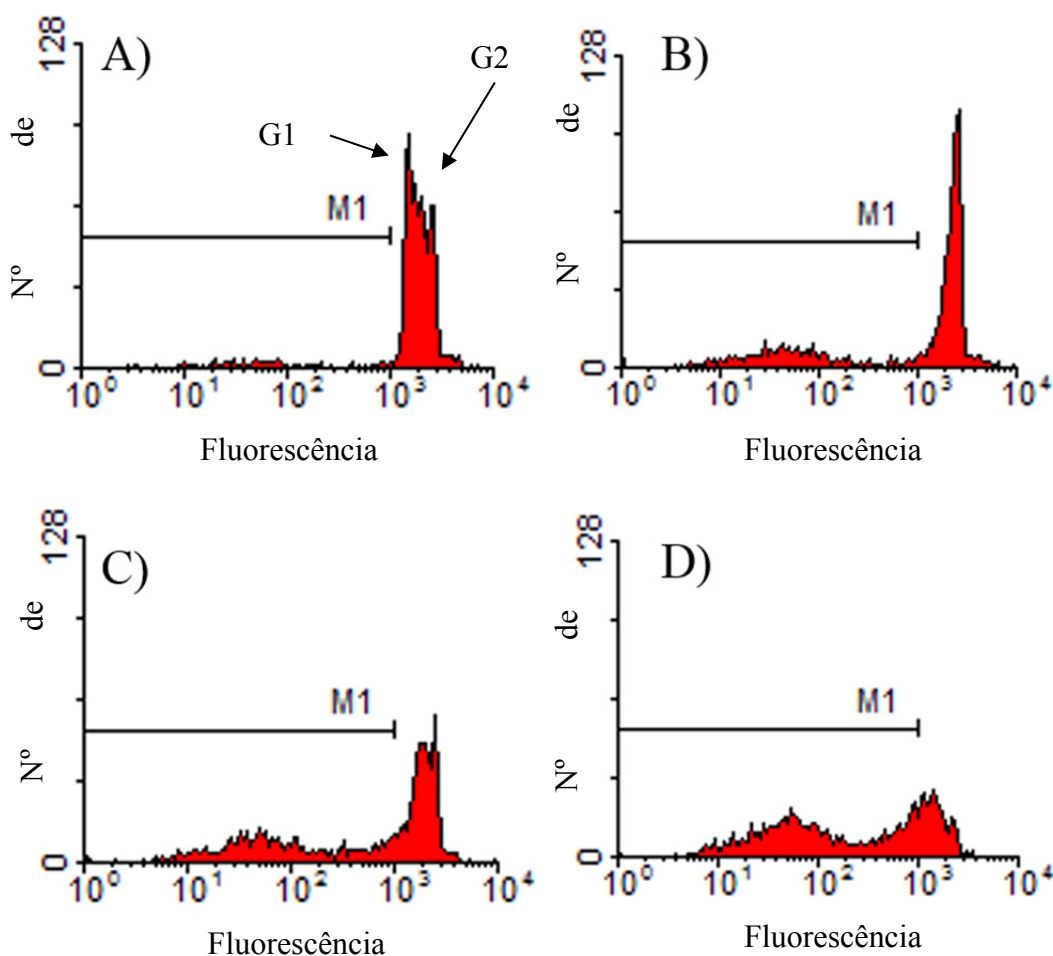


Figura 28: Resultados de viabilidade celular por citometria de fluxo. Incubação de K562 por 48 h com diferentes concentrações de cisplatina: A) controle; B) cisplatina 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C) cisplatina 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D) cisplatina 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$;

A medida que o sistema de reparo se mostra ineficiente em remover o dano causado ao DNA pela cisplatina, inicia-se o processo morte celular por apoptose. Assim se constatou um aumento da população sub-G1 (M1), que representa células já fragmentadas com conteúdo de DNA menor que de células saudáveis (Figura 28 C e D). Esta fragmentação de DNA é característica do processo de apoptose tanto células sensíveis (Figura 28) quanto de células resistentes e os resultados para a linhagem Lucena apresentam o mesmo padrão (Figura 29).

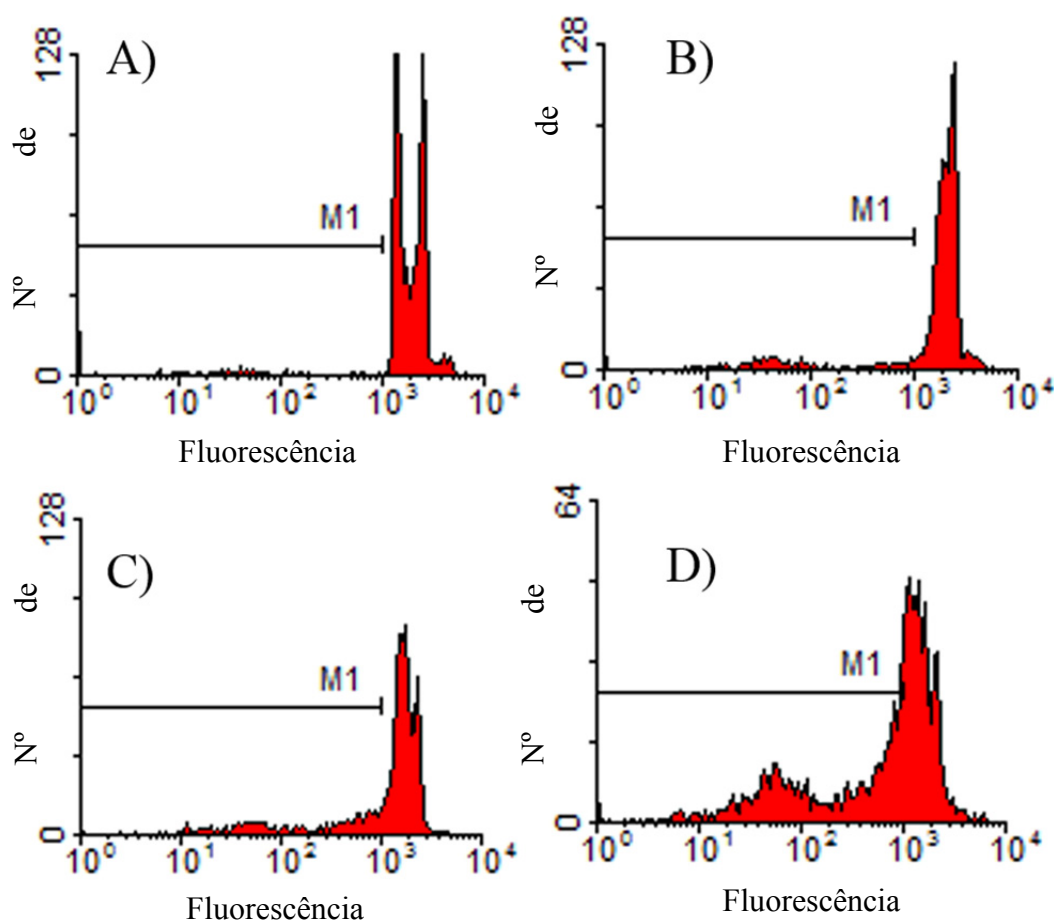


Figura 29: Resultados de viabilidade celular por citometria de fluxo. Incubação de Lucena por 48 h com diferentes concentrações de cisplatina: A) controle; B) cisplatina 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C) cisplatina 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; D) cisplatina 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$;

O modelo melhor aceito para a citotoxicidade das drogas à base de platina é sua capacidade de se ligar ao DNA formando adutos contendo platina. Este dano causado ao DNA, por sua vez, induz a apoptose em células sensíveis. Um importante mecanismo de resistência é a capacidade das células de substituírem estes fragmentos de DNA danificados pela ligação com a platina por novas bases, dando continuidade ao ciclo celular. Estes fragmentos removidos são indicados como possíveis biomarcadores de resistência às drogas à base de platina. Este estudo foi conduzido para determinar as condições experimentais que forneceriam uma boa fragmentação do DNA, permitindo uma busca por biomarcadores através da comparação dos fragmentos obtidos de células resistentes e células sensíveis.

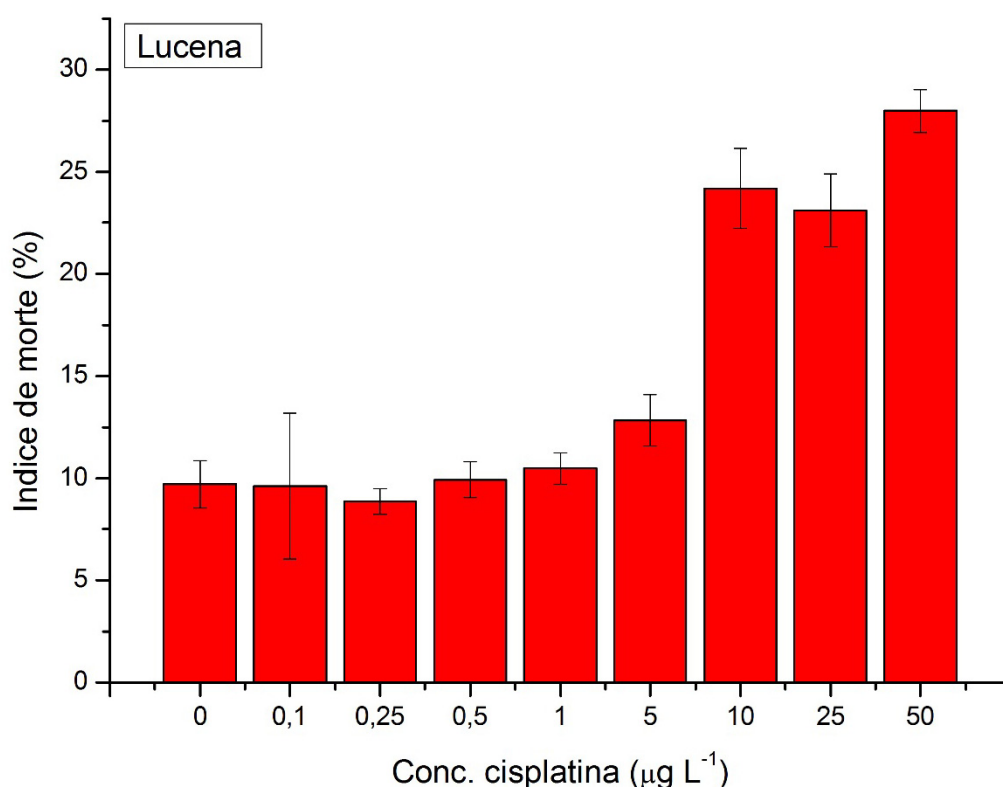


Figura 30: Índice de apoptose para linhagem Lucena.

Na Figura 30 é apresentado o percentual de morte da linhagem Lucena em função da concentração de cisplatina. Pode-se observar que concentrações abaixo de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ não produzem resultados significativos no período de 48 h, e que, a partir de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, o nível de apoptose alcança um patamar que só é alterado

para concentrações muito mais altas. Logo optou-se pelo uso da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ na realização dos experimentos.

O mesmo tipo de avaliação foi realizado para células da linhagem K562, entretanto concentrações mais altas das drogas não foram testadas devido ao perfil de resposta observado para concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para este nível, constatou-se mais de 70% de morte celular, tornando desnecessários os testes com concentrações mais altas de cisplatina. Os resultados são apresentados na Figura 31.

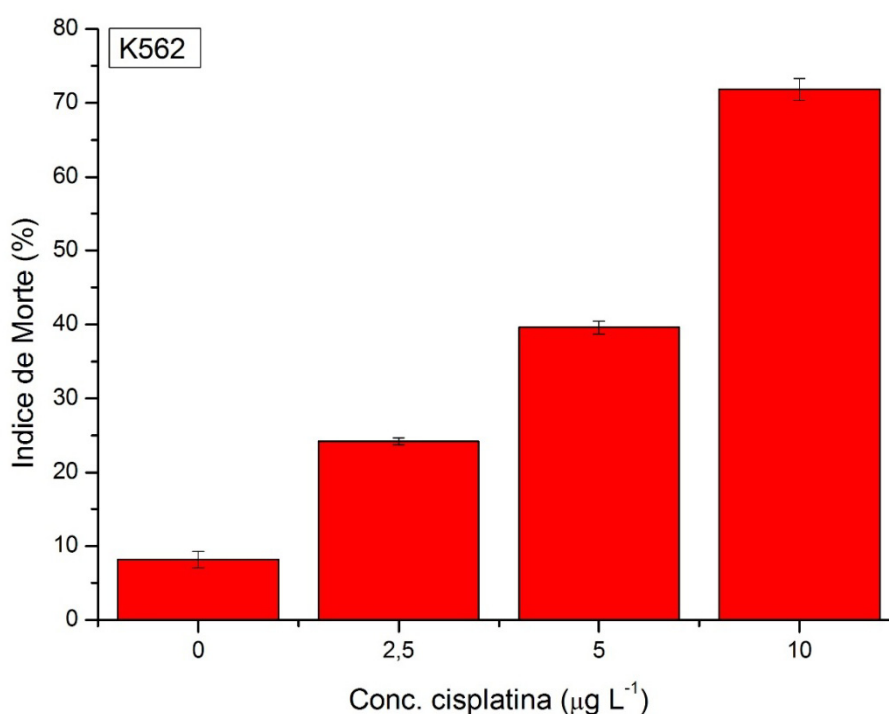


Figura 31: Índice de morte celular para linhagem K562.

Os percentuais de morte celular apresentados pela linhagem K562, conforme previsto, foram maiores que os apresentados pela linhagem Lucena, evidenciando a resistência desta segunda ao fármaco testado.

Além dos estudos do efeito de concentração da droga na população de células, conduziu-se também estudos de tempo de incubação da droga. Para tal, estudou-se tempos entre 2 e 72 h de exposição à cisplatina. Tanto a linhagem K562 quanto a H460 apresentam sensibilidade significativa à droga em tempos superiores a 6 h. Já a linhagem Lucena se mostrou resistente aos efeitos da droga por um tempo mais longo, com baixos índices de morte em tempos inferiores à 48 h. Para a obtenção de uma quantidade de fragmentos de DNA apropriada aos

experimentos subsequentes, é desejável um índice de morte próximo a 30%. Para a significância e possibilidade de comparação entre as culturas estabeleceu-se então um tempo de 48 h para os estudos com todas as linhagens de células.

Do ponto de vista da busca pelo entendimento da cinética de entrada e saída das drogas, através da membrana plasmática, o estudo com modelo celular foi fundamental para a definição dos experimentos subsequentes desta tese. Por meio destes pôde-se estabelecer a dose que provocava os efeitos esperados nas diferentes linhagens celulares, ou seja, como a droga se distribui e as faixas de concentração de platina encontradas em cada fração. Além disso, foi investigado, através de estudos por citometria de fluxo, um dos possíveis mecanismos de resistência da linhagem Lucena através de um experimento para avaliação do funcionamento das bombas de efluxo nas células. Na Figura 32 são apresentados os resultados obtidos.

Em vermelho observou-se a autofluorescência das células (Figura 32-a) e em verde, a fluorescência da célula tratada com 400 nmol L⁻¹ de rodamina 123, um fluorocromo, que foi admitido no interior da célula, e é substrato para a bomba Pgp, isto é, a rodamina é reconhecida pela proteína de membrana e é retirada do meio intracelular com consumo de ATP (Figura 32-b). Em preto se tem células tratadas com rodamina e cisplatina (Figura 32-c) e em roxo observa-se as células tratadas com rodamina as quais foram também tratadas com a adição do inibidor de bomba verapamil. Esta droga inibe o funcionamento da bomba Pgp, propiciando um maior acúmulo da rodamina no interior da célula e consequentemente fluorescência mais intensa (Figura 32-d). Por fim, em azul, observou-se o resultado do sistema que foi inibido com verapamil após a adição de cisplatina (Figura 32-e).

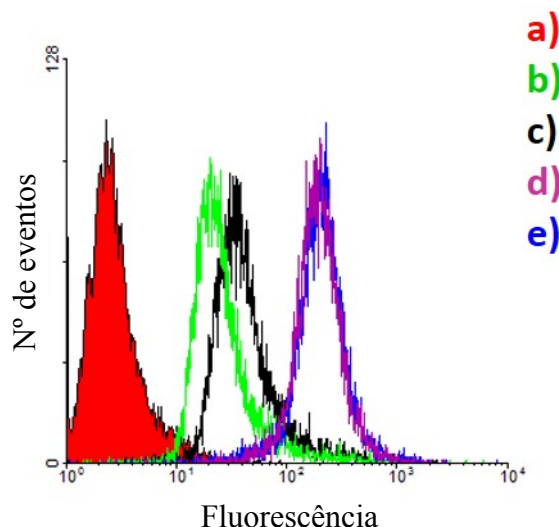


Figura 32: Avaliação do funcionamento das bombas de efluxo Pgp por citometria de fluxo. a) autofluorescência celular, b) célula tratada com 400 nmol L⁻¹ rodamina, c) célula tratada com 10 µg mL⁻¹ cisplatina e rodamina; d) célula tratada com rodamina e 25 µmol L⁻¹ verapamil; e) célula tratada com rodamina, verapamil e cisplatina.

Com este experimento mapeou-se o funcionamento da proteína de membrana Pgp, que é aceita como um importante mecanismo de resistência multi-drogas da linhagem Lucena (Rumjanek *et al.*, 2001). Com base na fluorescência medida pôde-se observar que uma grande quantidade de rodamina é admitida na célula durante o tratamento, praticamente dobrando intensidade de fluorescência das células, mesmo com a atividade da Pgp. A cisplatina tem uma influência pequena sobre o funcionamento da bomba Pgp, diminuindo sua atividade; consequentemente a fluorescência celular é menor na presença da droga. Tal constatação indica que uma célula tratada com cisplatina não perde sua habilidade de remover a rodamina do seu interior, pois a cisplatina não influencia de forma significativa o funcionamento da proteína de membrana, que continua a diminuir a concentração da rodamina no interior celular. Observou-se também que bomba de efluxo é muito ativa na célula, removendo grande parte da rodamina de seu interior. Isso foi confirmado quando bomba Pgp foi inibida com consequente aumento da intensidade de fluorescência em uma ordem de grandeza. Isso demonstra a capacidade da Pgp de remover a rodamina do interior da célula. Isto evidencia que um mecanismo importante de resistência da linhagem Lucena é a atividade da bomba Pgp. Quando se adicionou cisplatina a este último sistema não se observou alteração na intensidade da

fluorescência, pois, neste caso, as bombas não estão funcionando. Logo, concluiu-se que a cisplatina não exerce nenhum efeito sobre o efluxo da rodamina da célula. Como ressaltado anteriormente, a bomba de efluxo Pgp não atua diretamente sobre a cisplatina, entretanto as células que apresentam superexpressão desta proteína apresentam resistência inespecífica a este fármaco, isto é, ainda não está estabelecida uma relação direta entre a atuação das bombas Pgp e a resistência à cisplatina, mas a resistência é observada.

4.3 Experimentos de acumulação celular de Pt

Paralelamente aos estudos de funcionamento da bomba Pgp, avaliou-se os níveis de acumulação de Pt pelas culturas celulares. O objetivo do estudo foi avaliar a acumulação da droga e metabólitos contendo platina pelas linhagens de células. Como um dos mecanismos de entrada de cisplatina na célula é por difusão simples, havia um receio de que muito do material absorvido pudesse ser perdido, também por difusão, durante a retirada das células do meio de cultura e também durante a etapa de lavagem. Pretendeu-se também avaliar o funcionamento sistema de efluxo de cisplatina monitorando-se a concentração de Pt em PBS (pH 7,5; 10 mmol L⁻¹) após 1h de incubação das células previamente expostas à droga.

Para o experimento utilizou-se três tempos de incubação das culturas com cisplatina: 20, 40 e 60 min. A escolha dos tempos objetivou a redução do índice de morte e degradação celular a fim se constatar o efeito da acumulação de platina na célula viva. Após a incubação das células em meio de cultura com 10 µg mL⁻¹ de cisplatina pelos tempos especificados, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para análise. O “pellet” de células foi lavado com 1 mL de PBS a 4 °C e, em seguida foi ressuspenso, também em PBS a 37 °C, sendo as células incubadas em seguida, por 1h em estufa de cultura. Após o período de incubação, centrifugou-se as culturas e coletou-se o sobrenadante para análise. O “pellet” de células foi digerido com ácido nítrico e conduzido à análise. Resumidamente, obteve-se o seguinte conjunto de amostras para determinação de Pt total a partir de cada cultura celular: 1) meio de cultura; 2) PBS utilizado para lavar o “pellet”; 3) PBS onde as células foram incubadas por 1h; 4) “pellet” de células.

A concentração de cisplatina no meio de cultura foi ajustada em $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que equivale a uma concentração de $6,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ de platina total. Para estes estudos utilizou-se aproximadamente 5×10^4 células por poço.

Para a determinação de Pt total utilizou-se as condições experimentais do ICP-MS apresentadas na Tabela 2. As amostras de meio de cultura e PBS foram diluídas em água ultrapura, o “pellet” de células foi digerido em ácido nítrico e, posteriormente, diluído em água ultrapura. Os padrões de calibração foram preparados em água e Rh foi utilizado como padrão interno.

Tabela 5: Resultados do estudo de efluxo de cisplatina pelas células K562 e Lucena.

Cultura	Concentração de Pt ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Meio de cultura	Lavado	Sobrenadante	“pellet”
K562 Controle	0*	0,2	0,10	0,07
K562 cond. 1 [†]	6572	46,3	0,89	1,95
K562 cond. 2 [†]	6679	30,9	0,80	1,92
K562 cond. 3 [†]	7068	33,9	0,84	1,95
Lucena controle	0*	0*	0,006	0,02
Lucena cond. 1 [†]	6875	43,4	1,90	3,84
Lucena cond. 2 [†]	6995	53,0	1,82	3,49
Lucena cond. 3 [†]	6518	39,0	1,67	2,89

* Valor igualado a zero devido média das medidas ser menor que um.

† Condição 1 é equivalente a 20 min de incubação; 2 a 40 minutos; e 3 a 60 minutos.

Os resultados da Tabela 5 mostraram que a concentração de Pt no meio de cultura não se alterou, isto é, constatou-se que absorção de 5×10^4 células não foi capaz de produzir uma diminuição significativa na concentração de Pt no meio. Por outro lado, as quantidades de Pt total no lavado não indicou nenhum padrão de comportamento, e foram da mesma ordem de grandeza, variando em até 50% no lavado da K562 e até em torno de 25% na Lucena. Isso permitiu concluir que a maior parte da platina presente nas amostras de lavado advém do restante de meio de cultura não removido na separação do “pellet”, isto é, pequenos volumes presentes ao redor do “pellet” de células que não foram removidos para evitar a

remoção de parte das células do precipitado. Estes volumes podem variar significativamente dependendo da consistência do “pellet”. Os valores de Pt no sobrenadante e no “pellet” foram distintos para as diferentes linhagens de células. Para a K562, as concentrações são independentes do tempo de incubação das culturas em cisplatina. Em contrapartida, para a Lucena observou-se uma correlação inversa entre o tempo e a concentração do metal determinado. Também se constatou que as concentrações de Pt nas culturas de Lucena foram maiores que nas de K562. Não foi encontrado na literatura uma explicação para este fenômeno, que parece corroborar com a teoria onde as bombas PGP não atuam sobre a cisplatina. Pode-se especular que a resistência da linhagem Lucena advém da sua capacidade de imobilização/inativação da cisplatina no meio intracelular e posterior efluxo destes metabólitos inativos. E estudos futuros podem ser desenvolvidos para avaliação deste fenômeno.

Para se ter uma dimensão do significado destes resultados, considerando a média da concentração do lavado para as culturas de K562 como $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ e considerando-se que havia aproximadamente 5×10^4 células em cada cultura, cada célula removeu $6,0 \times 10^{-17}$ mol de cisplatina de seu interior em 1h, isto significa cerca de $3,5 \times 10^7$ moléculas da droga. A Lucena removeu, em média, o dobro deste valor. Uma grande quantidade da droga permaneceu na célula mesmo após sua incubação por 1h em meio livre de cisplatina, isso demonstrou que, como descrito na literatura (Ahmad, 2010), a droga se liga de forma permanente a diversos compartimentos celulares onde é desativada ou exerce seu efeito citotóxico.

4.4 Extração de DNA e eletroforese em gel

A hipótese mais aceita para a ação citotóxica da cisplatina é a de que a droga se liga ao DNA da célula, este dano provoca uma parada no ciclo celular que evolui para apoptose. Consequentemente, um dos principais mecanismos de resistência ao tratamento com fármacos à base de Pt é o reparo do dano causado ao DNA da célula pelo sistema de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER). Este sistema é constituído por um grande número de proteínas que removem o segmento de DNA onde a platina está ligada e o substituem. Este fragmento de DNA tem características particulares dependendo do tipo de aduto a ser removido, por exemplo, quando a cisplatina se liga ao DNA em uma única fita, a proteína

responsável pela excisão é a ERCC1, o fragmento de DNA removido por esta proteína é de fita simples e possui aproximadamente 30 nucleotídeos.

Quanto maior a atividade deste sistema de reparo, maior a resistência a drogas à base de platina, e também maior a incidência de fragmentos de DNA característicos contendo platina. Logo estes fragmentos se apresentam como possíveis biomarcadores para o metabolismo de drogas à base de platina, e para o mecanismo de resistência de uma determinada linhagem de células.

Para a avaliação de fragmentos de DNA como biomarcadores, se faz necessária a sua extração das células e posterior purificação. Vale salientar que é importante saber a quantidade de DNA extraído para determinar-se o volume de solução de DNA a ser carregado no gel de eletroforese, pois uma quantidade mínima é requerida para obter-se um gel com bandas suficientemente visíveis. Consequentemente, um dos parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade da extração foi a determinação da quantidade de DNA extraído utilizando-se um espectrofotômetro Nanodrop. Este espectrofotômetro permite a avaliação da concentração de DNA utilizando-se apenas 2 µL de amostra, esta característica única permite que o DNA seja quantificado em uma alíquota da própria amostra que seguirá para eletroforese, em sistemas convencionais é necessária uma extração dedicada à quantificação do DNA.

Experimentos controle também foram realizados para verificar a recuperação das bandas extraídas e também o percentual de recuperação do conteúdo total de DNA. Os resultados indicaram que não houve perda significativa de bandas específicas, isto é, todas as bandas de DNA presentes no controle foram recuperadas. A recuperação total de DNA foi, em média, de 55%, o que é um nível apropriado para os experimentos.

Todo o DNA contido em uma célula humana representa aproximadamente 3×10^9 pares de base, e todo este conteúdo está enovelado ao redor de proteínas formando os cromossomos. Para a determinação de fragmentos removidos do DNA cromossomal pelo sistema de reparo é necessário, após a sua extração, uma separação dos fragmentos de acordo com sua massa molecular.

Um sistema hifenado com HPLC-ICP-MS se apresenta como uma alternativa poderosa para a determinação destes fragmentos, pois alia o poder de separação da cromatografia a líquido de alta eficiência e a sensibilidade e especificidade do ICP-MS. Entretanto, como o DNA genômico extraído das

células é muito grande e pode causar danos às colunas cromatográficas, uma primeira separação por eletroforese em gel de agarose é necessária para a remoção dos fragmentos de DNA de alta massa molecular presentes nas amostras. Além de separar os fragmentos de DNA de interesse, a eletroforese em gel possibilitou também uma primeira observação da resposta de diversas linhagens celulares ao tratamento com cisplatina.

Na Figura 33 são apresentados os primeiros resultados obtidos com eletroforese em gel. Dois métodos de extração de DNA foram testados para avaliar a eficiência de recuperação de cada um, utilizando duas culturas de K562, uma tratada com cisplatina a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra sem tratamento (controle). No poço *a* observa-se um DNA *ladder* de 1000 pares de base (1 kb) que contém 12 fragmentos de DNA adicionado diretamente no gel. Na raia *d* e na *g* observa-se o mesmo DNA *ladder* da raia *a* tendo passado pelas etapas de extração e purificação respectivamente usando o método 1 e o método 2. A recuperação observada para as amostras é muito diferente para cada método. A quantificação do DNA utilizando-se o sistema Nanodrop indicou recuperação de 10% da quantidade de DNA adicionado com o método 1 enquanto o método 2 possibilitou recuperação de 55%.

A corrida eletroferética do DNA *ladder* sem nenhum tratamento é apresentada na Figura 33 na raia *a*. O gel do mesmo DNA *ladder* recuperado com o método 1 (raia *d*) apresentou a perda de uma banda e uma perda significativa da intensidade de sinal e de resolução. O marcador que passou pelas etapas de extração e purificação do método 2 (raia *g*) apresentou as mesmas bandas que o marcador aplicado sem nenhum tratamento e com intensidade de banda semelhante. Na raia *b* observa-se a separação dos fragmentos de DNA de uma cultura de K562 não tratada com cisplatina. Os fragmentos foram extraídos utilizando-se o método 1; na raia *c* observam-se os fragmentos de DNA da K562 tratada com cisplatina e extraídos com o método 1. Observa-se nessas duas raia uma grande quantidade de DNA genômico, isto é, de alto peso molecular, presente em ambas as amostras (ver Figura 33, marcação em vermelho). A amostra controle, presente na raia *b*, apresenta fragmentos de baixo peso molecular em uma banda não observada na amostra tratada com cisplatina (ver Figura 33, marcação em azul). Nos poços *e*, e *f* observa-se a bandas do DNA da linhagem K562 não tratada (raia *e*) e tratada (raia *f*) com cisplatina, respectivamente. O DNA destas culturas foi extraído utilizando-se o método 2. O mesmo comportamento descrito para as amostras que tiveram o DNA

extraído pelo método 1 é observado nas amostras onde utilizou-se o método 2. O método 2 apresentou maior fidelidade na recuperação de bandas de DNA e uma melhor intensidade das bandas recuperadas. Por tanto foi utilizado para todas as extrações subsequentes.

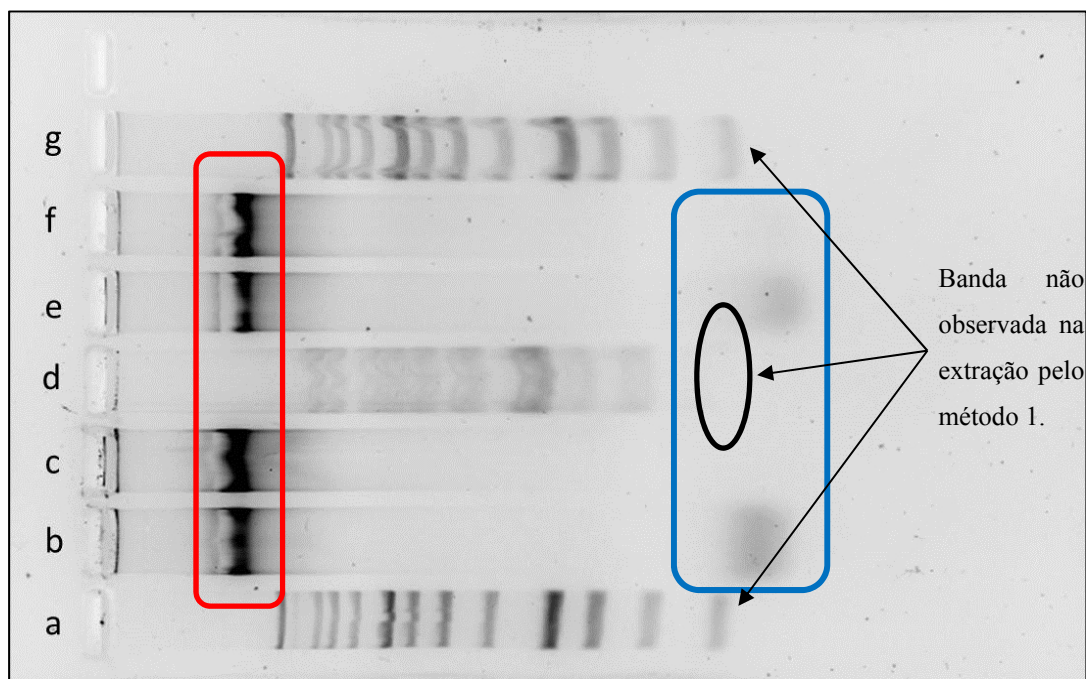


Figura 33: Resultados de eletroforese em gel. Raia *a*: DNA ladder 1 kb; raia *b*, *c* e *d* DNA ladder 1 kb, DNA de culturas de K562 sem tratamento e tratadas por 48 h com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cisplatina extraídos pelo método 1; raia *e*, *f* e *g* o mesmo que nas raia *b*, *c* e *d* com extração pelo método 2.

Na Figura 34 é apresentado o gel utilizado para separar os fragmentos de DNA de baixa massa molecular antes e depois da extração das bandas de interesse para análise por HPLC-ICP-MS. A ordem de aplicação foi: (i) no poço *a*, um controle de 3500 BP; (ii) no poço *b*, o controle de extração de DNA, o marcados de 100 BP; (iii) no poço *c*, o DNA extraído de uma cultura de K562 sem tratamento (controle K562); (iv) nos poços *d* e *e*, o DNA extraído de uma cultura de K562 tratada com cisplatina $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (v) nos poços *f*, *g* e *h* são os equivalentes dos poços *c*, *d* e *e*, porém relacionados com culturas de Lucena.

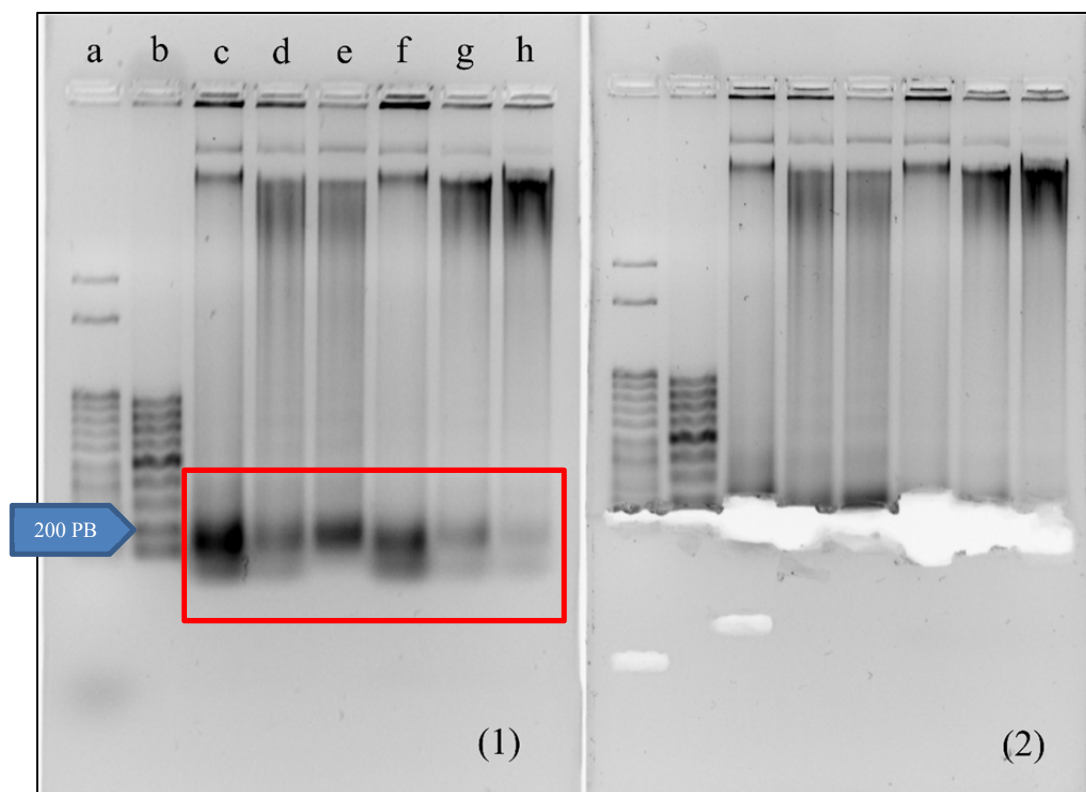


Figura 34: (1) Gel apresentando um padrão de degradação do DNA devido à apoptose induzida por cisplatina, destacando bandas com fragmentos de DNA de 200 PB. (2) Mesmo gel após a remoção das porções contendo os fragmentos de DNA de interesse.

De uma maneira geral, observou-se uma grande quantidade de fragmentos de DNA de aproximadamente 200 PB. Tais fragmentos são típicos da degradação por enzimas que atuam no processo de apoptose. Constatou-se também que o material genético apresenta um rastro desde região de introdução das amostras no gel (poços), onde o DNA genômico integro fica retido, até a região de baixa massa molecular. Este rastro indica um nível de degradação do DNA que pode ter ocorrido entre o processo de extração e a análise por eletroforese.

A região de baixa massa molecular de cada amostra foi removida do gel e coletada em tubos tipo Eppendorf de 2 mL. Procedeu-se a extração do DNA do gel utilizando-se o kit de acordo com o descrito na seção materiais e métodos para que a determinação destes pudesse ser realizada por HPLC-ICP-MS.

4.5 Determinação de fragmentos de DNA contendo platina por HPLC-ICP-MS

Anteriormente às determinações dos fragmentos de DNA por HPLC-ICP-MS, otimizou-se as condições do ICP-MS para a determinação de Pt. Utilizou-se um padrão de Pt diluído em uma solução aquosa contendo a mesma concentração de compostos orgânicos presentes na fase móvel. As condições otimizadas para o ICP-MS estão apresentadas na Tabela 6, sendo determinados os isótopos 194 e 195 da Pt. O P foi determinado para identificação dos fragmentos de DNA e o Rh foi utilizado como padrão interno pós coluna, isto é, utiliza-se um canal da bomba peristáltica para adicionar ao eluato, através de uma conexão em “T”, uma solução com concentração conhecida de Rh. Este padrão interno permite o controle da estabilidade do sinal do ICP-MS durante a corrida cromatográfica.

Tabela 6: Condições do ICP-MS para determinação de fragmentos de DNA contendo Pt.

Parâmetro	Valor
Potência de radio-frequência	1300 W
Gás de arraste	0,82 L/min
Gás <i>Make-up</i>	0,28 L/min
Bomba do Nebulizador	20 rpm
Temperatura da câmara de nebulização	10 °C

Inicialmente realizou-se alguns testes com cromatografia de separação por tamanho. Utilizando-se uma coluna Superdex 200 (GE, EUA), nas condições sugeridas pelo fabricante (elução isocrática com fase móvel que consiste de solução aquosa de Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 7) não foi possível observar mais que dois sinais para o DNA *ladder* de 100 BP, que contém 10 fragmentos de DNA. Esta abordagem se mostrou inadequada para separação de fragmentos de DNA.

Desta maneira iniciou-se os experimentos para separação dos fragmentos de DNA por cromatografia de par iônico.

O DNA possui uma alta carga superficial, consequentemente, este não interage com a coluna cromatográfica de fase reversa. Já na cromatografia de par iônico, constituintes da fase móvel apresentam uma região apolar que interage com a coluna, e uma região com carga residual positiva que interage com o DNA.

As fases móveis mais comumente utilizadas nesta técnica contém sal de amônio quaternário. O íon amônio interage com as cargas negativas do DNA e o grupamento alquila permite a interação mais efetiva do sistema sal-DNA na fase estacionária. Quanto maior a molécula de DNA mais forte será sua interação com a coluna e, conseqüentemente maior seu tempo de retenção. Um gradiente proporcionando um aumento da concentração de compostos orgânicos na fase móvel, geralmente de acetonitrila, sem a diminuição da concentração do par iônico torna a interação do DNA com a coluna menos intensa liberando as moléculas de acordo com sua massa molecular. Em primeiro lugar, as moléculas de DNA menores são desorvidas e viajam ao longo da coluna até o detector. Então, a medida que o conteúdo de solvente orgânico do eluente é aumentado, as moléculas de DNA cada vez maiores são desorvidas. Finalmente, depois que todos os fragmentos de interesse são eluídos, a coluna é limpa com um gradiente de alta concentração de fase orgânica. Finalmente, a concentração inicial do eluente é reestabelecida e a coluna é condicionada para o próximo ciclo.

Com base na literatura, nos primeiros experimentos com a cromatografia de par iônico foi utilizada uma coluna Zorbax C18 convencional (Gjerde, Hanna e Hornby, 2002). As condições de separação foram avaliadas utilizando-se um DNA *ladder* 100 BP, entretanto as separações não foram satisfatórias, observou-se todo o material sendo eluído no tempo morto e nenhuma separação dos fragmentos.

Então iniciaram-se testes com a coluna C18 modificada (Discovery HS F5), e os resultados iniciais foram muito positivos. Para o DNA *ladder* 100 BP, observou-se um sinal no tempo morto e mais quatro sinais em tempos subsequentes. Procedeu-se a otimização das condições cromatográficas, variando-se a concentração do par iônico, concentração inicial de acetonitrila e gradiente de incremento da concentração de acetonitrila na fase móvel.

Iniciou-se as separações com uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de trietilamônio. Esta concentração do par iônico não foi suficiente para diminuir o sinal no tempo morto, logo esta concentração foi incrementada para permitir uma interação mais forte dos fragmentos de DNA com a fase estacionária, proporcionando uma melhor separação. A concentração mínima de par iônico que produziu uma boa separação foi de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Uma vez otimizada, a concentração de acetato de trietilamônio na fase móvel, procedeu-se o ajuste do gradiente de acetonitrila. A acetonitrila concorre com o par iônico pelos sítios

ativos da fase estacionária, com o aumento da concentração de acetonitrila na fase móvel promove-se a dessorção dos fragmentos de DNA de acordo com seu tamanho. As condições ótimas são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições cromatográficas otimizadas para separação de fragmentos de DNA.

Coluna HPLC	Discovery HS F5 (150 x 2.1 mm)	
Fase móvel A	Acetato de Trietilamônio 0,5 mol L ⁻¹	
Fase móvel B	Acetato de Trietilamônio 0,5 mol L ⁻¹ em água/acetonitrila 75/25% v/v	
Vazão	0,17 mL min ⁻¹	
Volume de Injeção	5 µL	
Temperatura do forno	40 °C	
Gradiente		
Tempo (min)	A(%)	B(%)
0,0	100	0
25	70	30
1	0	100
1	0	100
1	100	0
15	100	0

Após o estabelecimento das condições de separação destes fragmentos de DNA obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 36. Pode-se observar, em preto, o sinal do canal de monitoramento do P, em vermelho é o canal de monitoramento do Rh e em verde o canal de monitoramento do isótopo ¹⁹⁵Pt.

Por apresentar uma massa relativa alta, a platina praticamente não sofre interferência em análises por ICP-MS, logo não houve, em nenhum cromatograma, diferença significativa entre os isótopos 194 e 195 do metal, por isso o sinal do isótopo 194 não é apresentado nos cromatogramas. A determinação do P tem como objetivo indicar que a platina está sendo determinada associada a moléculas de DNA, pois este é a única molécula presente que contém P para produzir um sinal mensurável. O fósforo apresenta um sinal de fundo alto, devido a interferências poliatômicas e isobáricas de diversos íons, entretanto em estudos

de branco injetando-se fase móvel ou tampão (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 7,5) o sinal se mantém constante ao longo da corrida cromatográfica, sofrendo um aumento de intensidade quando a concentração de acetonitrila é muito aumentada. Um cromatograma com um estudo de branco é apresentado na Figura 35. Observa-se o tempo morto próximo a 5 min provocando uma grande depleção do sinal de P. O sinal do Rh e da Pt se mantem estáveis por toda a corrida.

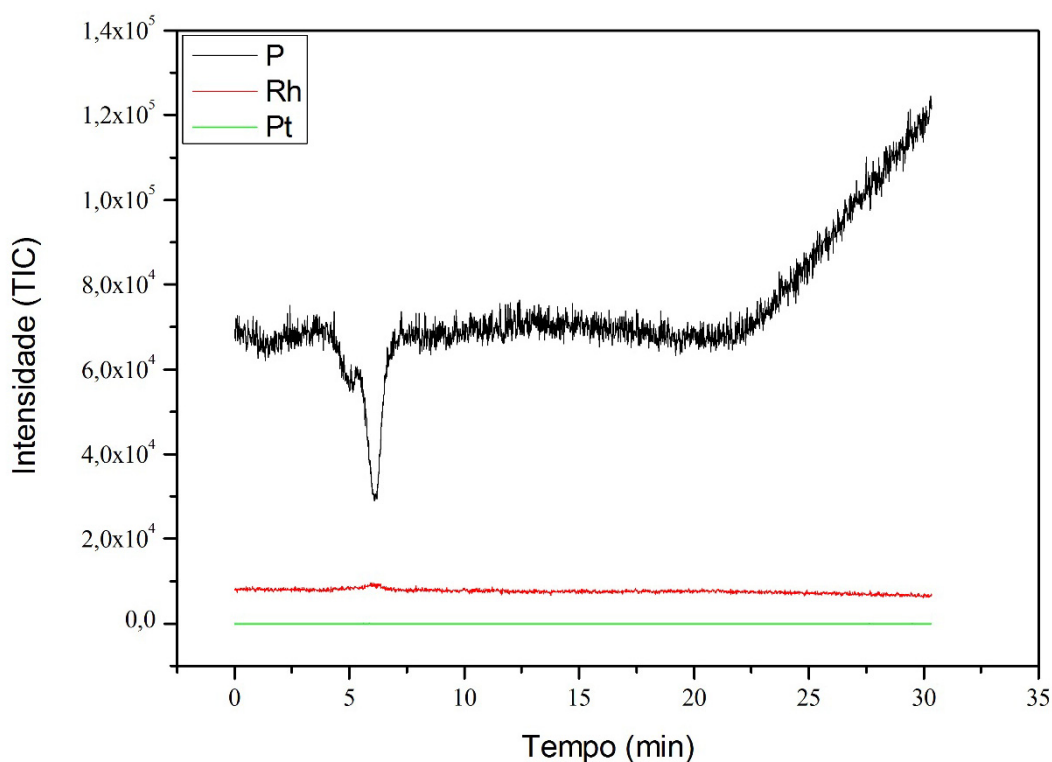


Figura 35: Cromatograma de uma injeção de um branco (Tris-HCl 10 mmol L⁻¹, pH 7,5) com as condições escolhidas para separação dos fragmentos de DNA.

Observa-se na Figura 36, que a intensidade do sinal de fundo do P é diminuída, aparentemente devido ao condicionamento da coluna, e que logo após o tempo morto já ocorre a eluição do primeiro fragmento de DNA, teoricamente este deve ser o fragmento contendo 100 BP, ou aproximadamente 66000 g mol⁻¹. Em seguida se tem a eluição dos outros fragmentos. É possível notar que a linha de base do fósforo sofre um aumento na medida em que a proporção de acetonitrila é aumentada na fase móvel. O sinal do ródio ficou praticamente

constante ao longo do tempo do monitoramento, indicando estabilidade do sistema, principalmente do plasma. Ainda é possível observar que não se tem contaminação por Pt no padrão de fragmentos de DNA, e a linha de base deste elemento é muito baixa (aproximadamente 20 contagens).

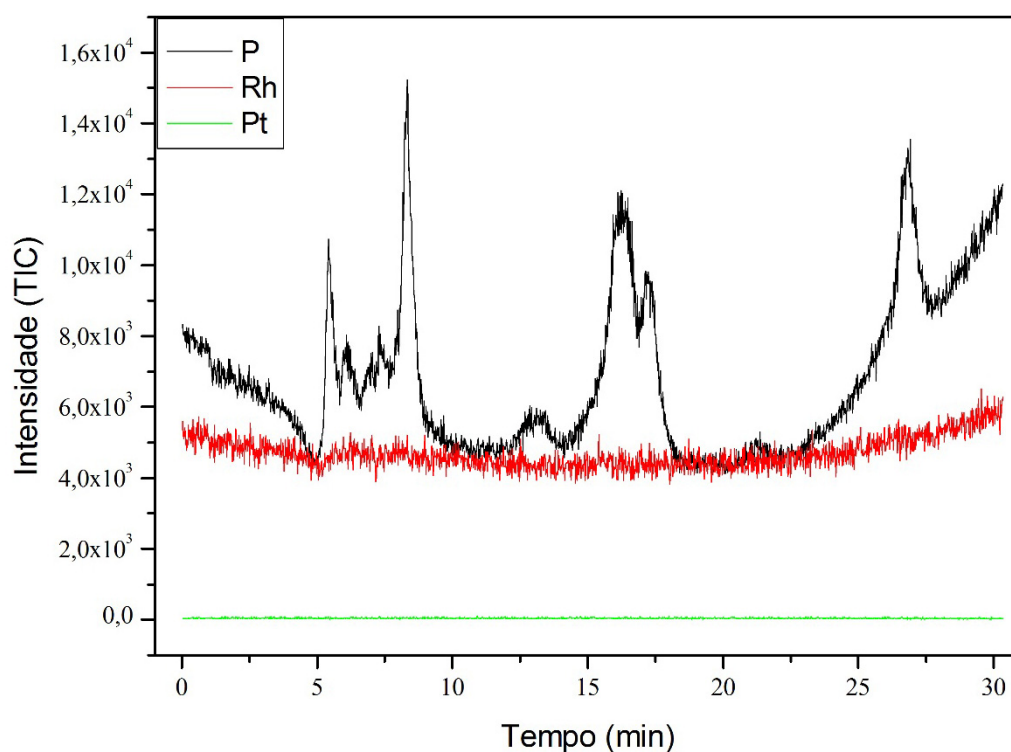


Figura 36: Cromatograma obtido para DNA Ladder 100 BP.

Na Figura 37 é apresentado o cromatograma obtido para cisplatina pura usando o sistema de cromatografia de par iônico. Observam-se dois sinais contendo Pt, referentes aos produtos de hidrólise e à droga intacta.

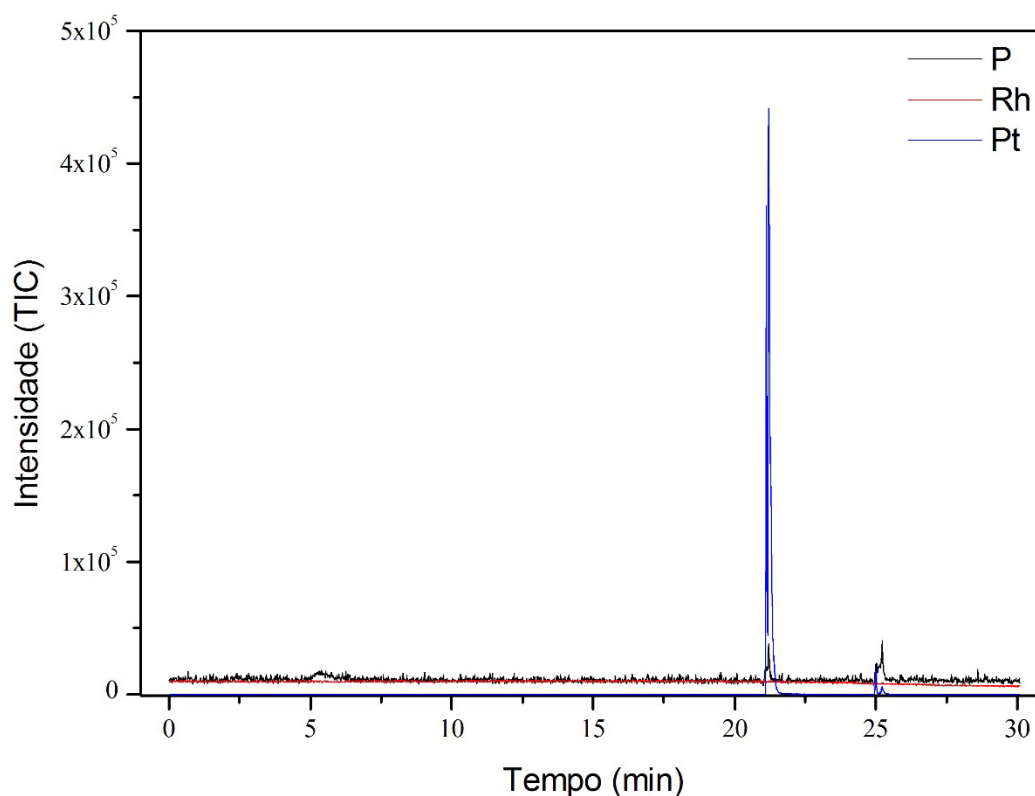


Figura 37: Cromatograma obtido para a cisplatina pura a 1 mg L^{-1} .

Obteve-se então um cromatograma para uma amostra de DNA extraído da linhagem K562 após incubação (48 h) com cisplatina $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 38). Pode-se notar a presença de um sinal contendo platina eluindo no tempo morto. Este sinal pode ser oriundo de fragmentos de DNA menores que 100 pares de base ligados a cisplatina, pois a separação obtida para o DNA *ladder* já é iniciada muito próxima ao tempo morto. Após o tempo morto, observa-se o sinal para Pt caindo lentamente, o que pode indicar a presença de outros fragmentos contendo platina. A diminuição do sinal do fósforo no volume morto dificulta a conclusão sobre a presença de DNA na fração inicial, entretanto, observou-se uma estrutura que acredita-se ser um sinal logo após e depleção do sinal de fósforo em um tempo de retenção onde ainda temos espécies de Pt sendo eluídas. Aparentemente fragmentos de DNA contendo Pt sendo eluídos logo no início da corrida cromatográfica, indicando que os mesmos são de baixa massa molecular.

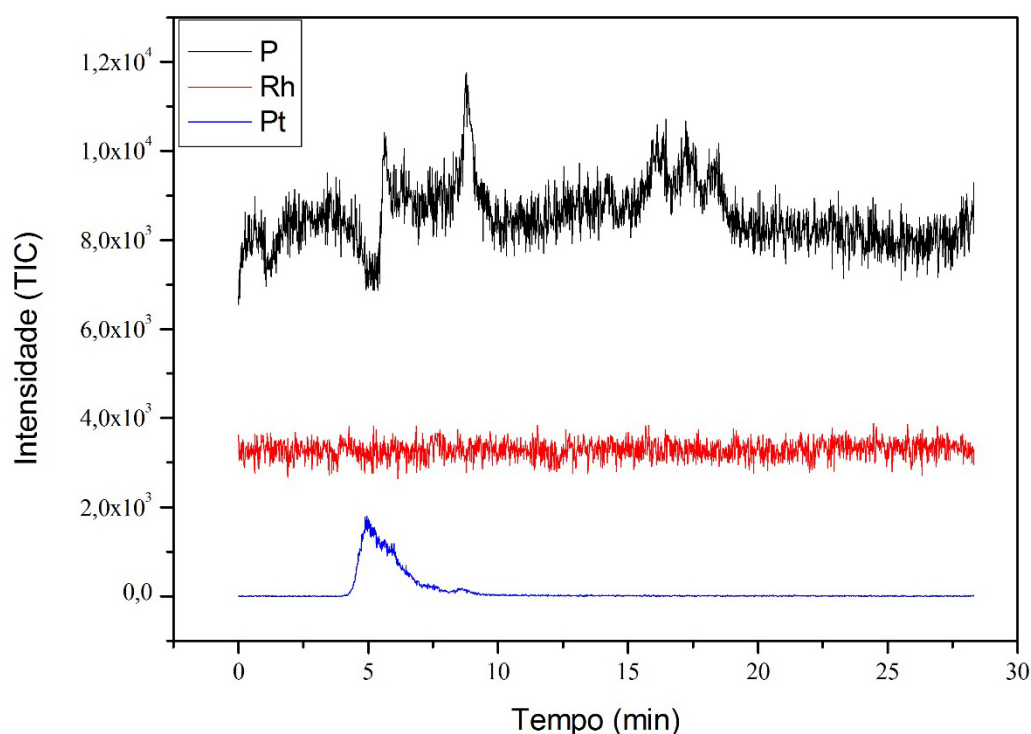


Figura 38: Cromatograma do DNA da K562 tratada com cisplatina

Os resultados obtidos com o HPLC-ICP-MS são muito promissores, pois demonstram uma possibilidade de detecção e identificação de fragmentos de DNA contendo platina, esta é uma característica única deste sistema e que pode ser de grande valor na caracterização destas biomoléculas. Estes cromatogramas demonstram que a metodologia tem capacidade para detecção de fragmentos de DNA contendo Pt.

Os principais desafios observados e que devem ser contornados para aplicação desta abordagem são: i) otimização do método para fragmentos de DNA de menor massa molecular para afastar as primeiras frações eluídas do tempo morto, possibilitando sua separação e conclusão sobre presença de P ou não juntamente com as espécies contendo platina; ii) melhorar a separação entre fragmentos de baixa massa molecular, possibilitando a identificação da cada fragmento de DNA ligado a platina; acoplamento do HPLC com ESI-MS para identificação inequívoca das biomoléculas eluídas.

Estas moléculas podem ser biomarcadores de eficácia do tratamento com drogas à base de platina, uma vez que, em princípio, são oriundas do sistema de

reparo NER e indicam a atividade deste mecanismo removendo o dano causado pela droga ao DNA da célula. Uma vez que este dano é considerado o principal mecanismo citotóxico desta classe de fármacos, esta ferramenta tem potencial para monitorar a atividade do NER e indicar o provável resultado do tratamento.

5. Conclusão

Métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de Pt por ICP-MS em fluidos biológicos e em culturas celulares. Estes permitiram a determinação do conteúdo total de Pt presentes na urina, em meio de cultura, em tampões que mimetizam condições fisiológicas e em células cancerígenas humanas. Os métodos hifenados se apresentaram estáveis, permitindo a identificação de drogas intactas e seus produtos de hidrólise em soluções aquosas e fluidos biológicos, permitiram também a observação de metabólitos contendo platina em urina de um paciente tratado com oxaliplatina e finalmente permitiram a avaliação preliminar da formação de adutos de DNA contendo platina, importantes moléculas tanto na ação citotóxica do fármaco quanto em alguns mecanismos de resistência ao mesmo.

O metabolismo da cisplatina, foi estudado em diversas linhagens celulares, permitindo a avaliação da quantidade tanto da droga que é admitida em uma célula tratada com cisplatina em cultura quanto do fármaco é removido do interior da célula através do funcionamento da bomba Pgp (mecanismo de resistência de tumores a diversas drogas).

Os métodos possibilitaram a identificação de produtos de hidrólise das drogas à base de platina, o que poderia ser usado para avaliar a qualidade das drogas disponíveis no mercado brasileiro. Além disso, foi possível identificar a presença de biomoléculas contendo platina em urina tanto em experimentos com amostras fortificadas com oxaliplatina quanto em urina de um paciente tratado com oxaliplatina. Estes estudos permitiram observar a instabilidade de algumas moléculas encontradas na urina de pacientes sob tratamento e identificar a necessidade de se desenvolver um protocolo específico para armazenamento deste tipo de amostra. Com estes métodos pôde-se também detectar a presença de fragmentos de DNA contendo Pt, o que é promissor já que tais moléculas têm potencial para serem utilizadas como biomarcadores para eficiência do tratamento com drogas à base de Pt.

No processo foi desenvolvido um protocolo para, partindo de células tumorais tratadas com drogas à base de Pt, pesquisar a presença de um possível indicador do prognóstico do tratamento. A rotina analítica consistiu em extrair o DNA das células selecionadas, separar os fragmentos de DNA de interesse utilizando-se a eletroforese em gel de agarose, remoção dos fragmentos de interesse do gel e posterior análise destes por HPLC-ICP-MS. Apesar de ser uma metodologia extensa, a abordagem se mostrou factível e possibilitou uma primeira investigação de fragmentos de DNA contendo Pt de células de leucemia tratadas com cisplatina.

Na literatura, os métodos apresentados para determinação de adutos de DNA são precedidos por uma digestão com DNase que fragmenta o material genético em pares de bases. Esta prática remove a informação biológica que indica a origem do fragmento de DNA, isto é, o tamanho da molécula que contém platina. A abordagem proposta neste trabalho permite inferir sobre a origem dos fragmentos de DNA contendo platina, consequentemente sobre o processo biológico envolvido na produção deste fragmento. Como mencionado anteriormente, fragmentos oriundos do reparo celular dos danos causados ao DNA pela cisplatina são fragmentos de fita simples e contendo aproximadamente 30 bases, uma vez identificados estes fragmentos, estes podem ser utilizados como biomarcadores para resistência ao tratamento.

O presente trabalho foi construído com o acúmulo de conhecimentos nas áreas da química analítica (separações e espectrometria atômica), da biologia (celular e molecular) e exigiu o desenvolvimento de aptidões no tratamento de amostras biológicas, cultura e manutenção de populações de células e uso de técnicas características das análises biológicas (em especial em eletroforese em gel e citometria de fluxo).

Os principais desenvolvimentos futuros são a montagem de um protocolo integrado que permita o preparo de amostra de forma mais célere minimizando a degradação das amostras, e, de preferência, que possa ser conduzido em um único laboratório. Outro avanço que pode ser explorado é o acoplamento direto da eletroforese em gel com ICP-MS. Apesar de existir o sistema comercial disponível para tal, a literatura não apresenta relatos de investigações com essa abordagem para biomarcadores do tratamento do câncer.

6. Referências Bibliográficas

AHMAD, S. Platinum–DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 543-566, 2010. ISSN 1612-1880. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200800340> >.

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 5th. New York ; Abingdon: Garland Science, 2008. xxxiii, 1601, 40, 49, 1 p. ISBN 9780815341116 (hbk.) 0815341113 (hbk.).

ALLER, S. G.; YU, J.; WARD, A.; WENG, Y.; CHITTABOINA, S.; ZHUO, R.; HARRELL, P. M.; TRINH, Y. T.; ZHANG, Q.; URBATSCH, I. L.; CHANG, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. **Science**, v. 323, n. 5922, p. 1718-22, Mar 27 2009. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325113> >.

APPELLA, E.; ANDERSON, C. W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 10, p. 2764-72, May 2001. ISSN 0014-2956 (Print)
0014-2956 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358490> >.

ARAUJO, T. O.; GONÇALVES, R. A.; CAMPOS, R. C. **Platinum Drugs Separation by LC-ICP-MS: Minimizing the Organic Solvent Load to the Plasma**. Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXVII. CAMPOS, R. C. D. Buzios, Brazil: 89 p. 2011.

ARNER, E. S.; NAKAMURA, H.; SASADA, T.; YODOI, J.; HOLMGREN, A.; SPYROU, G. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 10, p. 1170-8, Nov 15 2001. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705695 >.

ARNOULD, S.; HENNEBELLE, I.; CANAL, P.; BUGAT, R.; GUICHARD, S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. **Eur J Cancer**, v. 39, n. 1, p. 112-9, Jan 2003. ISSN 0959-8049 (Print)

0959-8049 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504667 >.

BANKS-SCHLEGEL, S. P.; QUINTERO, J. Growth and differentiation of human esophageal carcinoma cell lines. **Cancer Res**, v. 46, n. 1, p. 250-8, Jan 1986. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2415247 >.

BAREFOOT, R. R. Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 751, n. 2, p. 205-11, Feb 25 2001. ISSN 1387-2273 (Print)

1387-2273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11236075 >.

BAUMAN, J. E.; AUSTIN, M. C.; SCHMIDT, R.; KURLAND, B. F.; VAEZI, A.; HAYES, D. N.; MENDEZ, E.; PARVATHANENI, U.; CHAI, X.; SAMPATH, S.; MARTINS, R. G. ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial. **Br J Cancer**, v. 109, n. 8, p. 2096-105, Oct 15 2013. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064970 >.

BLAIR, B. G.; LARSON, C. A.; SAFAEI, R.; HOWELL, S. B. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 13, p. 4312-21, Jul 1 2009. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509135 >.

BOUGHATTAS, N. A.; LEVI, F.; FOURNIER, C.; LEMAIGRE, G.; ROULON, A.; HECQUET, B.; MATHE, G.; REINBERG, A. Circadian rhythm in toxicities and tissue uptake of 1,2-diamminocyclohexane(trans-1)oxalatoplatinum(II) in mice. **Cancer Res**, v. 49, n. 12, p. 3362-8, Jun 15 1989. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2720689 >.

BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. Colorectal cancer. **Lancet**, Nov 8 2013. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225001 >.

BRUIJNINCX, P. C. A.; SADLER, P. J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, Apr 2008. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <Go to ISI>://000256076700012 >.

CALDERON, J.; ORTIZ-PEREZ, D.; YANEZ, L.; DIAZ-BARRIGA, F. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 56, n. 1, p. 93-103, Sep 2003. ISSN 0147-6513 (Print)

0147-6513 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915143 >.

CALDERÓN, J.; ORTIZ-PÉREZ, D.; YÁÑEZ, L.; DÍAZ-BARRIGA, F. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 93-103, 2003. ISSN 01476513.

CALVERT, A. H.; NEWELL, D. R.; GUMBRELL, L. A.; O'REILLY, S.; BURNELL, M.; BOXALL, F. E.; SIDDIK, Z. H.; JUDSON, I. R.; GORE, M. E.; WILTSHAW, E. Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. **J Clin Oncol**, v. 7, n. 11, p. 1748-56, Nov 1989. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2681557 >.

CARUSO, J. A.; KLAUE, B.; MICHALKE, B.; ROCKE, D. M. Group assessment: elemental speciation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 32-44, 2003. ISSN 01476513.

CAUSSANEL, J. P.; LEVI, F.; BRIENZA, S.; MISSET, J. L.; ITZHAKI, M.; ADAM, R.; MILANO, G.; HECQUET, B.; MATHE, G. Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 12, p. 1046-50, Jun 20 1990. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2348469 >.

CECCHI, T. Ion pairing chromatography. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 161-213, 2008. ISSN 1040-8347. Disponível em: <
<Go to ISI>://000258244600003 >.

Chemotherapy in advanced ovarian cancer: an overview of randomised clinical trials. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. 1991. 884-893
Disponível em: < http://www.bmj.com/bmj/303/6807/884.full.pdf >.

COHEN, S. M.; LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 67, p. 93-130, 2001. ISSN 0079-6603 (Print)

0079-6603 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525387 >.

CUTILLAS, N.; YELLOL, G. S.; DE HARO, C.; VICENTE, C.; RODRIGUEZ, V.; RUIZ, J. Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 19-20, p. 2784-2797, Oct 2013. ISSN 0010-8545. Disponível em: <<Go to ISI>://000324450900012 >.

DE GRAMONT, A.; BOSSET, J. F.; MILAN, C.; ROUGIER, P.; BOUCHE, O.; ETIENNE, P. L.; MORVAN, F.; LOUVET, C.; GUILLOT, T.; FRANCOIS, E.; BEDENNE, L. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. **J Clin Oncol**, v. 15, n. 2, p. 808-15, Feb 1997. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053508 >.

DESOIZE, B.; MADOULET, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 42, n. 3, p. 317-25, Jun 2002. ISSN 1040-8428 (Print) 1040-8428 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050023 >.

DREXLER, H. G. **The leukemia-lymphoma cell line factsbook**. San Diego, Calif. ; London: Academic Press, 2001. xv, 733 p. ISBN 0122219708 (alk. paper).

EISENBERG, P.; FIGUEROA-VADILLO, J.; ZAMORA, R.; CHARU, V.; HAJDENBERG, J.; CARTMELL, A.; MACCIOCCHI, A.; GRUNBERG, S. Improved prevention of moderately emetogenic chemotherapy-induced nausea and vomiting with palonosetron, a pharmacologically novel 5-HT₃ receptor antagonist: results of a phase III, single-dose trial versus dolasetron. **Cancer**, v. 98, n. 11, p. 2473-82, Dec 1 2003. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14635083 >.

ESTEBAN-FERNANDEZ, D.; MORENO-GORDALIZA, E.; CANAS, B.; PALACIOS, M. A.; GOMEZ-GOMEZ, M. M. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. **Metallomics**, v. 2, n. 1, p. 19-38, Jan 2010. ISSN 1756-591X (Electronic)
1756-5901 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072372> >.

Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil. 2013. Disponível em: <
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014 >. Acesso em: 06/12/2013.

ETTRE, L. S. Nomenclature for Chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 819-872, Apr 1993. ISSN 0033-4545. Disponível em: < <Go to ISI>://A1993KV40100029 >.

FALTA, T.; HEFFETER, P.; MOHAMED, A.; BERGER, W.; HANN, S.; KOELLENSPERGER, G. Quantitative determination of intact free cisplatin in cell models by LC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 109-115, 2011. ISSN 0267-9477. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1039/C0JA00047G> >.

FINNEY, L. A.; O'HALLORAN, T. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 931-6, May 9 2003. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738850> >.

FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 1, p. 22-33, Oct 2001. ISSN 1474-175X (Print)
1474-175X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900249> >.

GALLIANI, A.; LOSACCO, M.; LASORSA, A.; NATILE, G.; ARNESANO, F. Cisplatin handover between copper transporters: the effect of reducing agents. **J Biol Inorg Chem**, v. 19, n. 4-5, p. 705-14, Jun 2014. ISSN 1432-1327 (Electronic)

0949-8257 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789146 >.

GALLUZZI, L.; MORSELLI, E.; KEPP, O.; VITALE, I.; PINTI, M.; KROEMER, G. Mitochondrial liaisons of p53. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1691-714, Sep 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712408 >.

GALLUZZI, L.; SENOVILLA, L.; VITALE, I.; MICHELS, J.; MARTINS, I.; KEPP, O.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869-83, Apr 12 2012. ISSN 1476-5594 (Electronic)

0950-9232 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892204 >.

GASSER, G.; METZLER-NOLTE, N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. **Curr Opin Chem Biol**, v. 16, n. 1-2, p. 84-91, Apr 2012. ISSN 1879-0402 (Electronic)

1367-5931 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366385 >.

GELASCO, A.; LIPPARD, S. J. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Biochemistry**, v. 37, n. 26, p. 9230-9, Jun 30 1998. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649303 >.

GJERDE, D. T.; HANNA, C. P.; HORNBY, D. **DNA chromatography**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. xv, 228 p. ISBN 3527302441.

GO, R. S.; ADJEI, A. A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 1, p. 409-22, Jan 1999. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458260 >.

GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 657-63, Apr 2001. ISSN 0026-895X (Print)

0026-895X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259608 >.

GRAF, N.; LIPPARD, S. J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 11, p. 993-1004, Aug 2012. ISSN 1872-8294 (Electronic)

0169-409X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22289471 >.

GUMULEC, J.; BALVAN, J.; SZTALMACHOVA, M.; RAUDENSKA, M.; DVORAKOVA, V.; KNOPFOVA, L.; POLANSKA, H.; HUDCOVA, K.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; BABULA, P.; ADAM, V.; KIZEK, R.; STIBOROVA, M.; MASARIK, M. Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. **Int J Oncol**, v. 44, n. 3, p. 923-33, Mar 2014. ISSN 1791-2423 (Electronic)

1019-6439 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24366574 >.

GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R.; MASARIK, M. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85346, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24416395> >.

HANN, S.; FALTA, T.; BOECK, K.; SULYOK, M.; KOELLENSPERGER, G. On-line fast column switching SEC × IC separation combined with ICP-MS detection for mapping metallodrug–biomolecule interaction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 861, 2010. ISSN 0267-9477 1364-5544.

HANN, S.; STEFÁNKA, Z.; LENZ, K.; STINGEDER, G. Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC–ICP–MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 2, p. 405-412, 2005. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-004-2839-z> >.

HERRMANN, M.; LORENZ, H. M.; VOLL, R.; GRUNKE, M.; WOITH, W.; KALDEN, J. R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 24, p. 5506-7, Dec 11 1994. ISSN 0305-1048 (Print)

0305-1048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7816645> >.

HEUMANN, K. G. Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 2, p. 318-329, 2004. ISSN 1618-2642 1618-2650.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DEROSE, V. J. RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chem Biol**, v. 7, n. 1, p. 218-25, Jan 20 2012. ISSN 1554-8937 (Electronic)

1554-8929 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004017> >.

HUANG, H.; ZHU, L.; REID, B. R.; DROBNY, G. P.; HOPKINS, P. B. Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1842-5, Dec 15 1995. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525382 >.

JAMIESON, E. R.; JACOBSON, M. P.; BARNES, C. M.; CHOW, C. S.; LIPPARD, S. J. Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMG1 domain B. **J Biol Chem**, v. 274, n. 18, p. 12346-54, Apr 30 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212205 >.

JERREMALM, E.; HEDELAND, M.; WALLIN, I.; BONDESSON, U.; EHRSSON, H. Oxaliplatin degradation in the presence of chloride: identification and cytotoxicity of the monochloro monooxalato complex. **Pharm Res**, v. 21, n. 5, p. 891-4, May 2004. ISSN 0724-8741 (Print)

0724-8741 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180350 >.

KELLAND, L. P. A. F., N. P. **Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy**. Totowa: Humana Press, 2000.

KIM, E.; RYE, P. T.; ESSIGMANN, J. M.; CROY, R. G. A bifunctional platinum(II) antitumor agent that forms DNA adducts with affinity for the estrogen receptor. **J Inorg Biochem**, v. 103, n. 2, p. 256-61, Feb 2009. ISSN 1873-3344 (Electronic)

0162-0134 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19054566 >.

KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. Platinum drug distribution in cancer cells and tumors. **Chem Rev**, v. 109, n. 10, p. 4911-20, Oct 2009. ISSN 1520-6890 (Electronic)

0009-2665 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19711978> >.

KOELLENSPERGER, G.; STEFANKA, Z.; MEELICH, K.; GALANSKI, M.;
 KEPPLER, B. K.; STINGEDER, G.; HANN, S. Species specific IDMS for
 accurate quantification of carboplatin in urine by LC-ESI-TOFMS and LC-ICP-
 QMS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 23, n. 1, p. 29, 2008.
 ISSN 0267-9477
 1364-5544.

KROEMER, G.; POUYSSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles'
 heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472-82, Jun 2008. ISSN 1878-3686 (Electronic)
 1535-6108 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538731> >.

KWOK, J. M.; PECK, B.; MONTEIRO, L. J.; SCHWENEN, H. D.; MILLOUR,
 J.; COOMBES, R. C.; MYATT, S. S.; LAM, E. W. FOXM1 confers acquired
 cisplatin resistance in breast cancer cells. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 1, p. 24-34,
 Jan 2010. ISSN 1557-3125 (Electronic)
 1541-7786 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068070> >.

LEBWOHL, D.; CANETTA, R. Clinical development of platinum complexes in
 cancer therapy: an historical perspective and an update. **Eur J Cancer**, v. 34, n.
 10, p. 1522-34, Sep 1998. ISSN 0959-8049 (Print)
 0959-8049 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893623> >.

LEE, J. D., Ed. **Concise Inorganic Chemistry**. London: Chapman & Hall, 5 ed.
 1996.

LEVI, F.; METZGER, G.; MASSARI, C.; MILANO, G. Oxaliplatin:
 pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. **Clin Pharmacokinet**, v.
 38, n. 1, p. 1-21, Jan 2000. ISSN 0312-5963 (Print)

0312-5963 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668856> >.

LOBINSKI, R.; BECKER, J. S.; HARAGUCHI, H.; SARKAR, B. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 493-504, Feb 2010. ISSN 0033-4545. Disponível em: < <Go to ISI>://000275009800013
<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2010/pdf/8202x0493.pdf> >.

LOKICH, J.; ANDERSON, N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. **Ann Oncol**, v. 9, n. 1, p. 13-21, Jan 1998. ISSN 0923-7534 (Print)
 0923-7534 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9541678> >.

LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 321-34, Mar 1975. ISSN 0006-4971 (Print)
 0006-4971 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/163658> >.

MAINDRAULT-GOEBEL, F.; LOUVET, C.; ANDRE, T.; CAROLA, E.; LOTZ, J. P.; MOLITOR, J. L.; GARCIA, M. L.; GILLES-AMAR, V.; IZRAEL, V.; KRULIK, M.; DE GRAMONT, A. Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). GERCOR. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 9, p. 1338-42, Sep 1999. ISSN 0959-8049 (Print)
 0959-8049 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10658524> >.

MARTINS, N. M.; SANTOS, N. A.; CURTI, C.; BIANCHI, M. L.; SANTOS, A. C. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic

metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 3, p. 337-44, Apr 2008. ISSN 0260-437X (Print) 0260-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17604343> >.

MCSHEEHY, S.; SZPUNAR, J.; MORABITO, R.; QUEVAUVILLER, P. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 191-209, Apr 2003. ISSN 0165-9936. Disponível em: < [Go to ISI://000182534100008](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016599360300008) >.

MCSHEEHY, S.; SZPUNAR, J.; MORABITO, R.; QUEVAUVILLER, P. The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 191-209, 2003. ISSN 01659936.

Metallomics: whence and whither. **Metallomics**, v. 4, n. 10, p. 1017, 2012. ISSN 1756-5901 1756-591X.

MICHALKE, B. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 122-139, 2003. ISSN 01476513.

MUALLEM, M. Z.; BRAICU, I.; NASSIR, M.; RICHTER, R.; SEHOULI, J.; ARSENIC, R. ERCC1 expression as a predictor of resistance to platinum-based chemotherapy in primary ovarian cancer. **Anticancer Res**, v. 34, n. 1, p. 393-9, Jan 2014. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403493> >.

MUALLEM, M. Z.; MARNITZ, S.; RICHTER, R.; KOHLER, C.; SEHOULI, J.; ARSENIC, R. ERCC1 expression as a predictive marker of cervical cancer treated

with cisplatin-based chemoradiation. **Anticancer Res**, v. 34, n. 1, p. 401-6, Jan 2014. ISSN 1791-7530 (Electronic)

0250-7005 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403494 >.

O'DWYER, P. J.; STEVENSON, J. P.; JOHNSON, S. W. Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. **Drugs**, v. 59, p. 19-27, 2000. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <Go to ISI>://000087806800004 >.

OZDEMIR, O.; OZDEMIR, P.; VERAL, A.; ULUER, H.; OZHAN, M. H. ERCC1 expression does not predict survival and treatment response in advanced stage non-small cell lung cancer cases treated with platinum based chemotherapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 8, p. 4679-83, 2013. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083725 >.

OZOLS, R. F.; BUNDY, B. N.; GREER, B. E.; FOWLER, J. M.; CLARKE-PEARSON, D.; BURGER, R. A.; MANNEL, R. S.; DEGEEST, K.; HARTENBACH, E. M.; BAERGEN, R. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 17, p. 3194-200, Sep 1 2003. ISSN 0732-183X (Print) 0732-183X (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860964 >.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, 2008. ISSN 0085-2538 1523-1755.

PAN, Y.; ZHANG, Q.; ATSAVES, V.; YANG, H.; CLARET, F. X. Suppression of Jab1/CSN5 induces radio- and chemo-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma

through changes to the DNA damage and repair pathways. **Oncogene**, v. 32, n. 22, p. 2756-66, May 30 2013. ISSN 1476-5594 (Electronic) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797071> >.

PAVELKA, M.; LUCAS, M. F. A.; RUSSO, N. On the Hydrolysis Mechanism of the Second-Generation Anticancer Drug Carboplatin. **Chemistry – A European Journal**, v. 13, n. 36, p. 10108-10116, 2007. ISSN 1521-3765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200700887> >.

PODRATZ, J. L.; KNIGHT, A. M.; TA, L. E.; STAFF, N. P.; GASS, J. M.; GENELIN, K.; SCHLATTAU, A.; LATHROUM, L.; WINDEBANK, A. J. Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 41, n. 3, p. 661-668, 2011. ISSN 09699961.

RAYMOND, E.; FAIVRE, S.; WOYNAROWSKI, J. M.; CHANEY, S. G. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. **Seminars in oncology**, v. 25, n. 2 Suppl 5, p. 4-12, 1998. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/9609103> >.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; GARCÍA ALONSO, J. I. Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 3, p. 239, 2010. ISSN 0267-9477 1364-5544.

ROGERS, D. A.; RAY, S. J.; HIEFTJE, G. M. An electrospray/inductively coupled plasma dual-source time-of-flight mass spectrometer for rapid metallomic and speciation analysis : Part 2. Atomic channel and dual-channel characterization. **Metallomics**, v. 2, n. 4, p. 280, 2010. ISSN 1756-5901 1756-591X.

ROSENBERG, B. Some Biological Effects of Platinum Compounds: New Agents for the Control of Tumours. **Platinum Metals Review**, v. 15, n. 2, p. 42-51, 1971.

ROSENBERG, B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. **Naturwissenschaften**, v. 60, n. 9, p. 399-406, Sep 1973. ISSN 0028-1042 (Print) 0028-1042 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4203933> >.

ROSENBERG, B. In: SPIRO, T. G. (Ed.). **Metal Ions in Biological Systems**. New York: John Wiley & Sons, v.1, 1980. p.1-29.

ROSENBERG, B. Chapter 2 - CISPLATIN: ITS HISTORY AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION. In: PRESTAYKO, A. W.; CROOKE, S. T., *et al* (Ed.). **Cisplatin**: Academic Press, 1980. p.9-20. ISBN 978-0-12-565050-2.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature**, v. 205, p. 698-9, Feb 13 1965. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14287410> >.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, V. H. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-6, Apr 26 1969. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5782119> >.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE GS FAU - WAGNER-SOUZA, K.; WAGNER-SOUZA K FAU - DE-OLIVEIRA, M. C.; DE-OLIVEIRA MC FAU - MARQUES-SANTOS, L. F.; MARQUES-SANTOS LF FAU - MAIA, R. C.; MAIA RC FAU - CAPELLA, M. A.; CAPELLA, M. A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. n. 0001-3765 (Print), 20010314 DCOM- 20010524 2001.

SAMIMI, G.; VARKI, N. M.; WILCZYNSKI, S.; SAFAEI, R.; ALBERTS, D. S.; HOWELL, S. B. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during

platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 16 Pt 1, p. 5853-9, Dec 1 2003. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676106 >.

SANZ-MEDEL, A.; MONTES-BAYON, M.; LUISA FERNANDEZ SANCHEZ, M. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. **Anal Bioanal Chem**, v. 377, n. 2, p. 236-47, Sep 2003. ISSN 1618-2642 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904961 >.

SASIENI, P. D.; SHELTON, J.; ORMISTON-SMITH, N.; THOMSON, C. S.; SILCOCKS, P. B. What is the lifetime risk of developing cancer?: the effect of adjusting for multiple primaries. **Br J Cancer**, v. 105, n. 3, p. 460-5, Jul 26 2011. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21772332 >.

SCHULZ, W. A. **MOLECULAR BIOLOGY OF HUMAN CANCERS**. 1. Dordrecht: Springer, 2005. ISBN 1-4020-3185-8.

SCHWEDT, G. Separation and Preconcentration Methods in Inorganic Anion Analysis (Review). **Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie**, v. 320, n. 5, p. 423-428, 1985. ISSN 0016-1152. Disponível em: < <Go to ISI>://A1985AGQ3000002 >.

SHIEH, S. Y.; AHN, J.; TAMAI, K.; TAYA, Y.; PRIVES, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. **Genes Dev**, v. 14, n. 3, p. 289-300, Feb 1 2000. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673501 >.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 11-30, Jan 2013. ISSN 1542-4863 (Electronic) 0007-9235 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335087> >.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013. ISSN 00079235.

SINGH, S.; OKAMURA, T.; ALI-OSMAN, F. Serine phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by PKC α enhances GSTP1-dependent cisplatin metabolism and resistance in human glioma cells. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 9, p. 1343-55, Nov 1 2010. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654585> >.

SZPUNAR, J.; MAKAROV, A.; PIEPER, T.; KEPPLER, B. K.; LOBINSKI, R. Investigation of metallodrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Analytica Chimica Acta**, v. 387, n. 2, p. 135-144, Apr 22 1999. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<Go to ISI>://000079923400004 >.

TAKAHARA, P. M.; ROSENZWEIG, A. C.; FREDERICK, C. A.; LIPPARD, S. J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature**, v. 377, n. 6550, p. 649-52, Oct 19 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7566180> >.

TEUBEN, J. M.; BAUER, C.; WANG, A. H.; REEDIJK, J. Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. **Biochemistry**, v. 38, n. 38, p. 12305-12, Sep 21 1999. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493798> >.

TIMERBAEV, A. R.; KUNG, A.; KEPPLER, B. K. Capillary electrophoresis of platinum-group elements analytical, speciation and biochemical studies. **Journal of Chromatography A**, v. 945, n. 1-2, p. 25-44, Feb 1 2002. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000173609600002 >.

TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. **Metallomics**, v. 1, n. 4, p. 280-91, 2009. ISSN 1756-591X (Electronic)
1756-5901 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20046924> >.

TONIGOLD, M.; ROSSMANN, A.; MEINOLD, M.; BETTE, M.; MARKEN, M.; HENKENIUS, K.; BRETZ, A. C.; GIEL, G.; CAI, C.; RODEPETER, F. R.; BENES, V.; GRENNAN, R.; CAREY, T. E.; LAGE, H.; STIEWE, T.; NEUBAUER, A.; WERNER, J. A.; BRENDDEL, C.; MANDIC, R. A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53 exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels. **J Cancer Res Clin Oncol**, Jun 10 2014. ISSN 1432-1335 (Electronic)
0171-5216 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24913304> >.

TORII, Y.; KATO, R.; MINAMI, Y.; HASEGAWA, K.; FUJII, T.; UDAGAWA, Y. ERCC1 expression and chemosensitivity in uterine cervical adenocarcinoma cells. **Anticancer Res**, v. 34, n. 1, p. 107-15, Jan 2014. ISSN 1791-7530 (Electronic)
0250-7005 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24403450> >.

VAN DER BURG, M.; KREYENBERG, H.; WILLASCH, A.; BARENDREGT, B. H.; PREUNER, S.; WATZINGER, F.; LION, T.; ROOSNEK, E.; HARVEY, J.; ALCOCEBA, M.; DIAZ, M. G.; BADER, P.; VAN DONGEN, J. J. Standardization of DNA isolation from low cell numbers for chimerism analysis

by PCR of short tandem repeats. **Leukemia**, v. 25, n. 9, p. 1467-70, Sep 2011. ISSN 1476-5551 (Electronic)
0887-6924 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681189> >.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J Immunol Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-90, Sep 21 2000. ISSN 0022-1759 (Print)
0022-1759 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10986414> >.

WANG, J.; PABLA, N.; WANG, C. Y.; WANG, W.; SCHOENLEIN, P. V.; DONG, Z. Caspase-mediated cleavage of ATM during cisplatin-induced tubular cell apoptosis: inactivation of its kinase activity toward p53. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 291, n. 6, p. F1300-7, Dec 2006. ISSN 1522-1466 (Print)
1522-1466 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849690> >.

WEISS, R.; CHRISTIAN, M. New Cisplatin Analogues in Development. **Drugs**, v. 46, n. 3, p. 360-377, 1993/09/01 1993. ISSN 0012-6667. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.2165/00003495-199346030-00003> >.

WILLIAMS, S. D.; EINHORN, L. H. Chapter 21 - CISPLATIN CHEMOTHERAPY OF TESTICULAR CANCER. In: PRESTAYKO, A. W.; CROOKE, S. T., *et al* (Ed.). **Cisplatin**: Academic Press, 1980. p.323-328. ISBN 978-0-12-565050-2.

WONG, J. H.; BROWN, J. A.; SUO, Z.; BLUM, P.; NOHMI, T.; LING, H. Structural insight into dynamic bypass of the major cisplatin-DNA adduct by Y-family polymerase Dpo4. **EMBO J**, v. 29, n. 12, p. 2059-69, Jun 16 2010. ISSN 1460-2075 (Electronic)
0261-4189 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512114> >.

XIE, S. M.; FANG, W. Y.; LIU, T. F.; YAO, K. T.; ZHONG, X. Y. Association of ABCC2 and CDDP-Resistance in Two Sublines Resistant to CDDP Derived from a Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line. **J Oncol**, v. 2010, p. 915046, 2010. ISSN 1687-8469 (Electronic)

1687-8450 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628484> >.

XU, J.; ZHU, W.; XU, W.; CUI, X.; CHEN, L.; JI, S.; QIN, Y.; YAO, W.; LIU, L.; LIU, C.; LONG, J.; LI, M.; YU, X. Silencing of MBD1 reverses pancreatic cancer therapy resistance through inhibition of DNA damage repair. **Int J Oncol**, v. 42, n. 6, p. 2046-52, Jun 2013. ISSN 1791-2423 (Electronic)

1019-6439 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588667> >.

ZAYED, A.; JONES, G. D.; REID, H. J.; SHOEIB, T.; TAYLOR, S. E.; THOMAS, A. L.; WOOD, J. P.; SHARP, B. L. Speciation of oxaliplatin adducts with DNA nucleotides. **Metallomics**, v. 3, n. 10, p. 991-1000, Oct 2011. ISSN 1756-591X (Electronic)

1756-5901 (Linking). Disponível em: <

ZAYED, A.; SHOEIB, T.; TAYLOR, S. E.; JONES, G. D. D.; THOMAS, A. L.; WOOD, J. P.; REID, H. J.; SHARP, B. L. Determination of Pt-DNA adducts and the sub-cellular distribution of Pt in human cancer cell lines and the leukocytes of cancer patients, following mono- or combination treatments, by inductively-coupled plasma mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 307, n. 1-3, p. 70-78, Oct 1 2011. ISSN 1387-3806. Disponível em: <<Go to ISI>://000295864100012 >.

ZEUGIN, J. A. H., J. L. Ethanol precipitation of DNA. **Focus**, v. 7, n. 4, p. 2, 1985.

ZHAO, H.; PIWNICA-WORMS, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 13, p. 4129-39, Jul 2001. ISSN 0270-7306 (Print)

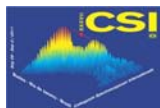
0270-7306 (Linking). Disponível em: <

7. Anexo I: Composição do meio de cultura RPMI 1640

Componentes	Conc. (g L ⁻¹)	Componente	Conc. (g L ⁻¹)
Sais Inorgânicos		Vitaminas	
Nitrato de Cálcio • 4H ₂ O	0,1	D-Biotina	0,0002
Sulfato de Magnésio (anidro)	0,04884	Cloreto Colina	0,003
Cloreto de Potássio	0,4	Ácido Fólico	0,001
Bicarbonato de Sódio	2	<i>myo</i> -Inositol	0,035
Cloreto de Sódio	6	Niacinamida	0,001
Fosfato de Sódio Dibásico (anidro)	0,8	Ácido <i>p</i> -Aminobenzoico	0,001
Aminoácidos		Ácido D-Pantoténico	0,00025
L-Arginina	0,2	Pyridoxina • HCl	0,001
L-Asparagina (anidra)	0,05	Riboflavina	0,0002
Ácido L-Aspártico	0,02	Tiamina • HCl	0,001
L-Cistina • 2HCl	0,0652	Vitamina B ₁₂	0,000005
Ácido L-Glutâmico	0,02	Outros	
L-Glutamina	0,3	D-Glucose	2
Glicina	0,01	Glutathione (reduzida)	0,001
L-Histidina	0,015	Vermelho de Fenol • Na	0,0053
Hidroxi-L-Prolina	0,02		
L-Isoleucina	0,05		
L-Leucina	0,05		
L-Lisina • HCl	0,04		
L-Metionina	0,015		
L-Fenilalanina	0,015		
L-Prolina	0,02		
L-Serina	0,03		
L-Treonina	0,02		
L-Triptofan	0,005		
L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0,02883		
L-Valina	0,02		

8. Anexo II - Publicações resultantes dos trabalhos desenvolvidos na Tese.

- 1) Resumo aceito para apresentação oral, publicado nos anais do XXXVII *Colloquium Spectroscopicum Internationale*, 2011, Buzios, Brasil.



Platinum drugs separation by LC-ICP-MS: Minimizing the organic solvent load to the plasma

Thiago de O. Araujo^{a, b}, Rodrigo A. Gonçalves^a, Reinaldo C. de Campos^a

^a Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rua Marques de São Vicente, 225, Gávea Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

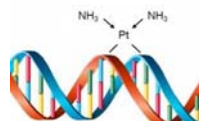
^b Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Av Nossa Senhora das Graças, 50, Duque de Caxias RJ, Brazil.

E-mail: thoarujo@gmail.com

Cisplatin reacts with water resulting in monoaquacisplatin and diaquacisplatin, and other platinum based drugs also present hydrolysis products in aqueous solutions. The determination of the Pt species has also been shown to be very important both in clinical and pre-clinical trials. Moreover, the determination of intact platinum based drugs in biological fluids is an important step toward the understanding of the pathway they undergo to trigger both oncolytic and toxic effects. The speciation analysis of Pt drugs derived species by HPLC-ICP-MS is a challenging task, due to the presence of neutral and positively charged molecules, and the poorly separated species demand an increase of methanol concentrations in the eluent in order to resolve peaks that, otherwise, would overlap. On the other hand, this increase destabilizes the plasma, making the analysis by ICP-MS unfeasible or impoverishing the limit of detection.

This work presents the development of a new method to separate intact Pt based drugs and some of their hydrolysis products in aqueous media without the use of methanol in the mobile phase. An anion exchange column PRP-X100, 10 μm , 4.1 x 250 mm (Hamilton USA) was used for the separation, while the eluent was composed by 20 mmol L⁻¹ ammonium formate and water (50/50 %). Plasma conditions were the same used for aqueous samples (no auxiliary gas was used in the plasma) and no fluctuations, instabilities or plasma shut off were observed, no carbon deposits were formed over the cones within a day of analysis. Three distinct peaks were observed: intact carboplatin and cisplatin, and the third one related to a cisplatin hydrolysis product. Mass balance was consistent and limits of detection were at the low $\mu\text{g L}^{-1}$ level. The reduced load of organics into the plasma allows the introduction of more concentrated biological samples and to perform longer runs what is especially important in speciation analysis by HPLC-ICP-MS, in which long elution times are common. Further applications include biological material such as blood, urine and cell cytoplasm.

- 2) Resumo aceito como poster, publicado nos anais do XII *Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, 2012, Foz do Iguaçu, Brasil. Este trabalho foi classificado como 3º Lugar no prêmio de melhor pôster do congresso.



Determination of Pt Biomolecules in Cell Fractions by HPLC-ICP-MS

Thiago de O. Araujo^{a,b}, Janaina Fernandes^c, Ricardo Q. Aucélio^a, Reinaldo C. Campos^{a,†}

^a Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, R. Marques de São Vicente, 225, Gávea, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. - thooaraujo@gmail.com

^b Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Av N. Sra das Graças, 50, Duque de Caxias RJ, Brazil.

^c Universidade Federal de Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Rio de Janeiro RJ, Brazil

Introduction

The intensive use of platinum based drugs for cancer treatment makes the determination of biomolecules containing platinum crucial. Such determinations can indicate the transport pathway, the nature of the metabolism products, the fate of active or inactive species etc. Nowadays, hyphenated techniques, such as HPLC-ICP-MS, enable the identification and the quantification of many important molecules. Thanks to this advance, the activity, side effects and resistance to platinum based drugs are being depicted, leading to a better understanding of the whole metabolism of these drugs. Recently, the main targets of interest have shifted from small simple molecules such as hydrolysis products to DNA-adducts and Pt containing proteins, and other molecules such as Pt-GSH. Cell cultures are largely employed as models to evaluate drug effects and to indicate how studies must be conducted on more complex organisms. Experiments in cell cultures can provide metabolites of Pt based drugs in a fast and reproductive way, allowing the determination of the speciation of these drugs, helping both the comprehension of the metabolism of the drug and the development of analytical tools that can be used for clinical and preclinical trials.

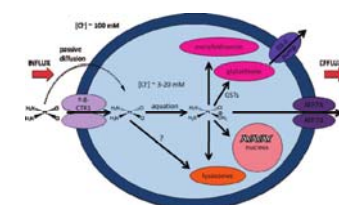
Objectives

Determination of appropriate dose for treatment of cell line used.

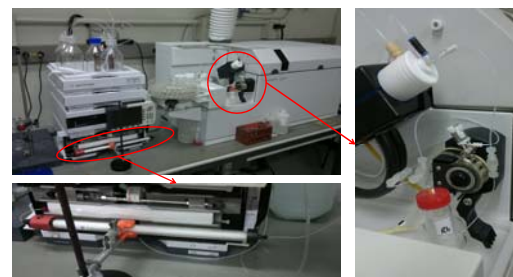
Se n of biomolecules containing Pt by HPLC-ICP-MS. Id of Pt biomolecules that can be used as bi rs for efficiency of cancer treatment.

biology

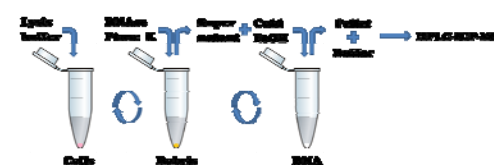
- atches of Lucena cells were cultivated in RPMI 1640 medium with se at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, they were exposed to 0.10, 0.50, 1.00, 5.0, 10.0, 25.0 and 50.0 µg · ml⁻¹ of cisplatin.
- were harvested after 48 h incubation. One batch was destined to ity of cells through Flow Cytometry and the other to DNA extraction PLIC-ICP-MS analysis.
- ellets were stained with propidium iodide (PI) and taken to flow etry analysis to evaluate the extension of cell death.
- ICP-MS analysis was carried out using an Agilent LC 1200 atograph with a size exclusion column (SEC) Superdex[®] 75 and an Agilent 7500 ICP-MS as detector



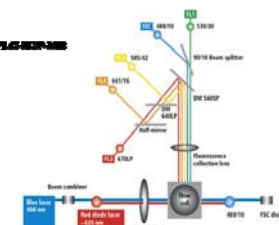
Chemical Reviews, 2009, 109, No. 10, 4911–4920



HPLC-ICP-MS hyphenated system

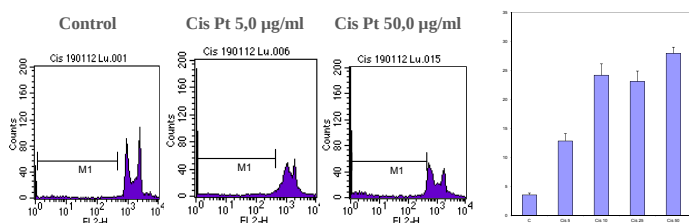


DNA Extraction Scheme

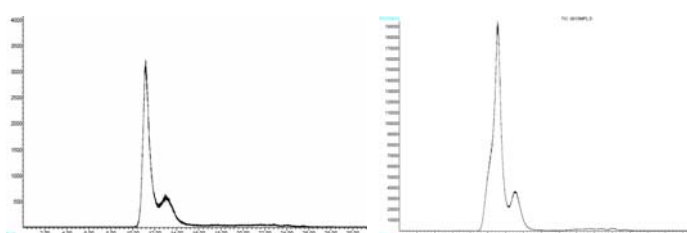


Flow Cytometer Scheme

Results



FACS results: cell viability after exposure to cisplatin in different concentrations



SEC chromatograms: Platinum containing DNA fragments

Conclusions

- Concentrations below 5.00 µg · ml⁻¹ of cisplatin have not induced significant cell death;
- Populations exposed to higher doses presented significant death, reaching a maximum of 30% of population.
- The chromatograms obtained with the SEC column present two peaks, one at 11 min and the second at 13 min.
- These preliminary results demonstrate that the chromatographic separation is already feasible in our laboratory and more elucidating trials are already being carried out.
- Further steps include:
 - Assessment of behavior of different cell lines such as KS62, H460 and HCT 116;
 - Characterization of eluates according to their molecular mass, second dimension separation through reversed faze chromatography and structural characterization by ESI-MS.

Acknowledgements



- 3) Resumo aceito como apresentação oral, publicado nos anais do XIII *Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, 2014, Mérida, México.

DETERMINATION OF Pt-DNA ADDUCTS IN CELL CULTURES AFTER TREATMENT WITH CISPLATIN

Thiago ARAUJO^{a,b}, Janaína FERNANDES^c, Ricardo AUCÉLIO^b, Reinaldo CAMPOS^b

^{a)} Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO); ^{b)} Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio); ^{c)} Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
toaraujo@inmetro.gov.br

The use of platinum-based drugs is the first line treatment for many cancers. Patients treated with these drugs present better outcome when compared with other chemotherapy regimens for the same types of malignancies. The major limitations in using them are the severe side effects and the acquired resistance of tumors. Cisplatin was the first platinum-based drug to be approved for human use. Since the late 1970s up to today, this drug has been widely used with great success. There is a general consensus that the major mechanism of action of these drugs is the binding of two active sites of platinum complexes with the DNA of the tumor cells, preventing their multiplication and finally inducing apoptosis, that leads to a reduction, and in some cases eliminating, tumors. On the other hand, one of the most important resistance mechanisms is the activitie of the Nucleotide Exicion Repair (NER) sistem, which removes the damaged DNA portion to replace it, allowing the cell to follow its normal cycle. The expression of some proteins of the NER system are forseen as biomarker to indicate resistance. In this work, DNA fragments removed by the NER sistem are proposed as a metallomic resistance bioimarker. The combination of separation techniques such as electrophoresis and high performance liquid chromatography with atomic spectrometric techniques has emerged as a powerful alternative for investigation metal-related biological phenomena. The so called hyphenation of these techniques allows the separation and detection of biomolecules containing metals, making possible to obtain unique information about biological processes. This work presents the development of methods using agarose gel electrophoresis (GE), high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of platinum-containing DNA fragments extracted from cell cultures without previous digestion. The main objective of this work is to provide tools to study mechanisms of resistance to platinum-based drugs in humans. The gel electrophoresis was used to clean-up the DNA sample to preserve HPLC columns while ion-pair chromatography was used for the separation of DNA fragments. The detection of platinum in the eluates by ICP-MS presented high sentivity to detect Pt-DNA fragments. The evidence of the applicability of the developed methods was assessed with the search for biomarkers of efficacy of treatment with cisplatin. The determination of DNA adducts containing platinum presented an interesting approach for obtaining a biomarker of resistance to cisplatin treatment.

4) Artigo de revisão publicado na Revista *Metallomics*, **2014**, 6, 2176-2188.



Cite this: *Metallomics*, 2014,
6, 2176

Biomarkers to assess the efficiency of treatment with platinum-based drugs: what can metallomics add?

Thiago de O. Araujo,^{*ab} Lilian T. Costa,^{bcd} Janaina Fernandes,^{ce}
Ricardo Queiroz Aucélio^a and Reinaldo Calixto de Campos^{†a}

Since the approval of cisplatin as an antineoplastic drug, the medical and the scientific communities have been concerned about the side effects of platinum-based drugs, and this has been the dose-limiting factor that leads to reduced treatment efficiency. Another important issue is the intrinsic or acquired resistance of some patients to treatment. Identifying proper biomarkers is crucial in evaluating the efficiency of a treatment, assisting physicians in determining, at early stages, whether or not the patient presents resistance to the drug, minimizing severe side effects, and allowing them to redirect the established course of chemotherapy. A great effort is being made to identify biomarkers that can be used to predict the outcome of the treatment of cancer patients with platinum-based drugs. In this context, the metallomic approach has not yet been used to its full potential. Since the basis of these drugs is platinum, the monitoring of biomarkers containing this metal should be the natural approach to evaluate treatment progress. This review intends to show where the research in this field stands and points out some gaps that can be filled by metallomics.

Received 17th July 2014,
Accepted 21st October 2014

DOI: 10.1039/c4mt00192c

www.rsc.org/metallomics

^aPontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio), Brazil.
^bE-mail: toaraujo@inmetro.gov.br
^cInstituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), Brazil
^dIUMPEX-BIO – Polo Xerém, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Duque de Caxias, 25245-390, R.J., Brazil
^eFaculdade de Medicina de Petrópolis/FMP, Petrópolis, 25.680-120, RJ, Brazil
^fNational Institute for Translational Research on Health and Environment in the
Amazon Region - INPETAM, Brazil
[†] Deceased.

Introduction

Since the late 1970's, platinum-based drugs have been successfully used against a wide variety of tumours and they are still some of the most important agents for cancer treatment.¹ The severe side effects have concerned the medical and scientific communities since the first trials and have been the dose-limiting factor, which reduces treatment efficiency.² Another important limitation of such a treatment is the intrinsic or



Thiago de O. Araujo

Thiago de Oliveira Araujo obtained his undergraduate degree in chemistry at Universidade de Brasília (UNB) in 2002, and concluded his PhD in natural sciences at Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio) in 2014, investigating tools to determine Pt-containing biomolecules. He has been a researcher at the National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro) since 2002, coordinated the Inorganic Analysis Laboratory from 2006 to 2009, and is now coordinating the multidisciplinary field of Forensic Sciences within the chemical division of Inmetro.



Lilian T. Costa

Lilian T. Costa (PhD obtained at the Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil) develops research in structural biology at the Federal University of Rio de Janeiro where she is currently an associate professor. She is a specialist in atomic force microscopy and force spectroscopy. Her research is focused on the structural determination of biomolecules in order to correlate their changes with several diseases.

acquired resistance to these drugs. The mechanisms of such resistance have been reviewed recently by Galluzzi *et al.*³ and this is still a hot topic of scientific investigation.^{3–5} Once a treatment is found to not be effective or if the prognosis is not favourable, there is no point in exposing patients to the severe side effects caused by platinum-based drugs.^{6,7}

Biomarkers that can reliably indicate the resistance of tumours or help to determine the prognosis of patients under treatment may play an important role by improving treatment efficiency through the adjustment of the chemotherapy strategy and minimizing patients' exposure to the drug side effects.^{6,8} According to the National Cancer Institute, in its Dictionary of Cancer Terms,⁹ a biomarker is defined as a “*biological molecule found in blood, other body fluids, or tissues that is a sign of a normal or abnormal process, or of a condition or disease. A biomarker may be used to see how well the body responds to a treatment for a disease or condition*”. However, the distance between the first attempts to identify a biomarker and its

acceptance and use in the clinic is huge. Despite this, their scientific, social and economic potentials make such endeavours worthwhile.⁸

The importance of biomarkers can be inferred from the number of publications about the topic and by the growing number of specific databases condensing information about them, such as GOBIOM, BiomarkersBase and CancerDrive, among others. A simple search for “cisplatin” at GVK BIO's Online Biomarker Database (GOBIOM)¹⁰ returns around nine hundred molecules; however, the United States Food and Drug Administration (FDA) has approved only ten of them. Within this database, the biomarkers are classified as biochemical, genomic, cellular, scoring scale, imaging, or physiological. These classes are related to the molecular characteristics and/or to the method applied to measure them. The biomarkers classified as biochemical account for 59.7% of the outcome of the search, while the genomic markers represent 29.3% of the total. Other classes of biomarkers are also represented: cellular (4.9%) and imaging (1.7%). Scoring scale and physiological types of biomarkers to determine the effectiveness of platinum-based chemotherapy were not considered due to the scope of this review. The number of “under investigation” biomarkers reflects Drucker *et al.*'s recent statement that after the development of the “omics” the search for molecular indicators increased substantially.⁸ Most biochemical and genomic biomarkers were conceived using genomic or proteomic techniques. Metallomics, as the newest *omic* approach, could be useful to identify biomarkers, especially to diagnose the action of metal-containing drugs, but so far the authors were not able to find any reported biomarker in clinical use identified through this approach.

Many biochemical and genomic biomarkers have been suggested for the detection of different diseases; however, most of them are not specific and do not allow the identification of diseases in their earlier stages. Most potential biomarkers did not make the transition from the laboratory stage to



Janaina Fernandes

Janaina Fernandes obtained her PhD in biological sciences (biophysics) from the Federal University of Rio de Janeiro (2005). She is currently an associate professor at the Federal University of Rio de Janeiro. She has experience in the area of pharmacology, with emphasis on biochemistry and molecular pharmacology, working on the following topics: proteomics, antitumor activity of natural products and cancer multidrug resistance.



Ricardo Queiroz Aucélio

Ricardo Q. Aucélio (PhD obtained at the University of Florida) develops research in different branches of analytical chemistry at the Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro where he is currently an associate professor. He is a specialist in photoluminescence-based techniques (measured from molecules, atoms and nanoparticles) associated with separation techniques such as capillary electrophoresis, high performance liquid chromatography and thin-layer chromatography. His research also involves the use of lasers and nanomaterials in analytical chemistry aimed at the determination of biomolecules, pesticides, drugs and also analytes that affect the quality of petroleum and biofuels.



Reinaldo Calixto de Campos

Reinaldo Calixto de Campos worked at the Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro where he was an associate professor. He developed research in atomic spectrometry (atomic absorption, atomic fluorescence and ICP-MS), associating it with separation techniques in order to achieve chemical speciation of metals present in biological and environmental samples. He was a specialist in the chemistry of mercury and its fate in the environment and also studied platinum-based drugs. Born in 1954, deceased in 2012.

Reinaldo Calixto de Campos worked at the Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro where he was an associate professor. He developed research in atomic spectrometry (atomic absorption, atomic fluorescence and ICP-MS), associating it with separation techniques in order to achieve chemical speciation of metals present in biological and environmental samples. He was a specialist in the chemistry of mercury and its fate in the environment and also studied platinum-based drugs. Born in 1954, deceased in 2012.

clinical studies.⁸ Despite this difficulty, the research effort put into the identification of molecular predictors is huge. By understanding the biochemistry of platinum-based drugs in the cellular environment, their mechanisms of action or tumour resistance towards them, potential biomarkers can be foreseen and lead to reliable indications of the efficacy of treatment. In the near future, as the platinum pathways in human organisms are determined, other biological processes will be understood and reliably predicted. Platinum-containing biomarkers are post-treatment indicators, which can provide information about an individual's metabolism of the drug, making it possible to evaluate and predict the outcome of the treatment. Platinum-based antineoplastic drugs allow the search for specific biomarkers to move in this direction, as platinum is a very rare element and can be sensitively detected. In this work, selected biomarkers being used as clinical assistants in cancer prognosis, in the evaluation of the effectiveness of platinum chemotherapy or in the determination of tumour resistance towards platinum-based drugs are reviewed. In addition, brief descriptions of the mechanism of action of these drugs, tumour resistance and the technologies used to investigate the biomarkers are presented, aiming to indicate the potential of metallomics in identifying reliable Pt-containing biomarkers.

Mechanisms of platinum-based drug activity

A complete comprehension of the mechanisms of action of platinum-based drugs has not yet been established, and conflicting data is observed in the literature.¹¹ What seems to be a consensus is that the main cytotoxic mechanism of platinum-based drugs is the formation of a covalent bond with DNA, preventing cell division and inducing cell apoptosis. However, several other factors contribute to their efficiency. Undoubtedly, cisplatin is the more studied drug of this group and serves as a reference in terms of activity and pharmacological principles to other drugs; thus, its pharmacokinetics are briefly presented.

After the application of cisplatin intravenously, the molecule undergoes hydrolysis due to the chloride concentration in the blood plasma and is carried by the blood in its original form. About 90% of the cisplatin physically interacts with plasma proteins such as albumin, and the remainder is solubilized. Carboplatin is more stable than cisplatin in the blood; on the other hand, oxaliplatin is hydrolysed even at high chloride concentrations. In the blood stream oxaliplatin interacts strongly with erythrocytes and blood proteins and only 12% is available to enter other cells.¹² Cisplatin is rapidly distributed in organs and tissues and is found mainly in the liver and kidneys.¹³ The drug concentrations in plasma rapidly decrease, with the half-life of ultrafilterable platinum in the plasma ranging from 20 to 45 min. Approximately 25% of the drug is excreted in the urine over the first 24 h, and up to 90% is eliminated in up to five days.¹⁴

The spatial distribution of platinum in the lymphocytes of patients treated with cisplatin and in cultured cell lines are shown to be nearly the same: about 20% remain in the cell membrane, about 60% are found in the cytosolic fraction, 10% are at the cytoskeleton and 10% are in the nucleus.¹⁵ After crossing the cell membrane by passive or active transport,¹⁶ cisplatin is in a medium with a chloride concentration of about 3 to 20 mmol L⁻¹ and undergoes hydrolysis, converting into the most active forms of the drug.³ Upon entering the cell, cisplatin interacts with the plasma membrane, disrupting lipid-lipid and lipid-protein interactions.¹⁷ It is believed that this interaction may lead to the recruitment and activation of caspase 8 and, consequently, the activation of other caspase cascades leading to caspase-dependent cell apoptosis. Cisplatin in the cytoplasmic fraction interacts with a number of nucleophilic species such as endogenous reduced glutathione (GSH), methionine, metallothionein, and other cytoplasmic proteins.^{3,18–20} The action of cisplatin in the cytoplasm has a depletive effect on reduced species, providing a favourable environment for oxidative stress, which enhances the action of the drug in the cell nucleus,³ at the endoplasmic reticulum and at the mitochondria.^{17,21,22} In the cytoplasmic fraction of the cell, cisplatin also interacts with RNA, affecting cell signalling and gene expression.²³ Considering what is known today, these are the major cytotoxic mechanisms of cisplatin. Most of the other drug interactions in the cytoplasm are considered to be sources of resistance.

In the cell nucleus, cisplatin binds to DNA, modifying its structure and preventing cell replication. About 1% of the total cisplatin absorbed by the cell is connected to the nuclear DNA.²⁴ Cisplatin interacts with DNA to form a series of adducts, with a preference for linking the N7 position of the purine bases, and can form double adducts with connections in a single strand or between the DNA strands. Cisplatin may also form adducts with DNA bases or DNA-protein adducts. If the DNA damage is too extensive the cell progresses to apoptosis. The most important signalling pathway linking the DNA damage caused by cisplatin to apoptotic cell death involves the activation, in sequence, of a series of proteins in the nucleus and cytoplasm. The process starts with the activation of damage checkpoint 1 kinase (CHEK 1) proteins, and in turn the phosphorylation of the tumour suppressor protein p53.^{25–27} Once activated, p53 triggers a number of lethal functions in the nucleus and cytoplasm, which lead to apoptosis of the cell.^{22,28,29}

Current biomarker investigation tools

In the last 20 years, the possibility of biomarker investigation has grown immensely due to the advent of new technologies and tools made available to researchers. A myriad of approaches making use of these tools and the possible combinations of them are described in the literature. The advances in data treatment are also very important as scientists need to combine numerous results emerging from different sources in order to extract information about the responses to cancer treatment.

These advances represent the basis for the implementation of new reliable indicators that will be used by physicians in the near future. Some of the main advances present in the literature are briefly discussed.

In the genomics field, Next-Generation Sequencing (NGS) has been extensively used to identify somatic mutations and to determine the expression of many genes involved in crucial pathways such as EGFR and BRAF.³⁰ It has also been used to determine the expression of the KRAS gene, a relevant potential biomarker.³¹ NGS platforms are based on sequencing-by-synthesis technology, with a DNA polymerase or ligase as the key component. Roche 454, Illumina, Helicos, and PacBio (Pacific Biosciences) use a DNA polymerase to drive their sequencing reaction, while SOLiD (Life Technologies) and Complete Genomics use a DNA ligase. The sequencing platforms can be further categorized as either single molecule-based (sequencing a single molecule) or ensemble-based (sequencing multiple identical copies of a DNA molecule).³² Due to the huge amount of data produced with a single sequencing experiment (up to 200 million 100-nucleotide reads), careful experimental delimitation and a clear definition of the target data are mandatory. Data treatment for identification of biomarkers through differential expression, for example, must be sought with the aid of specialized and validated software.³²

Besides NGS, other powerful tools to investigate biomarkers are DNA microarrays. They enable high-throughput gene expression profiling through the specific reaction of complementary DNA (cDNA) fixed on a rigid support with target RNA present in the sample.³³ Through the overall RNA determination, the gene expression can be inferred. Many examples of the use of DNA microarray platforms to study differences in genetic expressions, which could be used as biomarkers, are found in the literature for different malignancies such as lung adenocarcinoma,³⁴ and prostate cancer,³⁵ among others; the approach was also used to evaluate DNA methylation changes.³⁶

The proteomics approach makes use a group of techniques that enable large-scale identification, characterization, and quantification of proteins in complex biological samples.³⁷ Classical techniques make use of immunoassays such as Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are common on research, and are the most common approach in clinical exams already prescribed by clinicians.³⁸ Although ELISA is reliable and well established, the need for high throughput and great specificity bring other techniques into the spotlight. The analysis of the proteome using 2D electrophoresis followed by mass spectrometry (MS) is currently one of the most used approaches in comparative proteomics. Samples are prepared in parallel and proteins are separated by 2D high resolution electrophoresis. The different spots on the gel are usually characterised by electrospray ionization MS (ESI-MS) or matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) time-of-flight (TOF) MS (MALDI-TOF) either in top-down or in bottom-up approach. MALDI-MS is the most common mass analysis employed due to its ability to acquire peptide mass fingerprinting (PMF) with high throughput.³⁹ PMF is a very useful approach for the rapid identification of a well-separated isolated protein. Tandem mass spectrometry

(MS/MS) analysis exploits the fragmentation of selected precursor peptide ions, giving greater confidence in protein identification.³⁷

Protein microarrays are technical platforms for target proteomics based on quantitative protein expression focused on high throughput analysis. Similar to DNA microarrays, these techniques use a solid surface where hundreds to thousands of probing molecules are immobilized by robotic printing, and the liquid sample is incubated on the surface.⁴⁰ The applications of protein microarrays in identifying new biomarkers are broad and examples present in the literature include the assessment of breast cancer recurrence and the evaluation of risk of developing bone metastasis from breast cancer,⁴¹ as well as the evaluation of the expression profile of colon cancer,⁴² NSCLC,⁴³ pancreatic cancer⁴⁴ and acute myelogenous leukemia.⁴⁵

Regarding metallomics, the main characteristic of its approach is to be able to detect the elements associated with biomolecules. This characteristic is, in general, fulfilled by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) coupled to a separation technique such as HPLC. Separation techniques are employed to determine the metallome because the detectors used are selective only for the different elements (like Pt in the case of Pt-based drugs). The target molecules must be separated prior to the detection event. Electrophoresis has been used along with laser ablation (LA) in the hyphenated technique LA-ICP-MS for the identification of metal-containing molecules. Most recently, LA-ICP-MS has been reported to be used in conjunction with protein microarrays, making it possible to probe metal-containing proteins from tissue lysates,⁴⁶ which represents a huge step in metallomics development. The ability to probe a great number of species with known activity is very promising for the investigation of biomarkers and of biological processes in general.

The association of metallomics techniques with proteomics allows information to be gained about the general protein expression and which proteins contain a specific element. In the imaging field, Bianga *et al.* used LA-ICP-MS and MALDI imaging to study the penetration and distribution of two Pt-based metallodrugs (cisplatin and oxaliplatin) in human tumour samples that were removed from patients diagnosed with colorectal or ovarian peritoneal carcinomatosis.⁴⁷

The extensive databases used both by genomics and proteomics require powerful algorithms to assemble the pieces of the produced information, and organise and manage them in a systematic way so that useful information can be obtained. Bioinformatics is fundamental for processing the huge amount of data produced using the techniques mentioned above and extracting valid and reliable information from them. Great efforts are being made in this field and databases such as the Protein Data Base (PDB), database of metal-binding sites in protein structures (MDB), database of information on the catalytic mechanisms of metal-dependent enzymes (Metal-MACiE), and database of literature-based annotation of metalloproteins (PROMISE)⁴⁸ are available. Software for data treatment such as MITICS,⁴⁹ OmniSpect,⁵⁰ BioMap, MATLAB and Origin, among others, are making it possible to organize the data in a suitable way.

It is important to point out that all the mentioned technologies are analytical tools; thus, standardization, validation and quality control are mandatory for a good quality of results.⁵¹

Gene expression based biomarkers

Gene expression control is of fundamental importance in cell behaviour. This becomes very clear if one considers that the whole genome is present in every cell, and the differentiation among these cells is due to the genic expression. Which, when and how much of a molecule will be expressed is dependent on a series of proteins and enzymes that control DNA transcription.⁵² All cancerous processes are related to changes in cell genic expression. Many of the typical cancer cell behaviours, for instance increased cell proliferation, insufficient apoptosis and cell differentiation, are related to the expression of proteins and RNA that regulate these processes.⁵³ The genic expression biomarkers are the most common in use clinically and their use is beginning to become a standard practice.^{54–56} These biomarkers are the first to be used in the development of personalized medicine.

The TPMT gene encodes enzymes involved in cisplatin metabolism and it presents some single nucleotide polymorphisms (SNPs) that have been associated with a predisposition to toxicity during or after cisplatin treatment.⁵⁷ There is still some discussion in the literature whether this genetic marker is reliable,⁵⁸ but this is the only biomarker cited for cisplatin with commendation and approval of the FDA. The gene mutations were screened using the *Illumina GoldenGate* assay and quantified using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).⁵⁷ Other genes are used in platinum-based therapy, but they are not specific for the patient response to treatment with this drug. Some important selected examples are shown below.

A germline mutation in let-7 complementary site 6 (LCS6) within the untranslated region of the KRAS gene is known to be associated with a poor outcome and drug resistance in various cancers compared to the wild type allele.⁵⁹ The KRAS gene is a proto-oncogene and a single nucleotide substitution is responsible for activating mutation. The resulting translated protein is implicated in various malignancies, including lung, mucinous adenoma, adenocarcinoma, ductal carcinoma of the pancreas and colorectal carcinoma.⁶⁰ Besides this, the KRAS-variant is a potentially promising biomarker of poor prognosis and a predictive biomarker of cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)⁵⁹ and non-small cell lung cancer (NSCLC),⁶¹ among others. The gene variation is determined using a PCR-based assay, and validation is being pursued.⁵⁹

The RRM1 gene encodes one subunit that constitutes ribonucleoside-diphosphate reductase, an essential enzyme for the production of deoxyribonucleotides prior to DNA synthesis in S-phase of dividing cells. Lower expression levels of this gene along with SNP mutations are associated with a better response to cisplatin treatment in NSCLC.^{62,63} The gene is screened and quantified using multiplex quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The significance of this

gene expression as a biomarker is usually associated with ERCC1 gene expression. Down regulation of the latter is also associated with a better treatment outcome and prognosis. Overexpression of ERCC1 is directly related to a poorer prognosis and treatment outcome.⁶⁴ The expression of this is being measured using different approaches such as in peripheral blood⁶⁵ and tumour tissue, among other matrices, which makes its clinical use easier. Although there are problems with the expression measurement,⁶⁶ this appears to be the most promising biomarker to enter clinical use.⁶⁴

MiRNAs are small non-protein-coding RNA molecules that play an important role in different biological processes, such as proliferation, differentiation and apoptosis, by regulating gene expression. MiRNA-21 transcription is correlated with resistance to the cisplatin chemotherapy regimen: the lower the expression the better the outcome. The expression level of miRNA-21 in tumour tissue and plasma was indicated by Gao *et al.*⁶⁷ as a biomarker to predict adjuvant platinum-based chemotherapy response and disease free survival in patients with NSCLC and also with oesophageal cancer.⁶⁸ The miRNAs are measured using a specific microarray and RT-qPCR, and it has also been proposed as a circulating biomarker able to provide prognosis, diagnosis and therapy progress.⁶⁹

Besides the evaluation of individual genes, the genetic signatures (which make use of statistics-based analytical tools) have been proposed as indicators of treatment outcome. Zhu *et al.* propose a 15-gene expression signature that is considered as an independent prognostic marker, which can predict the patients most likely to benefit from adjuvant chemotherapy with cisplatin/vinorelbine.⁷⁰ Kratz and co-workers established a quantitative-PCR-based assay based on 14 genes that, according to their findings, is able to identify patients with early-stage non-squamous NSCLC at high risk of mortality after surgical resection.⁷¹

Protein expression biomarkers

The genetic expression of a cell can be inferred from the pool of proteins found in it. Changes in the protein expression pattern are often observed when the cell is exposed to some level of stress. Based on these principles, a *proteomic* approach can evaluate the behaviour of a tumour based on the comparative protein expression pattern of healthy/cancerous cells or treated/non-treated cells (using, for instance, patient tissue or blood). Protein expression is believed to be the next hot spot of research to clarify the metabolism of platinum-based drugs.⁷²

Kuang *et al.* presented a proteomics approach, making use of Western blot and real-time PCR to identify possible biomarkers of efficiency for cisplatin-based treatment. The group has identified eight differentially expressed proteins in one pair of cisplatin sensitive/cisplatin resistant NSCLC cell lines. Special attention is given to the DDH2 protein. This protein was investigated in the serum of patients with NSCLC being treated with cisplatin. They observed significantly different levels of the

protein in the blood of patients who presented disease progression, stability or amelioration.⁷³

Fitzpatrick *et al.* used LC-MS to identify and quantify over 2000 proteins from two pairs of cisplatin sensitive/cisplatin resistant cell lines. Among these, 760 proteins showed significant expression changes. Based on these results, several potential pathways that may be involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer can be suggested. This study provides a proteomics platform for large-scale quantitative protein analysis, besides important information for the investigation of new biomarkers of cisplatin resistance in ovarian cancer.⁷⁴

The efficacy of cisplatin treatment of tumour tissue from osteosarcoma has been evaluated through protein expression profiling. 2-D difference gel electrophoresis was applied and 33 spots were found to differ significantly, allowing the classification of patients in good or poor responder groups. These spots were later identified by ESI-MS. The identification of a higher expression of peroxiredoxin 2 (PRDX2) in poor responders was confirmed using Western blotting.⁷⁵

Transmembrane 205 (TMEM205, previously known as BC3205), a predicted transmembrane protein, has shown expression profiles in normal human tissues that indicate a differential expression pattern with higher expression levels in the liver, pancreas, and adrenal glands. The overexpression of TMEM205 in cells may be valuable as a biomarker in cancer chemotherapy. Stable transfection of the TMEM205 gene confers resistance to cisplatin by approximately 2.5 fold.⁷⁶

The secreted proteome has been also evaluated as a biomarker. Such an approach focuses on the possibility of collecting samples from the microenvironment of the tumour and/or around the tumour. Sixteen proteins were shown to be differentially expressed by three different epithelial ovarian carcinoma (EOC) cell lines, and the protein collagen, type XI, alpha 1 (COL11A1) was proposed as a biomarker for bad response to cisplatin treatment. The authors evaluated the proteome of these cell lines using numerous techniques.⁷⁷

Proposed biomarkers based on resistance mechanisms

The molecular basis of platinum-based drug resistance can be described by following their molecular mode of action, which involves several steps until the final response of the tumour cell towards the drug. Problems in achieving a DNA-damage response and mitochondrial apoptosis^{78,79} are the main factors impairing these drugs' efficiencies, leading to a poor treatment response. Herein, the goal is to discuss, at the molecular level, some points of the resistance mechanisms known so far in order to identify possible biomarkers that may allow clinicians to predict and monitor the clinical response to chemotherapy with platinum-based drugs. A better understanding of the mechanism by which these molecules are regulated, as well as their roles in drug sensitivity and resistance, may indicate crucial prognostic markers and therapeutic targets for cancer treatment.

Several molecules have been implicated in resistance to cisplatin. Methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1), which plays an important role in disease progression, is one of these. It is recruited to DNA damage sites under the DNA damage conditions induced by cisplatin. The silencing of MBD1 significantly impairs activation of the DNA damage checkpoint response and inhibits the DNA repair capacity.⁸⁰ MBD1 binds the mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1), which is induced by radiation and regulates NBS1 activation in the presence of DNA damage repair.⁸⁰

Another recently described modulator of cisplatin activity in tumours is Jab1 (a c-Jun coactivator), a multifunctional protein that participates in controlling cell proliferation and the stability of multiple proteins, and plays an important role in the cellular response to cisplatin and irradiation by regulating DNA damage and repair pathways.⁸¹ Jab1 positively regulated Rad51 through a p53-dependent pathway, and an increased ectopic expression of Rad51 conferred cellular resistance to cisplatin, infrared light (IR) and UV radiation in Jab1-deficient cells. They showed that Jab1 is overexpressed in two relatively cisplatin-resistant, IR-resistant and UV-resistant nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines.

Furthermore, cisplatin activity can be modulated by pathways that, depending on the stimulus and cell type, enhance or reduce cisplatin efficiency. Activation of autophagy in the early stages of apoptosis by BO-1051 (an *N*-mustard linked with a DNA-affinity molecule) acted as a defense system against cell death.⁸² Inhibition of autophagy in its early or late stages resulted in an increase in the number of annexin V-positive cells. BO-1051-induced autophagy has a cytoprotective role and is connected to the ATM signaling pathway. This study revealed autophagy as a cytoprotective response against DNA damage-inducing chemotherapeutic agents, including BO-1051, cisplatin, and doxorubicin, in hepatocellular carcinoma cell lines.⁸² On the other hand, autophagy is reported to enhance apoptosis induced by cisplatin. In lung cancer, treatment with cisplatin and radiation induced the overexpression of autophagy-related genes along with the apoptosis signaling genes and a marked up-regulation of p21 expression, offering evidence that autophagy may enhance cisplatin efficiency.⁸³

FOXO transcription factors, functioning downstream of the PI3K-PTEN-AKT (PKB) signaling cascade, are essential for cell proliferation, differentiation, DNA damage repair and apoptosis.⁸⁴ Recent research indicates that the related transcription factor FOXM1 is a direct target of repression by FOXO proteins. Inactivation of FOXO or overexpression of FOXM1 is associated with tumorigenesis and cancer progression. In addition, the cytostatic and cytotoxic effects of a diverse spectrum of anti-cancer drugs, such as paclitaxel, doxorubicin, lapatinib, gefitinib, imatinib and cisplatin, are mediated through the activation of FOXO3a and/or the inhibition of its target FOXM1. Paradoxically, FOXO proteins also contribute to drug resistance by driving the expression of important genes for drug efflux as well as DNA repair and cell survival pathways in drug resistant cancers.⁸⁴

One mechanism of cisplatin resistance in cells is through reduced intracellular platinum accumulation. This may result

from reduced uptake, increased drug export or intracellular sequestration. While cisplatin uptake is mediated through the copper transporter protein Ctr1, efflux is performed by two other copper transporting p-type adenosine triphosphatases (ATP7A and ATP7B). Samimi *et al.* described that changes in the expression of these proteins are implicated in cisplatin resistance and poor patient survival in some types of cancer, most notably ovarian cancer.⁸⁵ The ATOX1 chaperone has been recently described as the transporter that brings Pt from CTR1 to ATP7B. The interaction of Pt with this protein appears to be γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (reduced glutathione or GSH) competitive and stable ATOX1-Pt adducts have been observed.⁸⁶

Another important efflux system, cMOAT/MRP2, shows increased expression in tumour cells and several works have shown that this membrane transporter may contribute to cisplatin resistance.⁸⁷ MRP2 requires GSH as a cofactor and its role in protection from the cytotoxic effects of cisplatin may be a result of its ability to transport GSH-cisplatin conjugates across the cell membrane.⁸⁸ GSH can work in concert with cMOAT/MRP2 to pump GSH-cisplatin conjugates out of cells in an ATP-dependent manner. Resistance to cisplatin through this mechanism is entirely GSH-dependent.⁸⁹ Increased levels of intracellular SH are frequently observed in cisplatin-resistant tumours.⁹⁰

The capacity of cisplatin and other drugs to form bonds with thiol groups make them able to form bonds with metallothioneins (MTs), which are intracellular proteins containing the highest number of thiol groups within the cytoplasm. These thiol groups are able to bind several cytotoxic agents, such as platinum compounds. An increase in the level of MT is one mechanism of resistance to these anticancer drugs, as the intracytoplasmic binding of MT prevents the active molecules from reaching their target, the intranuclear DNA of tumour cells.^{91,92}

Thioredoxin reductase (TrxR) is the major cellular protein disulfide reductase containing selenium. TrxR catalyzes the ADPH-dependent reduction of the redox-active disulfide in thioredoxin (Trx), the so-called thioredoxin reductase/thioredoxin system, which serves a wide range of functions in cell proliferation and redox homeostasis.⁹³ TrxR is overexpressed in many cancer cells and TrxR and Trx can enhance tumour development and drug resistance, so this has been validated as a therapeutical target in several studies.⁹⁴ Furthermore, the TrxR/Trx system has a strong impact on tumour resistance to cisplatin.⁹⁵ As shown in several reports, cisplatin-resistant variants exhibited an increased expression and activity of TRXR as well as TRX compared with the parental cells. Additionally, the inhibition of the TrxR/Trx system restored cell sensitivity to cisplatin.^{96,97}

Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) is a key component of the platinum-DNA repair machinery responsible for nucleotide excision repair (NER). The levels of its expression protein were markedly higher in cisplatin-resistant derivatives of several tumour cell lines.^{98–102} The action of ERCC1 generates excised single-stranded DNA of approximately 30 nucleotides containing the Pt adduct and attached NER proteins. DNA polymerases and ligases fill in the gap using the normal strand as a template.¹⁰³

Altogether, the overexpression of proteins that regulate the DNA damage response, apoptosis, and the over activation of antioxidant mechanisms will converge to result in the reduced efficiency of cisplatin. Thus, an important issue for metallomics is how to efficiently monitor the outcome of metal-based treatments, so that this approach can positively improve patient survival rate.

Platinum containing biomarkers

The determination of biomolecules through the platinum atom bound to them is a unique characteristic of the metallomic approach in cancer research. This characteristic is fundamental for the investigation of a new generation of cancer biomarkers, as it allows the targeting of chemical species containing Pt that are products of the metabolism of the drug itself. Those species might provide information about processes that each patient goes through during treatment, giving physicians the ability to provide personalized medicine. Although metallomics presents such a potential, up to now there have been no biomarkers containing platinum approved by the FDA or with reported clinical use. Many studies making use of metallomics have been conducted to clarify the pharmacokinetics of platinum-based drugs but none of the identified species have been reported as biomarkers so far. The information acquired through metallomics, together with information about protein content, drug metabolites and genetic expression obtained through the different approaches, may provide comprehensive information on the fate of the drug (target, metabolism and resistance).

As the interaction of Pt with DNA is believed to be responsible for the cytotoxicity of Pt-based drugs, great effort has been put into the determination of Pt-DNA adducts. These studies also showed that there are between 1 to 5 Pt atoms per 10^6 nucleotides. Zayed and coworkers developed a very sensitive method for the determination of Pt-DNA adducts using liquid chromatography (LC) coupled to sector field (SF) ICP-MS (LC-SF-ICP-MS) that could be used for *in vivo* tests with a detection limit of 0.14 ng mL^{-1} of Pt.¹⁰⁴ Nevertheless, so far, these molecules have not been reported as biomarkers for resistance, effectiveness or prognosis of treatment outcome.

Wexselblatt and coworkers have reviewed the action of platinum compounds in the cell and DNA adduct generation. They not only emphasize the complexity and dynamic nature of cells that prevent us from monitoring the fate of platinum complexes in cells, but also showed the inability of current analytical techniques to provide, non-invasively and in real time, direct information on the speciation of platinum complexes in cells.

As a modulator of gene expression on multiple levels, RNA is an important potential biomarker. Pt-RNA adducts have the potential to have an impact on cell fate by disrupting RNA regulatory pathways. Hostetter *et al.* used *Saccharomyces cerevisiae* for the in-cell analysis of Pt adduct formation with mRNA and rRNA, and the total RNA and DNA platinum adducts.²³

Table 1 Examples of biomarkers related to Pt-based drugs

Biomarker	Determination ^b	Use/drug	Cancer type	Ref.
TPMT ^a	Enzyme assay and RT-PCR	Predictive (ear injury)/cisplatin	Solid pediatric tumours	55–58
ATP7A and ATP7B	Microarray	Resistance/multidrug	Diverse malignancies	85, 110
BO-1051	qRT-PCR, immunoassay	Resistance/cisplatin	Lung	82, 83
cMOAT/MRP2	HPLC-ICP-MS, qRT-PCR	Resistance/cisplatin	Nasopharyngeal, HNSCC	87–90
COL11A1	LC-MS/MS	Resistance/cisplatin	Ovarian carcinoma	77
ERCC1	Microarray, qRT-PCR	Predictive (treatment outcome)/multidrug	Lung, bladder, HNSCC, ovarian	6, 63, 64, 98–103
FOXO	ECL; RT-PCR	Resistance/cisplatin	Breast	84
Jab1	RPPA, qRT-PCR, immunoassay	Resistance/cisplatin	Nasopharyngeal carcinoma	81
KRAS	RT-PCR	Treatment outcome/multidrug	Gastric, HNSCC, lung, pancreas	30, 31, 59–61
MBD1	Immunoblot analysis	Resistance/multidrug	Pancreas	80
miRNA-21	Specific microarray and qRT-PCR	Predict resistance/multidrug	Oesophageal, lung	67–69
RRM1	qRT-PCR	Treatment outcome/cisplatin	Bladder, lung	62, 63
TMEM205	RT-PCR/qRT-PCR	Resistance/cisplatin	Liver, pancreas, adrenal gland	76
TrxR	2D GE, HPLC-ICP-MS	Prognosis and resistance/cisplatin	Diverse malignancies	93–97
Possible metallomic target biomarkers				
Metallothionein	2D PAGE; SEC-ICP-MS	Response indicator/multidrug	Diverse malignancies	91, 92
Pt–DNA adduct	HPLC-ICP-MS	Many studies about these molecules/multidrug	Diverse malignancies	15, 104
–GSH	HPLC-ICP-MS	Resistance/multidrug	Diverse malignancies	5, 88–90
–RNA adduct	Microarray, GE-ICP-MS, HPLC-ICP-MS	Resistance/cisplatin	Diverse malignancies	23, 32

This is the only biomarker approved by the FDA specific to cisplatin.^b GE: gel electrophoresis; SEC: size exclusion chromatography.

he estimated in-cell Pt concentrations and Pt accumulation. mRNA, rRNA, total RNA, and DNA were determined using ICP-MS. It was described that a similar Pt accumulation was observed on rRNA and total RNA, but significantly less Pt accumulated on mRNA. By using mapping by reverse transcription, they demonstrated specific Pt adduct formation on rRNA sequences conserved between yeast and humans. Taken together, these data highlight important differences in the relative accumulation of Pt on different RNA species and provide insight into the accessibility of cellular RNA to small, cationic molecules.²³

Due to the presence of a thiol group and numerous electron rich sites, and especially due to its high abundance in all cell compartments, GSH has been associated with resistance to Pt-based drugs since the early 1990's. There are many reports associating the superexpression of GSH with resistance to platinum-based drugs. Shoeib and Sharp showed many possible isomers for Pt–GSH structures.⁵ Although there is controversial data about the binding of Pt to GSH, many techniques to determine this biomolecule are present in the literature. In Table 1, some of the biomarkers currently approved by the FDA, in use, or under investigation are listed.

Cisplatin and oxaliplatin interact to a high extent with blood biomolecules. A small fraction of these drugs remains free 24 h after administration and the levels of Pt in the blood of patients treated with these drugs remain high for decades.^{105,106} On the other hand, most infused carboplatin is excreted intact, most of the drug incubated with rat ultra-filtrated plasma is recovered intact,¹⁰⁷ and adducts with proteins having molecular weights similar to human serum albumin (HAS) and g-globulin have been reported.^{108,109}

Conclusions

Molecular biomarkers are the most mature type of biomarkers and are already in use to evaluate patients' prognoses, treatment outcomes and overall survival rates. These biomarkers have solid and validated sample preparation and analysis kits available on the market, which makes their use easier, less expensive and widespread among clinical analysis laboratories.

The proteomic approaches appear to be a very promising field to be explored. The complexity of the interactions of platinum-based drugs with proteins (when in the blood stream, entering the cell, being distributed and actually exerting their cytotoxic effect) is large and many authors recognize the lack of complete information about this.^{72,86,111}

A new generation of biomarkers might be identified based on the metallomics approach. The ability of atomic spectroscopic methods to detect the Pt atoms bound to a diversity of biomolecules, following separation using chromatography, electrophoresis and even microarrays, can help to fill some of the gaps in the comprehension of the mechanisms of action of platinum-based drugs. This can reveal molecular markers that can help physicians to make decisions and foresee the treatment outcome and patient prognosis. Platinum-containing molecules that have been known for a long time, such as Pt–GSH and metallothioneins, can provide information about the availability of the active compound inside the cell. However, the specific studies to allow them to become clinical biomarkers are still to be carried out. Pt–DNA adducts can provide information about the activity of the ERCC1 and NER system, and consequently about resistance to Pt treatment. However, in all

the works reviewed in this text, digestion of the DNA is performed prior to platinum adduct determination. In such an experimental design, the biological information contained in the specific fragments generated by the NER is mixed with that of the other digested nucleotides, losing the biological signature of the origin of the adducts. Pt-ATOX1 and Pt-RNA adducts can apparently clarify the fate of platinum-based drugs and indicate treatment outcome. Besides Pt-containing molecules, it was shown that sulphur containing ones, such as TrxR, can play an important role as biomarkers of resistance.

Other metallo-biomarkers, not included in the present review, can be sought by applying the cutting edge metallomics tools shown above to investigate specific cellular processes, such as drug efflux, repair of DNA damage, secretion of Pt-containing molecules, mitochondria-induced apoptosis and apoptosis signaling outside of the cell (membrane protein).

Important barriers must be overcome to reduce the apparent distance between the metallomics tools and the medical community. As the increasing interaction of analytical scientists, biologists and medical doctors matures, advances in the field will certainly occur. In addition, evolution of sample treatment, simplification of analytical process and instrumentation, proper analytical validation and dissemination of the approach with consequent cost reduction are also important steps to be taken to bring metallomics to medical examinations.

Acknowledgements

The authors would like to thank the following for support and funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

References

- 1 *The Lancet*, 2013, **382**, i, DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61581-0.
- 2 G. Cavaletti, G. Tredici, G. Pizzini and A. Minoia, Tissue platinum concentrations and cisplatin schedules, *The Lancet*, 1990, **336**, 1003, DOI: 10.1016/0140-6736(90)92462-Q.
- 3 L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo and G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene*, 2012, **31**, 1869–1883, DOI: 10.1038/onc.2011.384.
- 4 G. T. a. I. Diaz-Padilla, in *Ovarian cancer – a clinical and translational update*, ed. I. Diaz-Padilla, In Tech, Crocia, 2013, pp. 205–224.
- 5 T. Shoenib and B. L. Sharp, Interactions of oxaliplatin with the cytoplasmic thiol containing ligand glutathione, *Metallomics*, 2012, **4**, 1308–1320, DOI: 10.1039/c2mt20127e.
- 6 K. A. Olausson, A. Dunant, P. Fouret, E. Brambilla, F. Andre, V. Haddad, E. Taranchon, M. Filipits, R. Pirker, H. H. Popper, R. Stahel, L. Sabatier, J. P. Pignon, T. Tursz, T. Le Chevalier and J. C. Soria, DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 983–991, 355/10/983 [pii].
- 7 I. Diaz-Padilla and A. Poveda, DNA Repair–Based Mechanisms of Platinum Resistance in Epithelial Ovarian Cancer: From Bench to Bedside, *Clin. Ovarian Cancer*, 2010, **3**, 29–35, DOI: 10.3816/COC.2010.n.005.
- 8 E. Drucker and K. Krapfenbauer, Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine, *EPMA J.*, 2013, **4**, 7, DOI: 10.1186/1878-5085-4-7.
- 9 <http://www.cancer.gov/dictionary?Cdrid=45618>, accessed 07/17/2014.
- 10 <https://gobiomdb.com/gobiom/>, accessed 04/17/2014.
- 11 A. V. Klein and T. W. Hambley, Platinum drug distribution in cancer cells and tumors, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4911–4920, DOI: 10.1021/cr9001066.
- 12 B. Desoize and C. Madoulet, Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, 2002, **42**, 317–325, S1040842801002190 [pii].
- 13 P. J. O'Dwyer, J. P. Stevenson and S. W. Johnson, Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs, *Drugs*, 2000, **59**, 19–27, DOI: 10.2165/00003495-200059004-00003.
- 14 R. S. Go and A. A. Adjei, Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin, *J. Clin. Oncol.*, 1999, **17**, 409–422.
- 15 A. Zayed, T. Shoenib, S. E. Taylor, G. D. D. Jones, A. L. Thomas, J. P. Wood, H. J. Reid and B. L. Sharp, Determination of Pt-DNA adducts and the sub-cellular distribution of Pt in human cancer cell lines and the leukocytes of cancer patients, following mono- or combination treatments, by inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, **307**, 70–78, DOI: 10.1016/j.ijms.2010.11.012.
- 16 B. G. Blair, C. A. Larson, R. Safaei and S. B. Howell, Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin, *Clin. Cancer Res.*, 2009, **15**, 4312–4321, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0311.
- 17 N. M. Martins, N. A. G. Santos, C. Curti, M. L. P. Bianchi and A. C. Santos, Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver, *J. Appl. Toxicol.*, 2008, **28**, 337–344, DOI: 10.1002/jat.1284.
- 18 R. R. Barefoot, Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anti-cancer drugs, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 2001, **751**, 205–211.
- 19 J. Calderón, D. Ortiz-Pérez, L. Yáñez and F. Díaz-Barriga, Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2003, **56**, 93–103, DOI: 10.1016/s0147-6513(03)00053-8.
- 20 L. A. Finney and T. V. O'Halloran, Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors, *Science*, 2003, **300**, 931–936, DOI: 10.1126/science.1085049.
- 21 J. L. Podratz, A. M. Knight, L. E. Ta, N. P. Staff, J. M. Gass, K. Genelin, A. Schlattau, L. Lathroum and A. J. Windebank,

- Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons, *Neurobiol. Dis.*, 2011, **41**, 661–668, DOI: 10.1016/j.nbd.2010.11.017.
- 22 N. Pabla and Z. Dong, Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies, *Kidney Int.*, 2008, **73**, 994–1007, DOI: 10.1038/sj.ki.5002786.
 - 23 A. A. Hostetter, M. F. Osborn and V. J. DeRose, RNA-Pt adducts following cisplatin treatment of *Saccharomyces cerevisiae*, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**, 218–225, DOI: 10.1021/cb200279p.
 - 24 V. M. Gonzalez, M. A. Fuertes, C. Alonso and J. M. Perez, Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?, *Mol. Pharmacol.*, 2001, **59**, 657–663.
 - 25 S. Y. Shieh, J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya and C. Prives, The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites, *Genes Dev.*, 2000, **14**, 289–300.
 - 26 E. Appella and C. W. Anderson, Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 2764–2772, [ejb2225 \[pii\]](#).
 - 27 H. Zhao and H. Piwnicka-Worms, ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1, *Mol. Cell. Biol.*, 2001, **21**, 4129–4139, DOI: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001.
 - 28 J. Wang, N. Pabla, C. Y. Wang, W. Wang, P. V. Schoenlein and Z. Dong, Caspase-mediated cleavage of ATM during cisplatin-induced tubular cell apoptosis: inactivation of its kinase activity toward p53, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006, **291**, F1300–F1307, 00509.2005 [pii].
 - 29 L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp, I. Vitale, M. Pinti and G. Kroemer, Mitochondrial liaisons of p53, *Antioxid. Redox Signaling*, 2011, **15**, 1691–1714, DOI: 10.1089/ars.2010.3504.
 - 30 M. T. Lin, S. L. Mosier, M. Thiess, K. F. Beierl, M. Debeljak, L. H. Tseng, G. Chen, S. Yegnasubramanian, H. Ho, L. Cope, S. J. Wheelan, C. D. Gocke and J. R. Eshleman, Clinical validation of KRAS, BRAF, and EGFR mutation detection using next-generation sequencing, *Am. J. Clin. Pathol.*, 2014, **141**, 856–866, DOI: 10.1309/AJCPMWGWGO34EGOD.
 - 31 N. Kothari, M. J. Schell, J. K. Teer, T. Yeatman, D. Shibata and R. Kim, Comparison of KRAS mutation analysis of colorectal cancer samples by standard testing and next-generation sequencing, *J. Clin. Pathol.*, 2014, 764–767.
 - 32 Y. Chu and D. R. Corey, RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation, *Nucleic Acid Ther.*, 2012, **22**, 271–274, DOI: 10.1089/nat.2012.0367.
 - 33 M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 1995, **270**, 467–470.
 - 34 L. C. Lai, M. H. Tsai, P. C. Chen, L. H. Chen, J. H. Hsiao, S. K. Chen, T. P. Lu, J. M. Lee, C. P. Hsu, C. K. Hsiao and E. Y. Chuang, SNP rs10248565 in HDAC9 as a novel genomic aberration biomarker of lung adenocarcinoma in non-smoking women, *J. Biomed. Sci.*, 2014, **21**, 24, DOI: 10.1186/1423-0127-21-24.
 - 35 P. Perot, V. Cheynet, M. Decaussin-Petrucci, G. Oriol, N. Mugnier, C. Rodriguez-Lafrasse, A. Ruffion and F. Mallet, Microarray-based identification of individual HERV loci expression: application to biomarker discovery in prostate cancer, *J. Visualized Exp.*, 2013, e50713, DOI: 10.3791/50713.
 - 36 C. J. Lee, J. Evans, K. Kim, H. Chae and S. Kim, Determining the effect of DNA methylation on gene expression in cancer cells, *Methods Mol. Biol.*, 2014, **1101**, 161–178, DOI: 10.1007/978-1-62703-721-1_9.
 - 37 B. Flatley, P. Malone and R. Cramer, MALDI mass spectrometry in prostate cancer biomarker discovery, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1844**, 940–949, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.06.015.
 - 38 R. Morgan, A. Boxall, A. Bhatt, M. Bailey, R. Hindley, S. Langley, H. C. Whitaker, D. E. Neal, M. Ismail, H. Whitaker, N. Annels, A. Michael and H. Pandha, Engrailed-2 (EN2): A Tumor Specific Urinary Biomarker for the Early Diagnosis of Prostate Cancer, *Clin. Cancer Res.*, 2011, **17**, 1090–1098, DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-10-2410.
 - 39 A. D. Weston and L. Hood, Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 179–196.
 - 40 D. A. Hall, J. Ptacek and M. Snyder, Protein microarray technology, *Mech. Ageing Dev.*, 2007, **128**, 161–167, S0047-6374(06)00254-5 [pii].
 - 41 N. Hayashi, G. C. Manyam, A. M. Gonzalez-Angulo, N. Niikura, H. Yamauchi, S. Nakamura, G. N. Hortobagyi, K. A. Baggerly and N. T. Ueno, Reverse-phase protein array for prediction of patients at low risk of developing bone metastasis from breast cancer, *Oncologist*, 2014, **19**, 909–914, DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0099.
 - 42 K. Malinowsky, U. Nitsche, K. P. Janssen, F. G. Bader, C. Spath, E. Drecoll, G. Keller, H. Hofler, J. Slotta-Huspenina and K. F. Becker, Activation of the PI3K/AKT pathway correlates with prognosis in stage II colon cancer, *Br. J. Cancer*, 2014, **110**, 2081–2089, DOI: 10.1038/bjc.2014.100.
 - 43 R. Ummanni, H. A. Mannsperger, J. Sonntag, M. Oswald, A. K. Sharma, R. Konig and U. Korf, Evaluation of reverse phase protein array (RPPA)-based pathway-activation profiling in 84 non-small cell lung cancer (NSCLC) cell lines as platform for cancer proteomics and biomarker discovery, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1844**, 950–959, DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.11.017.
 - 44 Y. J. Huang, M. L. Frazier, N. Zhang, Q. Liu and C. Wei, Reverse-phase protein array analysis to identify biomarker proteins in human pancreatic cancer, *Dig. Dis. Sci.*, 2014, **59**, 968–975, DOI: 10.1007/s10620-013-2938-9.
 - 45 S. M. Kornblau, A. Qutub, H. Yao, H. York, Y. H. Qiu, D. Graber, F. Ravandi, J. Cortes, M. Andreeff, N. Zhang and K. R. Coombes, Proteomic profiling identifies distinct protein patterns in acute myelogenous leukemia CD34+CD38- stem-like cells, *PLoS One*, 2013, **8**, e78453, DOI: 10.1371/journal.pone.0078453.
 - 46 L. Waentig, S. Techritz, N. Jakubowski and P. H. Roos, A multi-parametric microarray for protein profiling: simultaneous analysis of 8 different cytochromes *via* differentially element tagged antibodies and laser ablation ICP-MS, *Analyst*, 2013, **138**, 6309–6315, DOI: 10.1039/C3an00468f.

- 47 J. Bianga, A. Bouslimani, N. Bec, F. Quenet, S. Mounicou, J. Szpunar, B. Bouyssiére, R. Lobinski and C. Larroque, Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor, *Metallomics*, 2014, **6**, 1382–1386, DOI: 10.1039/C4mt00131a.
- 48 I. Bertini and G. Cavallaro, Bioinformatics in bioinorganic chemistry, *Metallomics*, 2010, **2**, 39–51, DOI: 10.1039/b912156k.
- 49 O. Jardin-Mathe, D. Bonnel, J. Franck, M. Wisztorski, E. Macagno, I. Fournier and M. Salzert, MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software, *J. Proteomics*, 2008, **71**, 332–345, DOI: 10.1016/j.jpro.2008.07.004.
- 50 R. M. Parry, A. S. Galhena, C. M. Gamage, R. V. Bennett, M. D. Wang and F. M. Fernandez, omniSpect: an open MATLAB-based tool for visualization and analysis of matrix-assisted laser desorption/ionization and desorption electrospray ionization mass spectrometry images, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2013, **24**, 646–649, DOI: 10.1007/s13361-012-0572-y.
- 51 L. J. Kricka and S. R. Master, Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods, *Mol. Biotechnol.*, 2008, **38**, 19–31, DOI: 10.1007/s12033-007-0066-5.
- 52 S. Clancy, DNA transcription, *Nat. Educ.*, 2008, **1**, 41.
- 53 W. A. Schulz, *Molecular Biology of Human Cancers*, Springer, Dordrecht, 1st edn, 2005.
- 54 V. A. Fusaro, C. Brownstein, W. Wolf, C. Clinton, S. Savage, K. D. Mandl, D. Margulies and S. Manzi, Development of a scalable pharmacogenomic clinical decision support service, *AMIA Jt. Summits Transl. Sci. Proc.*, 2013, **2013**, 60.
- 55 A. J. Thompson, W. G. Newman, R. A. Elliott, S. A. Roberts, K. Tricker and K. Payne, The cost-effectiveness of a pharmacogenetic test: a trial-based evaluation of TPMT genotyping for azathioprine, *Value Health*, 2014, **17**, 22–33, DOI: 10.1016/j.jval.2013.10.007.
- 56 C. A. Brownstein, D. M. Margulies and S. F. Manzi, Misinterpretation of TPMT by a DTC genetic testing company, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2014, **95**, 598–600, DOI: 10.1038/clpt.2014.60.
- 57 C. J. D. Ross, H. Katzov-Eckert, M.-P. Dubé, B. Brooks, S. R. Rassekh, A. Barhdadi, Y. Feroz-Zada, H. Visscher, A. M. K. Brown, M. J. Rieder, P. C. Rogers, M. S. Phillips, B. C. Carleton and M. R. Hayden, Genetic variants in TPMT and COMT are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy, *Nat. Genet.*, 2009, **41**, 1345–1349, DOI: 10.1038/ng.478.
- 58 J. J. Yang, J. Y. Lim, J. Huang, J. Bass, J. Wu, C. Wang, J. Fang, E. Stewart, E. H. Harstead, S. E. G. W. Robinson, W. E. Evans, A. Pappo, J. Zuo, M. V. Relling, A. Onar-Thomas, A. Gajjar and C. F. Stewart, The role of inherited TPMT and COMT genetic variation in cisplatin-induced ototoxicity in children with cancer, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2013, **94**, 252–259, DOI: 10.1038/clpt.2013.121.
- 59 J. B. Weidhaas, J. W. Lee, R. Slebos, J. Howard, J. Perez, J. Gilbert, S. Nallur, T. Paranjape, J. J. Garcia, B. Burtneess, A. A. Forastiere and C. H. Chung, Association of the 3'-untranslated region KRAS-variant with cisplatin resistance in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma, *J. Clin. Oncol.*, 2013, **31**, 6016.
- 60 C. Almoguera, D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim and M. Perucho, Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes, *Cell*, 1988, **53**, 549–554, DOI: 10.1016/0092-8674(88)90571-5.
- 61 N. Karachaliou, C. Mayo, C. Costa, I. Magri, A. Gimenez-Capitan, M. A. Molina-Vila and R. Rosell, KRAS Mutations in Lung Cancer, *Clin. Lung Cancer*, 2013, **14**, 205–214, DOI: 10.1016/j.clcc.2012.09.007.
- 62 G. Q. Wu, N. N. Liu, X. L. Xue, L. T. Cai, C. Zhang, Q. R. Qu and X. J. Yan, Multiplex Real-time PCR for RRM1, XRCC1, TUBB3 and TS mRNA for Prediction of Response of Non-small Cell Lung Cancer to Chemoradiotherapy, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, **15**, 4153–4158.
- 63 F. Mazzoni, F. L. Cecere, G. Meoni, C. Giuliani, L. Boni, A. Camerini, S. Lucchesi, F. Martella, D. Amoroso, E. Lucherini, F. Torricelli and F. Di Costanzo, Phase II trial of customized first line chemotherapy according to ERCC1 and RRM1 SNPs in patients with advanced non-small-cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2013, **82**, 288–293, DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.08.018.
- 64 K. K. Wei, L. Jiang, Y. Y. Wei, Y. F. Wang, X. K. Qian, Q. Dai and Q. L. Guan, The prognostic value of ERCC1 expression in gastric cancer patients treated with platinum-based chemotherapy: a meta-analysis, *Tumor Biol.*, 2014, 8721–8731.
- 65 M. Schena, S. Guarrera, L. Buffoni, A. Salvadori, F. Voglino, A. Allione, G. Pecorari, E. Ruffini, P. Garzino-Demo, S. Bustreo, L. Consito, P. Bironzo and G. Matullo, DNA repair gene expression level in peripheral blood and tumour tissue from non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell cancer patients, *DNA Repair*, 2012, **11**, 374–380, DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.01.003.
- 66 J. G. Schneider, N. Farhadfar, A. Sivapiragasam, M. Geller, S. Islam and E. Selbs, Commercial laboratory testing of excision repair cross-complementation group 1 expression in non-small cell lung cancer, *Oncologist*, 2014, **19**, 459–465, DOI: 10.1634/theoncologist.2013-0311.
- 67 W. Gao, X. Lu, L. Liu, J. Xu, D. Feng and Y. Shu, MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer, *Cancer Biol. Ther.*, 2012, **13**, 330–340, DOI: 10.4161/cbt.19073.
- 68 Y. Hu, A. M. Correa, A. Hoque, B. Guan, F. Ye, J. Huang, S. G. Swisher, T. T. Wu, J. A. Ajani and X. C. Xu, Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer, *Int. J. Cancer*, 2011, **128**, 132–143, DOI: 10.1002/ijc.25330.
- 69 G. Cheng, Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2014, DOI: 10.1016/S0169-409X(14)00199-9.
- 70 C. Q. Zhu, K. Ding, D. Strumpf, B. A. Weir, M. Meyerson, N. Pennell, R. K. Thomas, K. Naoki, C. Ladd-Acosta, N. Liu,

- M. Pintilie, S. Der, L. Seymour, I. Jurisica, F. A. Shepherd and M. S. Tsao, Prognostic and Predictive Gene Signature for Adjuvant Chemotherapy in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2010, **28**, 4417–4424, DOI: 10.1200/jco.2009.26.4325.
- 71 J. R. Kratz, J. He, S. K. Van Den Eeden, Z. H. Zhu, W. Gao, P. T. Pham, M. S. Mulvihill, F. Ziaei, H. Zhang, B. Su, X. Zhi, C. P. Quesenberry, L. A. Habel, Q. Deng, Z. Wang, J. Zhou, H. Li, M. C. Huang, C. C. Yeh, M. R. Segal, M. R. Ray, K. D. Jones, D. J. Raz, Z. Xu, T. M. Jahan, D. Berryman, B. He, M. J. Mann and D. M. Jablons, A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies, *Lancet*, 2012, **379**, 823–832, DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61941-7.
- 72 O. Pinato, C. Musetti and C. Sissi, Pt-based drugs: the spotlight will be on proteins, *Metalloomics*, 2014, **6**, 380–395, DOI: 10.1039/c3mt00357d.
- 73 P. Kuang, C. Zhou, X. Li, S. Ren, B. Li, Y. Wang, J. Li, L. Tang, J. Zhang and Y. Zhao, Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients, *Lung Cancer*, 2012, **77**, 427–432, DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.03.016.
- 74 D. P. G. Fitzpatrick, J.-S. You, K. G. Bemis, J.-P. Wery, J. R. Ludwig and M. Wang, Searching for potential biomarkers of cisplatin resistance in human ovarian cancer using a label-free LC/MS-based protein quantification method, *Proteomics: Clin. Appl.*, 2007, **1**, 246–263, DOI: 10.1002/prca.200600768.
- 75 D. Kubota, K. Mukaiharu, A. Yoshida, H. Tsuda, A. Kawai and T. Kondo, Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma, *J. Proteomics*, 2013, **91**, 393–404, DOI: 10.1016/j.jprot.2013.07.022.
- 76 D. W. Shen, J. Ma, M. Okabe, G. Zhang, D. Xia and M. M. Gottesman, Elevated expression of TMEM205, a hypothetical membrane protein, is associated with cisplatin resistance, *J. Cell. Physiol.*, 2010, **225**, 822–828, DOI: 10.1002/jcp.22287.
- 77 P. N. Teng, G. Wang, B. L. Hood, K. A. Conrads, C. A. Hamilton, G. L. Maxwell, K. M. Darcy and T. P. Conrads, Identification of candidate circulating cisplatin-resistant biomarkers from epithelial ovarian carcinoma cell secretomes, *Br. J. Cancer*, 2014, **110**, 123–132, DOI: 10.1038/bjc.2013.687.
- 78 E. R. Jamieson, M. P. Jacobson, C. M. Barnes, C. S. Chow and S. J. Lippard, Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMG1 domain B, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 12346–12354.
- 79 S. M. Cohen and S. J. Lippard, Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, **67**, 93–130.
- 80 J. Xu, W. Zhu, W. Xu, X. Cui, L. Chen, S. Ji, Y. Qin, W. Yao, L. Liu, C. Liu, J. Long, M. Li and X. Yu, Silencing of MBD1 reverses pancreatic cancer therapy resistance through inhibition of DNA damage repair, *Int. J. Oncol.*, 2013, **42**, 2046–2052, DOI: 10.3892/ijo.2013.1901.
- 81 Y. Pan, Q. Zhang, V. Atsaves, H. Yang and F. X. Claret, Suppression of Jab1/CSN5 induces radio- and chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma through changes to the DNA damage and repair pathways, *Oncogene*, 2013, **32**, 2756–2766, DOI: 10.1038/ncr.2012.294.
- 82 L. H. Chen, C. C. Loong, T. L. Su, Y. J. Lee, P. M. Chu, M. L. Tsai, P. H. Tsai, P. H. Tu, C. W. Chi, H. C. Lee and S. H. Chiou, Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway, *Biochem. Pharmacol.*, 2011, **81**, 594–605, DOI: 10.1016/j.bcp.2010.12.011.
- 83 M. Liu, S. Ma, Y. Hou, B. Liang, X. Su and X. Liu, Synergistic killing of lung cancer cells by cisplatin and radiation via autophagy and apoptosis, *Oncol. Lett.*, 2014, **7**, 1903–1910, DOI: 10.3892/ol.2014.2049.
- 84 J. M. Kwok, B. Peck, L. J. Monteiro, H. D. Schwenen, J. Millour, R. C. Coombes, S. S. Myatt and E. W. Lam, FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells, *Mol. Cancer Res.*, 2010, **8**, 24–34, DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0432.
- 85 G. Samimi, N. M. Varki, S. Wilczynski, R. Safaei, D. S. Alberts and S. B. Howell, Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 5853–5859.
- 86 A. Galliani, M. Losacco, A. Lasorsa, G. Natile and F. Arnesano, Cisplatin handover between copper transporters: the effect of reducing agents, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014, **19**, 705–714, DOI: 10.1007/s00775-014-1138-1.
- 87 S. M. Xie, W. Y. Fang, T. F. Liu, K. T. Yao and X. Y. Zhong, Association of ABCC2 and CDDP-Resistance in Two Sublines Resistant to CDDP Derived from a Human Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line, *J. Oncol.*, 2010, **2010**, 915046, DOI: 10.1155/2010/915046.
- 88 M. Tonigold, A. Rossmann, M. Meinold, M. Bette, M. Marken, K. Henkenius, A. C. Bretz, G. Giel, C. Cai, F. R. Rodepeter, V. Benes, R. Grenman, T. E. Carey, H. Lage, T. Stiewe, A. Neubauer, J. A. Werner, C. Brendel and R. Mandic, A cisplatin-resistant head and neck cancer cell line with cytoplasmic p53 exhibits ATP-binding cassette transporter upregulation and high glutathione levels, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2014, 1689–1704.
- 89 E. S. Arner, H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren and G. Spyrou, Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex, *Free Radical Biol. Med.*, 2001, **31**, 1170–1178, S0891584901006980 [pii].
- 90 S. Singh, T. Okamura and F. Ali-Osman, Serine phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by PKC α enhances GSTP1-dependent cisplatin metabolism and resistance in human glioma cells, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **80**, 1343–1355, DOI: 10.1016/j.bcp.2010.07.019.
- 91 J. Gumulec, M. Raudenska, V. Adam, R. Kizek and M. Masarik, Metallothionein - immunohistochemical

- cancer biomarker: a meta-analysis, *PLoS One*, 2014, **9**, e85346, DOI: 10.1371/journal.pone.0085346.
- 92 J. Gumulec, J. Balvan, M. Sztalmachova, M. Raudenska, V. Dvorakova, L. Knopfova, H. Polanska, K. Hudcova, B. Ruttkay-Nedecky, P. Babula, V. Adam, R. Kizek, M. Stiborova and M. Masarik, Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle, *Int. J. Oncol.*, 2014, **44**, 923–933, DOI: 10.3892/ijo.2013.2223.
 - 93 G. Powis and D. L. Kirkpatrick, Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2007, **7**, 392–397, S1471-4892(07)00091-4 [pii].
 - 94 S. Li, J. Zhang, J. Li, D. Chen, M. Matteucci, J. Curd and J. X. Duan, Inhibition of both thioredoxin reductase and glutathione reductase may contribute to the anticancer mechanism of TH-302, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2010, **136**, 294–301, DOI: 10.1007/s12011-009-8544-1.
 - 95 B. Zhou, J. Huang, Y. Zuo, B. Li, Q. Guo, B. Cui, W. Shao, J. Du and X. Bu, 2a, a novel curcumin analog, sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to cisplatin by inhibiting thioredoxin reductase concomitant oxidative stress damage, *Eur. J. Pharmacol.*, 2013, **707**, 130–139, DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.014.
 - 96 T. Sasada, H. Nakamura, S. Ueda, N. Sato, Y. Kitaoka, Y. Gon, A. Takabayashi, G. Spyrou, A. Holmgren and J. Yodoi, Possible involvement of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to *cis*-diamminedichloroplatinum (II), *Free Radical Biol. Med.*, 1999, **27**, 504–514, S0891-5849(99)00101-X [pii].
 - 97 A. B. Witte, K. Anestel, E. Jerremalm, H. Ehrsson and E. S. Arner, Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radical Biol. Med.*, 2005, **39**, 696–703, S0891-5849(05)00231-5 [pii].
 - 98 M. Z. Muallem, S. Marnitz, R. Richter, C. Kohler, J. Schouli and R. Arsenic, ERCC1 expression as a predictive marker of cervical cancer treated with cisplatin-based chemoradiation, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 401–406, 34/1/401 [pii].
 - 99 M. Z. Muallem, I. Braicu, M. Nassir, R. Richter, J. Schouli and R. Arsenic, ERCC1 expression as a predictor of resistance to platinum-based chemotherapy in primary ovarian cancer, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 393–399, 34/1/393 [pii].
 - 100 O. Ozdemir, P. Ozdemir, A. Veral, H. Uluer and M. H. Ozhan, ERCC1 expression does not predict survival and treatment response in advanced stage non-small cell lung cancer cases treated with platinum based chemotherapy, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013, **14**, 4679–4683.
 - 101 J. E. Bauman, M. C. Austin, R. Schmidt, B. F. Kurland, A. Vaezi, D. N. Hayes, E. Mendez, U. Parvathaneni, X. Chai, S. Sampath and R. G. Martins, ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial, *Br. J. Cancer*, 2013, **109**, 2096–2105, DOI: 10.1038/bjc.2013.576.
 - 102 Y. Torii, R. Kato, Y. Minami, K. Hasegawa, T. Fujii and Y. Udagawa, ERCC1 expression and chemosensitivity in uterine cervical adenocarcinoma cells, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 107–115, 34/1/107 [pii].
 - 103 E. C. Friedberg, How nucleotide excision repair protects against cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 2001, **1**, 22–33, DOI: 10.1038/35094000.
 - 104 A. Zayed, G. D. Jones, H. J. Reid, T. Shoeib, S. E. Taylor, A. L. Thomas, J. P. Wood and B. L. Sharp, Speciation of oxaliplatin adducts with DNA nucleotides, *Metalloomics*, 2011, **3**, 991–1000, DOI: 10.1039/c1mt00041a.
 - 105 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*, 1999, **387**, 135–144, DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00074-4.
 - 106 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.*, 2000, **28**, 1379–1384.
 - 107 P. Guo, S. Li and J. M. Gallo, Determination of carboplatin in plasma and tumor by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, **783**, 43–52, S1570023202004890 [pii].
 - 108 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.*, 2007, **387**, 2815–2822, DOI: 10.1007/s00216-007-1147-9.
 - 109 M. Sooriyaarachchi, A. Narendran and J. Gailer, Comparative hydrolysis and plasma protein binding of *cis*-platin and carboplatin in human plasma *in vitro*, *Metalloomics*, 2011, **3**, 49–55, DOI: 10.1039/c0mt00058b.
 - 110 S. Owatari, S. Akune, M. Komatsu, R. Ikeda, S. D. Firth, X. F. Che, M. Yamamoto, K. Tsujikawa, M. Kitazono, T. Ishizawa, T. Takeuchi, T. Aikou, J. F. Mercer, S. Akiyama and T. Furukawa, Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer, *Cancer Res.*, 2007, **67**, 4860–4868, 67/10/4860 [pii].
 - 111 E. Wexselblatt, E. Yavin and D. Gibson, Cellular interactions of platinum drugs, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, **393**, 75–83, DOI: 10.1016/j.ica.2012.07.013.