



Facultade de Ciencias
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Trabajo de fin de grado

***Efecto del cisplatino sobre la expresión de HMGB2 en
células de cáncer de próstata (PC3)***

***Efecto do cisplatino sobre a expresión de HMGB2 en
células de cancro de próstata (PC3)***

***Cisplatin effect upon HMGB2 expresion in prostate cancer
cells (PC3)***

Directores: Ángel José Vizoso Vázquez

María Esperanza Cerdán Villanueva

Miguel Riopedre Fernández

Año académico: 2018-2019 - Convocatoria: Julio

Índice de abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

ADNc- AND complementario.

ADT- Tratamiento de privación de andrógenos

AR- Receptor de andrógenos.

ARN- Ácido ribonucleico.

Cis-Pt- Cisplatino.

Cq- Ciclos cuantificados.

Ct- Línea de detección.

DAMP- *Damage Associated Molecular Patterns*.

DNAsa- Desoxirribonucleasa.

dNTPs- Nucleótidos.

DPBS- Tampón salino fosfato de Dulbecco.

FBS- Suero fetal bovino.

HMG- *High Mobility Group*.

HMGB- *High Mobility Group Box*.

N/A- No amplificado

PC- Cáncer de próstata-

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa.

qRT-PCR- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción.

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*.

SSRP1- *Structure Specific Recognition Protein 1*.

UV- Ultravioleta.

Resumen.

El cáncer de próstata es una enfermedad de alta incidencia entre la población masculina a nivel mundial, y tiene una elevada tasa de mortalidad.

Su pronóstico y tratamiento dependen en gran medida de la fase en que se haya detectado el tumor. En las primeras etapas, cuando la enfermedad se encuentra restringida a la próstata, sus índices de supervivencia son altos. Sin embargo, en estadios posteriores, se reducen enormemente. En gran parte, esto se debe a la capacidad del tumor para generar resistencia al tratamiento antiandrogénico. Una de las terapias más utilizadas una vez llegado a este punto es la quimioterapia, donde los derivados del platino juegan un papel esencial al producir la muerte celular. Sin embargo, desafortunadamente también se genera resistencia frente a estos compuestos.

Las proteínas de la familia HMGB (*High Mobility Group B*) están implicadas tanto en los mecanismos moleculares de respuesta al cisplatino como antineoplásico, como en la generación de nuevos tumores. Las proteínas HMGB se unen a los aductos formados entre el ADN y el cisplatino. Es por esto que el conocimiento de la respuesta de estas proteínas al tratamiento con fármacos derivados de platino es clave para mejorar la terapia de este tipo de cáncer.

En este estudio se ha medido la variación de la expresión génica de uno de los genes que codifican proteínas HMGB, *HMGB2*, de la que además se sabe que cumple un importante papel en el desarrollo del cáncer de próstata. Este estudio se ha llevado a cabo en células en cultivo, y utilizando distintas concentraciones de cisplatino.

Palabras clave: Cáncer de próstata, Cisplatino, Expresión génica, HMGB, HMGB2.

Resumo.

O cancro de próstata é unha enfermidade de alta incidencia entre a poboación masculina a nivel mundial, e ten unha elevada taxa de mortandade.

O seu prognóstico e tratamento dependen en gran medida da fase en que se foi detectado o tumor. Nas primeiras etapas, cando a enfermidade se atopa restrinxida á próstata, os seus índices de supervivencia son altos. Sen embargo, en estadio posteriores, redúcense enormemente. En gran parte, isto é debido á capacidade do tumor para xerar resistencia ó tratamento antiandroxénico. Unha das terapias máis utilizadas unha vez chegado este punto é a quimioterapia, onde os derivados do platino xogan un papel esencial ao producir a morte celular. Sen embargo, desafortunadamente tamén se xera resistencia fronte a estes compostos.

As proteínas da familia HMGB (*High Mobility Group B*) están implicadas tanto nos mecanismos moleculares de resposta ó cisplatino como antineoplásico, como na xeración de novos tumores. As proteínas HMGB únense ós aductos formados entre o ADN e o cisplatino. É por isto que o coñecemento da resposta destas proteínas ó tratamento con fármacos derivados de platino é clave para mellorar a terapia de este tipo de cáncer.

Neste estudo mediuse a variación da expresión xénica dun dos xenes que codifican proteínas HMGB, *HMGB2*, da que ademais sábese que cumpre un importante papel no desenvolvemento do cancro de próstata. Este estudo levouse a cabo en células en cultivo, e utilizando distintas concentracións de cisplatino.

Palabras clave: Cancro de próstata, Cisplatino, Expresión xénica, HMGB, HMGB2.

Abstract.

Prostate cancer is a high incidence disease among the male population worldwide, and has a high mortality rate.

Its prognosis and treatment depend on the stage in which the tumor is detected. In the early stages, when the disease is restricted to the prostate, survival rates are high. However, in later stages, they are greatly reduced. To a large extent, this is due to the ability of the tumor to generate resistance to anti-androgen treatment. One of the most used therapies once this point is reached is chemotherapy, where the platinum derivatives play an essential role in causing cell death. However, resistance is also generated against these compounds.

The proteins of the HMGB family (High Mobility Group B) are involved both in the molecular mechanisms of response to cisplatin as an antineoplastic, and in the generation of new tumors. The HMGB proteins bind to the adducts formed between DNA and cisplatin. This is why the knowledge of the response of these proteins to the treatment with these compounds is key to improve the therapy of this type of cancer.

In this study, we have measured the variation of gene expression of one of the genes that encode HMGB proteins, HMGB2, which is also known to play an important role in the development of prostate cancer. This study has been carried out on cells in culture, and using different concentrations of cisplatin.

Key words: Prostate cancer, Cisplatin, Gene expression, HMGB, HMGB2.

Contenido

1.	Introducción.	1
1.1.	El cáncer. Importancia y terapia.....	1
1.2.	El cáncer de próstata.....	2
1.3.	El cisplatino como fármaco antineoplásico.	3
1.4.	Relación entre la toxicidad derivada del cisplatino y las proteínas HMGB.	5
1.5.	Papel de HMGB2 en el cáncer. Papel concreto en el cáncer de próstata.	8
1.6.	Objetivo.	9
2.	Material y Métodos.....	10
2.1.	Cultivo celular.	10
2.2.	Tratamiento con cisplatino.	11
2.3.	Recogida de células tratadas.....	11
2.4.	Extracción de ARN.	12
2.5.	Cuantificación de ARN.....	13
2.6.	Tratamiento con DNAsa I.....	13
2.7.	Purificación y concentración de ARN.....	13
2.8.	Cuantificación mediante qRT-PCR.	13
2.9.	Análisis estadístico.	16
3.	Resultados y discusión.....	17
3.1.	Tratamiento con cisplatino.	17
3.2.	Extracción y purificación.	17
3.3.	Tratamiento con DNAsa I y cuantificación.	19
3.4.	Cuantificación de ARN mediante qRT-PCR.....	19
3.5.	Análisis estadístico.	23
4.	Conclusiones.	26
5.	Bibliografía.....	27

1. Introducción.

1.1. El cáncer. Importancia y terapia.

Las enfermedades que englobamos en el término “cáncer” se componen en realidad de aproximadamente 100 variantes diferentes, caracterizadas por una anormal proliferación celular y una alta capacidad de invasión de tejidos adyacentes y del desarrollo de otros tumores diferentes al primario en otros tejidos alejados del origen (metástasis) (Figura 1). La aparición de células malignas suele conducir a la formación de masas celulares denominadas tumores, que en los casos más graves pueden desembocar en la muerte del afectado (Hanahan and Weinberg, 2000).

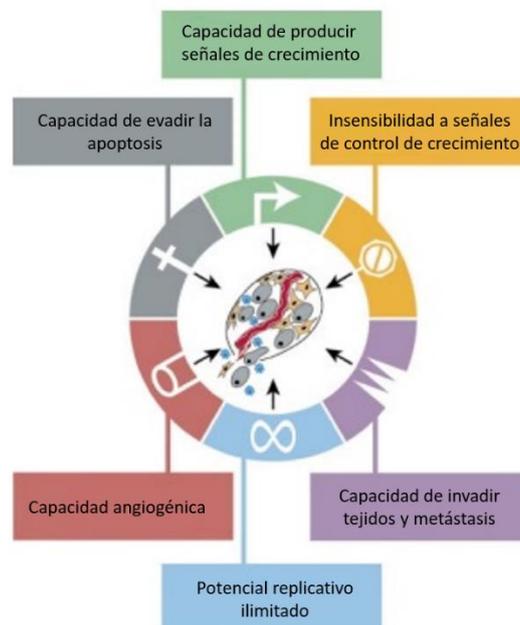


Figura 1 - Características de una célula de cáncer. En la parte superior se encuentran aquellas relacionadas con el incorrecto funcionamiento del ciclo celular. En la parte inferior, las relacionadas con la capacidad de invadir tejidos (Hanahan and Weinberg, 2000).

Estas enfermedades constituyen una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos en el año 2012 (últimos datos disponibles, estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN de la OMS) y con estimaciones poblacionales que indican que posiblemente aumente en torno al 70% en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de nuevos casos en el año 2035 (Sociedad española de oncología médica (SEOM), 2018). Esto ha supuesto en torno a 9,6 millones de muertes a nivel mundial en 2018 (UK Cancer research, 2018) y hace que las investigaciones para mejorar los tratamientos sean de vital importancia.

A pesar de que todos los tipos de cáncer se basan en la alta replicación de las células malignas, las bases genéticas y moleculares implicadas en el desarrollo de los mismos varían enormemente entre unos y otros. Este hecho genera dificultades a la hora de desarrollar procedimientos generales para el tratamiento de todos ellos, siendo necesaria una alta especificidad en la terapia escogida.

1.2. El cáncer de próstata.

Aproximadamente el 60% de los casos de cáncer de próstata son diagnosticados en hombres mayores de 65 años, siendo raros los casos en donde se diagnostica en menores de 40, y presentando mayor incidencia a partir de los 75 años. Cuenta con uno de los mayores índices de supervivencia tras cinco años de todos los cánceres, estando cercano al 100% cuando la enfermedad es encontrada en las primeras etapas del desarrollo. Sin embargo, para aquellos diagnosticados una vez la enfermedad ya se ha extendido, el índice de supervivencia tras cinco años disminuye hasta el 30% (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2005).

El cáncer de próstata supone la segunda causa de mortalidad debida a tumores en los estados unidos (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2005), en gran parte por la elevada reincidencia que presenta. Es habitual que los primeros tratamientos resulten muy efectivos, llevando a la reducción de la enfermedad. Sin embargo, normalmente los tumores de próstata recurren tras haber generado resistencia a ciertas terapias, convirtiéndose en un problema de mayores dimensiones (Gregory *et al.*, 2001).

En las primeras etapas del desarrollo (estadios I y II) el cáncer avanza despacio, y suele encontrarse confinado en la próstata. En estos casos una intervención quirúrgica relativamente sencilla suele ser el procedimiento médico más utilizado (Zaitzu *et al.*, 2012).

Por otro lado, en cánceres metastásicos, el tratamiento primario suele ser la hormonoterapia basada en la privación de la producción de andrógenos (ADT). Esto es debido a que el cáncer de próstata es una enfermedad hormodependiente de la presencia de dihidrotestosterona, una hormona derivada de la testosterona. Normalmente, la enfermedad remite tras la terapia. Sin embargo, la reincidencia es habitual debido a la generación de resistencia al tratamiento. Los tumores resistentes son denominados hormono refractarios (Gregory *et al.*, 2001; Zaitzu *et al.*, 2012).

Uno de los procedimientos más utilizados a la hora de tratar cánceres metastásicos refractarios es la quimioterapia. Esta consiste en el tratamiento de la enfermedad

mediante la administración de agentes químicos cuyo objetivo final es inducir la muerte de las células tumorales. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la respuesta de los tumores al tratamiento farmacológico es insuficiente (Yagoda and Petrylak, 1993). Por esta razón, la investigación en diferentes campos, como el diseño de nuevos fármacos o el descubrimiento de los procesos moleculares que provocan la ineffectividad de los tratamientos actuales es de vital importancia.

1.3. El cisplatino como fármaco antineoplásico.

Uno de los principales agentes antineoplásicos, por su gran espectro de actuación y efectividad en las primeras etapas es el cis-diamminodicloruroplatino (II), comúnmente conocido como cisplatino (cp). Este es un compuesto de coordinación originalmente descubierto por M. Peyrone en 1844 (Shaloam and Tchounwou, 2014) (Figura 2).

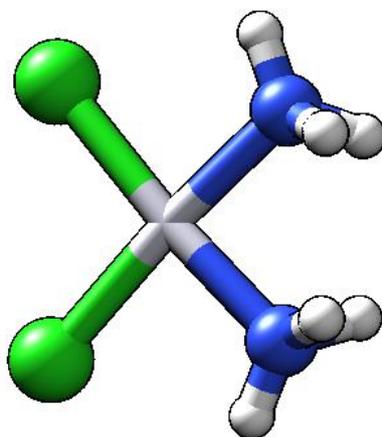


Figura 2 - Representación en 3D del cisplatino.

Sin embargo, no gozó de importancia en la investigación biomédica hasta las observaciones realizadas B. Rosenberg en la década de 1960, cuando, durante un experimento para detectar posibles efectos de las descargas eléctricas sobre cultivos bacterianos, se descubrió que la formación de compuestos derivados del electrodo de platino era capaz de inhibir la capacidad de replicar el ADN de *E. coli*, manteniéndose activa la síntesis de ARN y proteínas (Rosenber, Van Camp and Krigas, 1965).

Este compuesto ha demostrado utilidad en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo, entre otros, el testicular, el ovárico, el de pulmón o el de próstata (Fuentes *et al.*, 2012).

El cisplatino se administra al paciente por vía intravenosa, y viaja por el plasma sanguíneo hasta el interior de las células. El mecanismo de entrada en la célula no está

totalmente comprendido, pero sí parece confirmado que este se basa principalmente en procesos de difusión pasiva, ayudado, en algunos casos, por transporte facilitado o activo (Fuertes *et al.*, 2012).

Una vez llega al interior de las mismas se produce un intercambio de sustituyentes de cloro por moléculas de agua. Esto convierte al fármaco en su forma activa, capaz de interaccionar con varios componentes celulares, tales como los grupos tiol de algunas proteínas o los nitrógenos de los ácidos nucleicos (Figura 3) (Shaloam and Tchounwou, 2014). Este último caso es el más importante desde el punto de vista de su uso como quimioterapéutico.

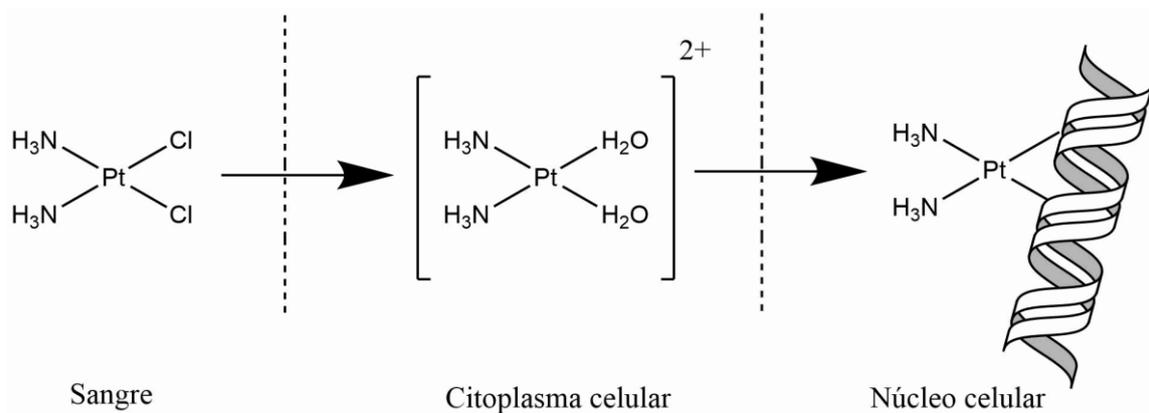


Figura 3 - Mecanismo de acción del cisplatino.

El cisplatino tiene varios modos de unión al ADN, siendo la interacción con los N-7 de dos guaninas contiguas de la misma cadena (60% de los casos) el más habitual. Además, existen otros menos probables, como la unión con una guanina y una adenina adyacentes (25 % de abundancia relativa), la coordinación con bases no consecutivas, o incluso formando enlaces intercatenarios (Figura 4) (Lenis, 2017).

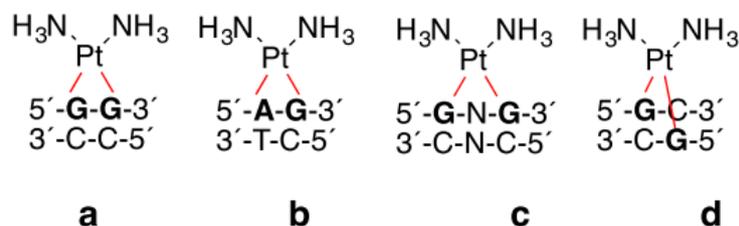


Figura 4 - Modos de unión del cisplatino con el ADN (Lenis, 2017).

Esta interacción provoca una deformación en la molécula de ADN, y con ella la paralización de los procedimientos normales de transcripción y/o replicación, parando el ciclo celular durante la fase G2 del ciclo celular (Sorenson, Barry and Eastman, 1990). Este hecho generalmente ocasiona la muerte de la célula (Fuertes *et al.*, 2012). Otros efectos del cisplatino incluyen la inducción de estrés oxidativo o la modulación de las señales mediadas por Ca^{2+} , entre otras (Shaloam and Tchounwou, 2014).

La citotoxicidad provocada por el cisplatino puede seguir distintos mecanismos capaces de iniciar la muerte celular. Los principales son aquellos asociados con proteínas HMGB (*High Mobility Group B*), los asociados a proteínas de otros tipos o los relacionados con el acortamiento de los telómeros (Fuertes *et al.*, 2012).

A pesar del buen funcionamiento como antitumoral que presenta el cisplatino en los primeros ciclos de tratamiento, el uso de este medicamento presenta importantes contraindicaciones. Los principales efectos adversos para su uso clínico son los fenómenos de resistencia que genera (Galluzzi *et al.*, 2012), o sus elevadas nefrotoxicidad (Arany and Safirstein, 1989) y neurotoxicidad (Mollman, 1990).

Estos hechos han impulsado la investigación y desarrollo de fármacos de nueva generación basados en Pt, como son el carboplatino o el oxaliplatino, o en otros metales o estructuras orgánicas (Gómez-Ruiz, 2010). Estos nuevos fármacos presentan menos efectos secundarios, sin embargo, aún están lejos del ideal deseado.

1.4. Relación entre la toxicidad derivada del cisplatino y las proteínas HMGB.

Uno de los principales hallazgos relacionados con la comprensión del mecanismo citotóxico del cisplatino fue el descubrimiento de la existencia de procesos de reconocimiento específicos entre la proteína SSRP1 (*Structure-Specific Recognition Protein 1*) y los conjugados ADN / cisplatino. Esta es una proteína presente en muchos mamíferos que contiene un motivo de unión al ADN del tipo HMGB (Mollman, 1990). Posteriormente, se descubrió que otras muchas proteínas que contienen este mismo motivo también presentan este tipo de afinidad por el ADN unido a cisplatino.

La principal función de estas proteínas es la de unirse al ADN y provocar cambios conformacionales que faciliten su interacción con otras moléculas, como factores de transcripción o proteínas reparadoras (Figura 5). Las proteínas HMGB también cumplen funciones extracelulares actuando como alarminas, nombre que recibe un grupo de proteínas endógenas que interviene en procesos de señalización de daño celular. Las

alarminas se encuadran a su vez dentro del grupo de los DAMP (*Damage Associated Molecular Patterns*). Estas proteínas son liberadas de forma pasiva durante la necrosis de la mayor parte de las células, o de forma activa por las del sistema inmunitario, como monocitos, macrófagos o células dendríticas.

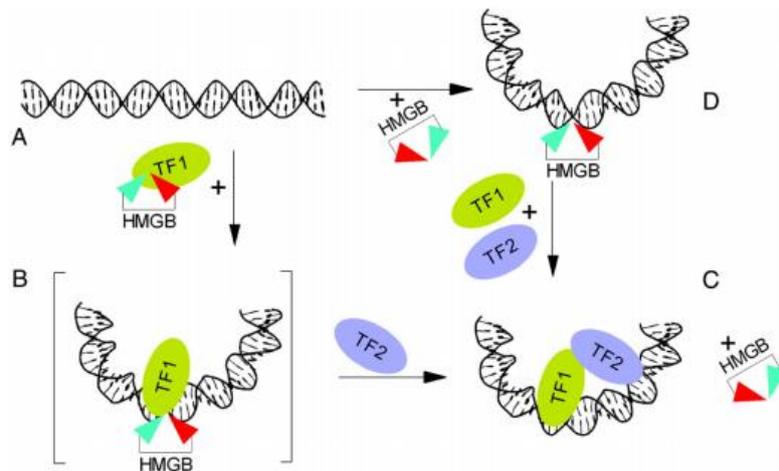


Figura 5 – Modelo representando la función normal de las proteínas HMGB. Estas provocan la torsión del ADN y facilitan la interacción de este con distintos factores de transcripción (Štros, 2010).

Cuando se encuentran en el interior del núcleo, las proteínas HMGB presentan, por norma general, un modo de interacción específico de estructura más que específico de secuencia, uniéndose preferentemente a ADN monocatenario o torsionado (Thomas, 2015). Es por esta razón, por la que las funciones normales de las mismas se ven afectadas por la acción del cisplatino. La torsión de la molécula de ADN provocada por su interacción con el fármaco deja expuesta una región del surco menor a donde muchas proteínas pueden unirse efectivamente. Esto incluye, entre otras, a aquellas con el dominio HMGB en su estructura (Wang and Lippard, 2005) (Figura 6).

Se han propuesto varios mecanismos que explican cómo la unión de estas proteínas al conjugado ADN / cisplatino puede aumentar la toxicidad provocada por el medicamento. Sin embargo, dos de ellos parecen ser los más factibles. Por un lado, se encuentra el “modelo de protección de la reparación”, que postula que la unión de proteínas HMGB al ADN evita que este sea reconocido por las enzimas encargadas de repararlo, actuando como proteína pro-apoptótica. Por otro lado, el “modelo de secuestro” establece que la elevada afinidad que presentan los aductos cisplatino / ADN por las proteínas HMGB las desvían de su funcionamiento normal, y no están disponibles para cumplir funciones de vital importancia para la célula, actuando entonces como proteínas pro-necróticas (Fuertes *et al.*, 2012).

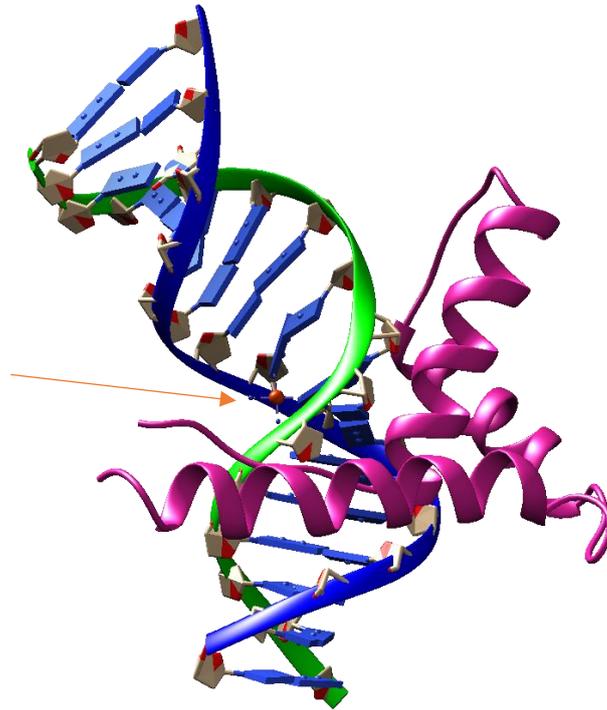


Figura 6 - Interacción de un dominio HMG-box (magenta) con el surco mayor de una doble hélice de ADN modificada por la interacción con el cisplatino (indicado por la flecha naranja).

Paradójicamente, existen evidencias de que las proteínas HMGB pueden ejercer una función pro-oncogénica cuando se encuentran en el espacio extracelular. Este efecto se debe a sus funciones como señalizador inflamatorio, actuando en algunos casos como intermediario de la carcinogénesis inducida por inflamación (Gnanasekar *et al.*, 2013).

Las dos principales proteínas humanas que incluyen un dominio HMGB son HMGB1 y HMGB2. Estas proteínas son ubicuas en los mamíferos, y presentan una estructura altamente conservada y una abundancia relativamente alta. Estructuralmente, ambas son muy similares, presentando dos dominios homólogos HMGB (A y B) de aproximadamente 80 residuos aminoácidos cada uno, que son los encargados de mediar la unión con el ADN. Este dominio presenta un plegamiento consistente en tres α -hélice conectadas mediante *random coil*. (Figura 7) (Thomas, 2015).

Concretamente en células de cáncer de próstata (PCa) se ha demostrado una importante sobreexpresión de los niveles de HMGB1, estando además esta expresión relacionada con la gravedad o el estadio en que se encuentra el cáncer. Se ha comprobado que su actividad pro oncogénica en estas células se debe a su capacidad para aumentar la actividad del receptor de andrógenos (AR). Este hecho tiene un

importante efecto en el desarrollo de tumores hormono refractarios o metastásicos (Gnanasekar *et al.*, 2013).

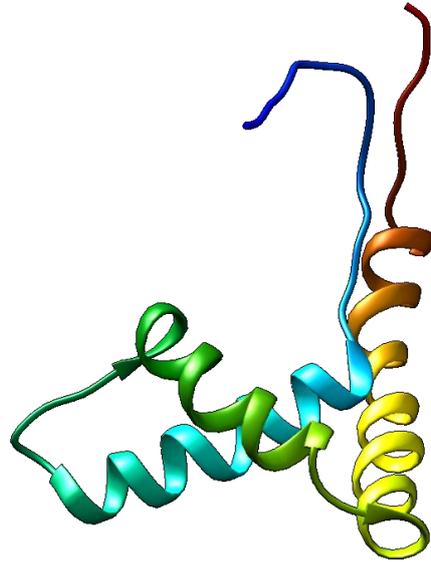


Figura 7 - Dominio HMG-A de la proteína HMGB1.

1.5. Papel de HMGB2 en el cáncer. Papel concreto en el cáncer de próstata.

HMGB2 ha demostrado ser una proteína importante en los procesos de carcinogénesis. Varios estudios han confirmado que la expresión de HMGB2 es mayor en las células tumorales que en las sanas, y que sus niveles dependen de la gravedad de la enfermedad (Suzuki *et al.*, 2018).

Por esta razón, su expresión se ha identificado como una importante herramienta para la detección y la prognosis de un gran número de cánceres, tales como el gástrico, el pancreático o el de próstata (Cai *et al.*, 2017; Suzuki *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2019). El hecho de que exista tal sobreexpresión puede tener relación con su ya reportada actividad como regulador de la división celular en varios tipos de tumores, y con su ya comentada capacidad para inhibir *in vivo* la reparación del ADN dañado mediante su interacción con el mismo (Suzuki *et al.*, 2018).

Para el caso concreto del cáncer de próstata, también se ha observado una mayor expresión de HMGB2 en las células cancerosas que en las sanas. Sin embargo, todavía

no se han realizado estudios sobre su actividad carcinogénica cuando hay hormonas (Suzuki *et al.*, 2018) o agentes quimioterapéuticos involucrados.

Estos hechos hacen interesante el estudio de la expresión de HMGB2 en células donde alguno de estos factores sea importante, con la intención de poder mejorar su uso como marcador para detectar el estadio o la gravedad del tumor, o para poder controlar los procesos que hacen que esta proteína pueda tener funciones pro-oncogénicas.

1.6. Objetivo.

Análisis de la variación de la expresión del gen HMGB2 mediante la qRT-PCR en la línea celular PC3, en presencia de distintas concentraciones de cisplatino.

2. Material y Métodos.

2.1. Cultivo celular.

Para poder conocer la variación en la expresión génica de HMGB2 en células de cáncer de próstata de la línea PC3, es necesario comenzar por hacer un cultivo de estas. Esta línea celular fue establecida en el año 1979, de un carcinoma de próstata metastásico de grado IV, en hueso, en un hombre caucásico de 62 años. Estas células proceden de un tumor que ya no responde al tratamiento antiandrogénico.

Las células se hacen crecer adheridas a la superficie de placas de 90cm de diámetro (p100). El medio de cultivo utilizado será RPMI 1640 (ThermoFisher) (*Roswell Park Memorial Institute*), modificado con 10% de FBS (ThermoFisher), y un 1% de mezcla de penicilina y estreptomicina (ThermoFisher).

Todos los procedimientos se llevan a cabo en una cámara de flujo laminar previamente tratada con radiación UV, y utilizando material estéril para mantener libre de contaminación el medio de crecimiento. Las células se mantienen en una cámara de atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C para asegurar un buen crecimiento.

Antes de iniciar el tratamiento, es necesario hacer pases de células para asegurar que tanto la confluencia como el número de placas son los deseados. El procedimiento seguido para esto consiste, en primer lugar en el levantamiento de las células adheridas a la placa. Para ello, se necesita retirar el medio de cultivo y lavar las células con 5 mL de DPBS (ThermoFisher), con la intención de eliminar los restos. Seguidamente, se elimina el DPBS.

A continuación, se añade 1mL de tripsina, la enzima que se encargará de despegar las células fijadas, y se incuba durante aproximadamente 3-4 minutos. Una vez levantadas las células (se comprueba mirando al microscopio. Las células fijadas tienen forma de huso y se encuentran inmóviles en el fondo de la placa. Por otro lado, las células levantadas se ven esféricas, y se desplazan al mover la placa) (Figura 8), se añade medio para inactivar la tripsina. Es necesario añadir como mínimo tres veces el volumen que había de tripsina para asegurarse que esta deja de ejercer su función. Como se realiza un pase 1:10 (Una placa para dar 10), se añadirán 9 mL de medio sobre el mL de tripsina. Esta mezcla se homogeniza bien, y se añade 1 mL de la misma a cada una de las diez nuevas placas, donde previamente se han añadido 7 mL de medio RPMI. Se mueven las placas para asegurar una distribución uniforme de las células.

Las placas se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante dos o tres días, hasta que la confluencia suponga un 60-70% del total.

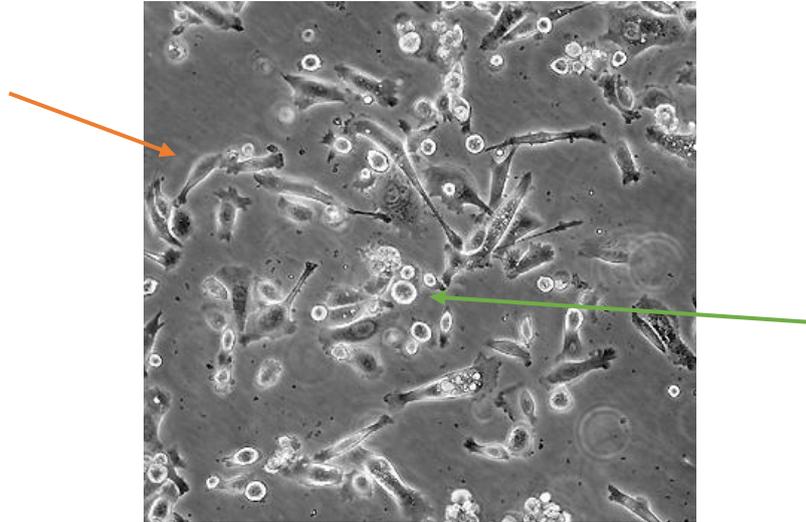


Figura 8 - imagen a microscopio de células PC3. Se diferencian células fijadas (husales, flecha naranja) y despegadas (esféricas, flecha verde).

2.2. Tratamiento con cisplatino.

El tratamiento se realiza sobre las placas obtenidas en el paso anterior. Para ello, una vez obtenida una confluencia cercana al 70%, se añade a cada una 8 mL de medio al que se ha añadido el volumen necesario de cisplatino para obtener la concentración buscada.

Se cultivarán nueve placas con tres concentraciones distintas de cisplatino, cada una de ellas por triplicado. La concentración final en cada placa será de 0 μ M, 5 μ M y 10 μ M. En todos los casos, se parte de un dilución de cisplatino (Sigma Aldrich; $\geq 99\%$) de concentración 7,5 mM.

Una vez preparadas estas disoluciones, se retira el medio de las placas, se lavan con 5 mL de DPBS y se añaden 8 mL del medio con cisplatino a cada una.

Las placas se incuban durante exactamente 24h, a 37°C con 5% de CO₂, para asegurar la reproducibilidad del experimento.

2.3. Recogida de células tratadas.

Para recoger las células para el posterior estudio de la expresión génica, se retira el medio de todas las placas, se lavan con 5 mL de DPBS y se tratan con 1 mL de tripsina.

Se incuban durante 3-4 minutos y se comprueba en el microscopio que las células han sido despegadas. Una vez confirmado esto, se inactiva la tripsina con la adición de 4 mL de medio por placa. Esta disolución se pasa a un tubo de 15 mL y se centrifuga a 1090 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, y las células se resuspenden en 1 mL de DPBS. La mezcla se pasa a eppendorf de 1,5 ml y se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, y el resultado se congela a -80°C para la correcta conservación de los ácidos nucleicos hasta el momento de su extracción y cuantificación.

2.4. Extracción de ARN.

Una vez obtenidas las células tratadas, se procede a la extracción de ARN. Para ello se utiliza el *kit* comercial *GeneJET™ RNA Purification Kit (Thermo Scientific™)*.

El primer paso del *kit* consiste en la lisis y homogenización de las muestras en tampón de lisis suplementado con β -mercaptoetanol al 2%. Este tampón se basa en una mezcla que contiene tiocianato de guanidina, una sal caotrópica que actúa desnaturalizando las proteínas y generando un ambiente hidrofóbico que reduce la afinidad de los ácidos nucleicos por el disolvente (Sawyer and Puckridge, 1973). Esto también protege al ARN de ser atacado por ARNsas endógenas (Chomczynski and Sacchi, 1987). La mezcla de la sal caotrópica con el etanol aumenta la afinidad de los ácidos nucleicos por las superficies hidrófobas (Salimans and Sol, 1990), por lo que la muestra se hace pasar mediante centrifugación a través de una columna de purificación que contiene una membrana de sílica gel. De esta manera, las moléculas de interés se quedan unidas a la membrana, mientras que el resto de componentes del lisado pasan a través de ella.

A continuación, las impurezas son eliminadas a través de la membrana utilizando dos tampones de lavado distintos. Estos tampones se hacen fluir a través de la membrana mediante centrifugación. Se realiza un lavado con el tampón de lavado 1, y dos con el tampón de lavado 2 que proporciona el *kit*.

Una vez eliminadas las impurezas, los ácidos nucleicos se eluyen utilizando 70 μL de agua libre de nucleasas. Para ello, se realizan dos centrifugados, uno utilizando 50 μL y otro con 20 μL . De esta forma se asegura que la mayor parte del ARN se encuentra ahora en el agua.

2.5. Cuantificación de ARN.

Se realiza la cuantificación en un espectrofotómetro *BioSpectrometer Eppendorf* mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm (longitud de onda de máxima absorción de los ácidos nucleicos). Adicionalmente, se mide la absorbancia a 280 nm para obtener la relación A260/A280. Un valor de esta relación cercano a dos indica la existencia de un medio suficientemente libre de proteínas. Se utiliza una cubeta de cuarzo *Eppendorf µCuvette® G1.0*, en la que se añaden 2 µL de muestra.

2.6. Tratamiento con DNAsa I.

El siguiente paso consiste en la eliminación del ADN del extracto de ácidos nucleicos y la obtención de una disolución de ARN puro. Para ello, una vez conocida la concentración de las muestras, se añaden en un eppendorf tampón 1x, 2 unidades de DNAsa I y el volumen necesario de muestra para que cada eppendorf contenga 2 µg de la misma. Se añade agua hasta completar un volumen final de 50 µL. Las disoluciones se incuban 30 minutos a 37 °C.

2.7. Purificación y concentración de ARN.

Para la purificación de las muestras, se utiliza el *kit* comercial *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific™)*. Este *kit* sigue un principio y un procedimiento casi idénticos a los utilizados en el apartado anterior, diferenciándose únicamente en que en este caso el primer paso consiste en la adición de un tampón de unión, en lugar de uno de lisis. La función de este tampón es la de inactivar la DNAsa I que hay en el medio.

Tras los pasos de inactivación de DNAsa I y lavado, el ARN es eluído con 10 µL de agua libre de nucleasas.

2.8. Cuantificación mediante qRT-PCR.

El fundamento de la técnica consiste en una amplificación por PCR donde previamente se ha realizado un proceso de retrotranscripción.

Para ello, es necesario que en el medio haya la enzima retrotranscriptasa y un oligo reverso. Este cebador, unido a la acción de una retrotranscriptasa y a la presencia en el medio de dNTPs suficientes, provoca la retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc).

Una vez producida la retrotranscripción, comienzan una serie de ciclos de amplificación mediante PCR convencional, consistentes en desnaturalización, unión del cebador y elongación. Para esta fase es necesaria la presencia en el medio de los oligos universal y reverso del gen, dNTPs y la polimerasa (Figura 9) (Roca, Oliver and Rodríguez, 2003).

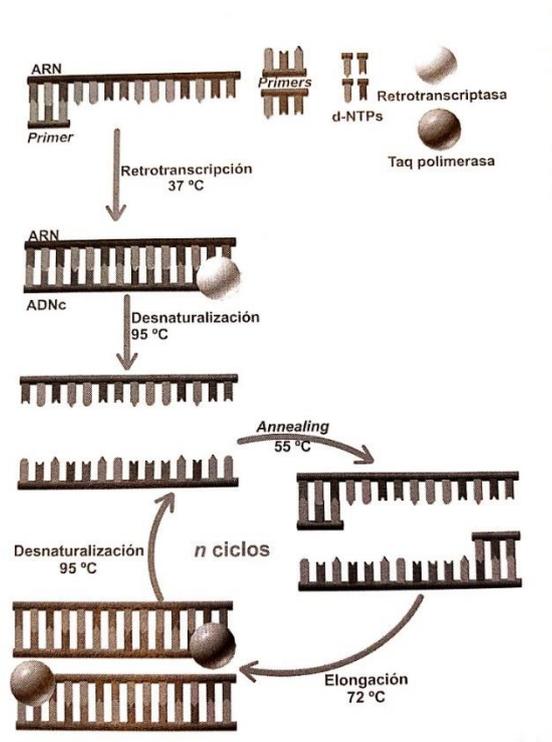


Figura 9 - Esquema mostrando el procedimiento de una qrt-PCR. Las temperaturas representadas son orientativas.(Roca, Oliver and Rodríguez, 2003)

Los oligos fueron diseñados con ayuda del programa *Netprimer*. Estos oligos han de presentar una serie de características para poder considerarse como adecuados. La T_m (*melting temperature*) de cada par de oligos ha de ser similar, con una diferencia máxima entre sí de 0,5°C, y de no más de 2°C entre los cuatro. Además, deben contener un porcentaje de guanina/citosina de al menos un 42%. Por último, es necesario que los amplicones generados sean de tamaños similares.

La cuantificación de la qRT-PCR se lleva a cabo mediante la medida de la intensidad de la fluorescencia emitida por un fluoróforo. La mayoría de moléculas fluorescentes aumentan su intensidad de emisión cuando están unidas al ADN mediante intercalación (Sirajuddin, Ali and Badshah, 2013). Este hecho provocará un aumento en los valores registrados a medida que crece la cantidad de ADN en el medio, dado que el fluoróforo no puede intercalar en el ARN por ser monocatenario.

Las muestras se preparan en placas de PCR de 48 pocillos. Para la preparación de los pocillos se utiliza un *kit* comercial *One-step NZYSpeedy RT-PCR Green kit*. En cada uno de ellos, se añaden una concentración final de 400 nM de cebador directo (oligo universal) para el gen de interés, 400 nM de cebador reverso (oligo reverso) 0,4 μ L de mezcla *NZYRT*, que contiene tanto transcriptasa inversa como inhibidor de ribonucleasa y mezcla *NZYSpeedy qPCR Green master mix 1X*, que contiene dNTPs, estabilizadores, potenciadores, la enzima polimerasa y un fluoróforo verde que se une al ADN mediante intercalación. Se completa hasta 9 μ L con 2,8 μ L de agua (Tabla 1).

Tabla 1 - Cantidades de cada solución añadidas a la mezcla de qRT-PCR por cada pocillo de 9 μ L.

Oligo universal	Oligo reverso	NZYRT	NZYSpeedy qPCR	Agua
400nM	400nM	0,4 μ L	1X	2,8 μ L

Una vez preparados los 9 μ L de mezcla de qRT-PCR en cada pocillo, se realizan dos controles para comprobar que las muestras se encuentran libres de contaminantes que afecten a su medida. Para ello, se prepara un pocillo donde no se añade muestra para confirmar la ausencia de contaminación por DNA de los reactivos del *kit*, y un pocillo de cada muestra para cada gen en los que no se añade mezcla *NZYRT* para confirmar que no hay ADN amplificable presente en las muestras de ARN.

Para la cuantificación, se pipetea 1 μ L de disolución de ARN en cada pocillo, además de los 9 μ L de muestra previamente preparados. Cada réplica biológica se añade a la placa por triplicado, de tal forma que se tengan tres réplicas técnicas de cada una.

Se realiza la amplificación y cuantificación del gen de interés (*HMGB2*) y de un gen control, o *housekeeping* (*GADPH*), cuya expresión se sabe que no varía en las condiciones del estudio. El equipo utilizado es un termociclador *Illumina® Eco™*.

Los resultados numéricos aportados por el instrumento se encuentran en Cq (Ciclos cuantificados), que se corresponden con el número de ciclos necesario para que la intensidad de emisión alcance el valor del límite de detección, (Ct), a partir del cual se puede distinguir la señal de fluorescencia debida al proceso de amplificación de la aportada por el ruido de fondo. Este valor depende del equipo utilizado, por lo que es útil para comparar entre sí los datos obtenidos, pero no aporta un dato absoluto acerca

del número de amplicones generados. Por esta razón se habla de PCR con cuantificación relativa.

2.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se lleva a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Este método incluye dos normalizaciones internas, una con respecto a un gen control (*GAPDH*) y otra con respecto a un control negativo de tratamiento, y permite comprobar si la variación en la expresión génica es significativa con respecto a un cultivo donde no se ha aplicado tratamiento.

En primer lugar, se calcula una media aritmética de los tres valores de Cq correspondientes a las réplicas técnicas de cada réplica biológica, tanto para el gen objeto de estudio (HMGB2) como para el gen control (*GAPDH*). De este modo se obtiene un valor medio para cada experimento independiente (réplica biológica). Por lo tanto, se trabaja con un total de 9 medias para cada gen, tres para cada concentración de tratamiento.

A continuación, a las medias calculadas para el gen de estudio se les restan las obtenidas para el gen control. Es importante que las medias restadas pertenezcan a la misma réplica biológica. De este modo se obtiene el resultado de la primera normalización, ΔCq .

La segunda normalización se consigue sustrayendo a cada dato de ΔCq el valor obtenido para el control negativo (placas tratadas con 0 μM de cisplatino). Este cálculo devuelve los valores de $\Delta\Delta Cq$.

Estos últimos datos se utilizan según la expresión $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para obtener los valores que se utilizarán para el análisis de la variación de la expresión génica.

Para comprobar la robustez de estos valores, se calcula una media aritmética y una desviación típica para los datos relativos a cada concentración. La posibilidad de la existencia de diferencias significativas entre las medias de cada concentración con respecto al obtenido para el control negativo se comprueba mediante un test T de Student de dos colas a un 95% de confianza.

3. Resultados y discusión.

3.1. Tratamiento con cisplatino.

Las células de cáncer de próstata PC3 fueron cultivadas y tratadas con concentraciones de cisplatino 0, 5 y 10 μM durante 24h.

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran distintos datos sobre la preparación de las placas.

Tabla 2 – Se muestran los volúmenes añadidos a cada placa, así como la concentración final de cisplatino y la nomenclatura con que se pasará a nombrar cada placa.

Placa	Volumen de cisPt 7,5 mmol (μL)	Volumen de medio RPMI 1640 (mL)	Concentración de cisPt (μM)	Nomenclatura
1	0	8	0	0a
2	0	8	0	0b
3	0	8	0	0c
4	14	7,986	5	5a
5	14	7,986	5	5b
6	14	7,986	5	5c
7	28	7,972	10	10a
8	28	7,972	10	10b
9	28	7,972	10	10c

Las células fueron recogidas tras 24h de tratamiento.

3.2. Extracción y purificación.

El ARN fue extraído y cuantificado siguiendo el procedimiento explicado anteriormente. Las absorbancias fueron medidas a 260 nm por ser el pico de máxima absorción de los ácidos nucleicos (Figura 10). Las concentraciones son calculadas directamente por el equipo. Además, se calculó la relación A260/A280. Los resultados de la extracción se muestran a continuación (Tabla 3).

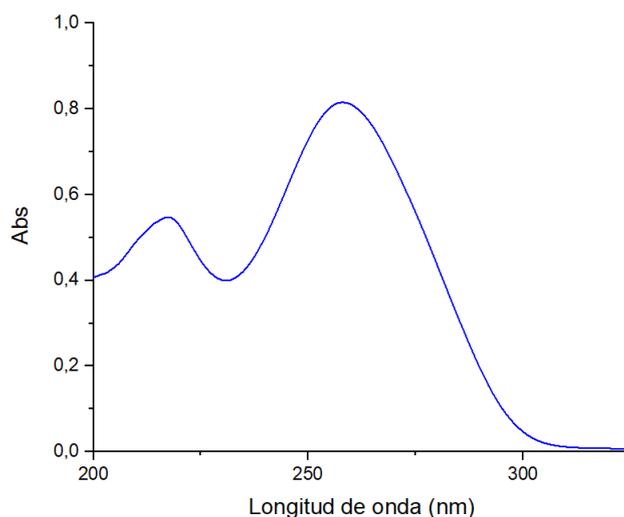


Figura 10 - Perfil de absorción de los ácidos nucleicos, mostrando el máximo de 260nm.

Tabla 3 - Concentración de ácidos nucleicos y relación A260/A280 tras la extracción.

Placa	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μL)	Relación A260/A280
0a	837,6	2,05
0b	613,8	2,21
0c	728,6	2,14
5a	750,2	2,11
5b	515,9	2,23
5c	719,9	2,23
10a	590,5	2,14
10b	325,0	2,36
10c	594,3	2,24

Se observa un descenso aparente en el rendimiento de purificación a medida que aumenta la cantidad de cisplatino en el medio. Lo más probable es que se deba a una disminución de la cantidad de células por placa, por causa del efecto del tratamiento.

Las relaciones de absorbancia a 260 nm y 280 nm cercanas a 2 indican una pureza adecuada de los ácidos nucleicos, con baja concentración de proteínas contaminantes.

3.3. Tratamiento con DNAsa I y cuantificación.

Se prepararon disoluciones de 50 μL con 2 μg de ácidos nucleicos. Estos se trataron con DNAsa I y se repitió el mismo procedimiento de medida. Los resultados se muestran a continuación (Tabla 4). Se espera que tras el tratamiento con DNAsa I, el total de los ácidos nucleicos en el medio sea ARN. Esto se comprobará posteriormente.

Tabla 4 - Concentración de ARN y relación A260/A280 tras el tratamiento con DNAsa I.

Placa	Concentración de ácidos nucleicos (ng/ μL)	Relación A260/A280
0a	12,2	1,93
0b	7,5	1,96
0c	15,6	1,89
5a	18,5	1,99
5b	9,1	1,94
5c	10,3	2,01
10a	9,8	1,92
10b	8,5	2,04
10c	10,6	2,06

Se observa un descenso considerable en la concentración de ácidos nucleicos de las muestras. Esto se debe tanto a la dilución realizada como a la eliminación del ADN del medio. No se advierte la existencia de ninguna tendencia en la variación de la concentración de ARN con respecto al tratamiento. Este hecho es motivado por la dilución, que provoca que en todos los casos se parta de la misma cantidad de ácidos nucleicos y hace que la diferencia en la cantidad de células por placa deje de ser un factor que provoque variación.

3.4. Cuantificación de ARN mediante qRT-PCR.

El gen del cual se quiere estudiar la variación en su transcripción a medida que aumenta el tratamiento con cisplatino es el gen *HMGB2*. Para ello, es necesario cuantificar también un gen control, o *housekeeping*. El seleccionado para esta función será *GADPH*, dado que se sabe que su expresión no se ve afectada por el tratamiento con cisplatino.

Para ello, se sigue el procedimiento y se utilizan los *kit* comerciales descritos en la sección de Material y Métodos. Antes del inicio de la cuantificación mediante qRT-PCR, se prepararon 50 μ L de disolución de ARN de concentración 1 ng/ μ L de cada muestra. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para cada gen se muestran en la tabla siguiente (Tabla 5).

Tabla 5 - Datos de los cebadores utilizados en la qRT-PCR.

		Secuencia 5'-3'	T _m (°C)	Longitud amplificación (pb)
HMGB2	Directo	GAGCAGTCAGCCAAAGATAAACAA	56,4	101
	Reverso	TCCTGCTTCACTTTTGGCCCTT	57,0	101
GADPH	Directo	CCTCCTGCACCACCAACT	57,2	102
	Reverso	TGGCAGTGATGGCATGGA	57	102

El estudio por qRT-PCR se realizó en placas de 48 pocillos. Se utilizaron tres placas, una para cada gen y otra en donde se incluyeron los controles. En las placas donde se amplificaron genes, las tres réplicas biológicas de cada concentración fueron pipeteadas por triplicado, habiendo por tanto tres réplicas técnicas de cada muestra. Esto son un total de veintisiete pocillos ocupados por placa.

La placa de controles consiste en un pocillo para cada muestra y gen donde no fue añadida mezcla NZYRT para comprobar que no existe contaminación con ADN (dando un total de dieciocho pocillos), y un pocillo consistente en la mezcla del *kit* sin adición de muestra, para comprobar la pureza del mismo (Tabla 7). El diseño de las placas se muestra en las siguientes tablas (Tablas 6-7).

Tabla 6 - Diseño placa control. Se marca cada placa por su nomenclatura y se indica al lado que gen fue comprobado, H2 (HMGB2) o G (GADPH) La k indica la medida de pureza del Kit.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	0aH2	0aG	0bH2	0bG	0cH2	0cG	5aH2	5aG
B	5bH2	5bG	5cH2	5cG	10aH2	10aG	10bH2	10bG
C	10cH2	10cG	k					
D								
E								
F								

Tabla 7 - Tabla mostrando el diseño de las placas utilizadas para la amplificación de genes.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	0a	0a	0a	0b	0b	0b	0c	0c
B	0c	5a	5a	5a	5b	5b	5b	5c
C	5c	5c	10a	10a	10a	10b	10b	10b
D	10c	10c	10c	k				
E								
F								

El programa de temperaturas utilizado para la amplificación es el recomendado por el fabricante. Este se detalla en la tabla (Tabla 8).

Tabla 8 - Tabla mostrando el programa de temperaturas aplicado.

Nº de ciclos	Tiempo	Temperatura	Proceso
1	20 min	50	Retrotranscripción
1	5 min	95	Activación de la polimerasa
40	5 s	95	Desnaturalización
	50 s	60	Anillamiento/Extensión

Los resultados obtenidos para los 3 experimentos se muestran en las tablas 9-11. También se muestra una gráfica de amplificación de uno de los experimentos (en este caso, el del gen *HMGB2*) (Figura 11).

Tabla 9 - Resultados en *Cq* de la qRT-PCR para la placa en donde no se ha añadido retrotranscriptasa. Se marca en verde el pocillo donde no se ha añadido muestra.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	N/A							
B	N/A							
C	N/A	N/A	N/A					

Todos los pocillos de esta placa muestran como resultado N/A (no amplificado). Esto indica que en las reacciones sin retrotranscriptasa no ha habido amplificación de los

genes de interés, demostrando que no hay contaminación. El resultado de N/A en el pocillo sin muestra indica que tampoco existe contaminación por ADN en la mezcla comercial utilizada.

Tabla 10 - Resultados en Cq de la qRT-PCR para la medida de HMGB2.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	23.57	21.17	23.13	21.41	21.30	21.29	20.92	20.95
B	21.02	21.28	21.18	21.13	22.10	21.87	22.03	20.69
C	20.97	21.14	21.50	21.45	21.38	20.94	21.02	21.13
D	20.97	21.00	20.78					

Tabla 11 - Resultados en Cq de la qRT-PCR para la medida de GADPH.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A	19.24	18.49	20.03	16.59	17.49	18.54	17.61	17.68
B	18.41	18.00	18.12	18.35	18.94	20.11	20.31	17.37
C	18.06	18.69	18.55	18.32	19.09	17.81	18.48	18.77
D	17.91	18.13	18.29					

Se observa que el valor medio de Cq para *HMGB2* está en 21,39, mientras que el valor medio de *GADPH* está en 18,43. Esto indica que la cantidad de ADNc inicial de *GADPH* era mayor que la de *HMGB2*, al ser necesario un menor número de ciclos para alcanzar el límite de detección (Ct).

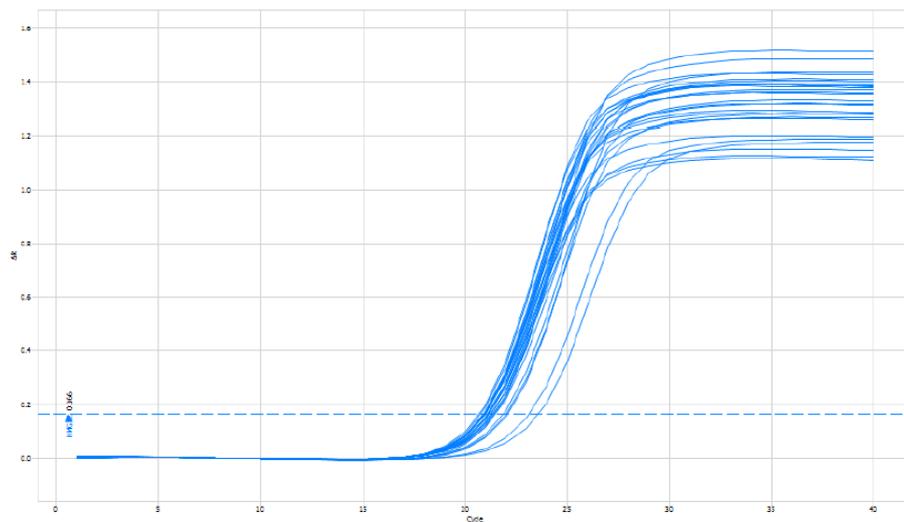


Figura 11 - Curva de amplificación de *HMGB2*, mostrando el valor de Ct como una línea discontinua.

En la curva de amplificación se muestra la evolución de los datos de emisión recogidos por el equipo frente al número de ciclos. La línea discontinua señala el valor de Ct, y su intersección con las curvas de amplificación, el de Cq. Se observa que en la mayoría de casos, este valor ronda los veinte ciclos.

3.5. Análisis estadístico.

Para los resultados crudos, obtenidos directamente de la qRT-PCR, se ha realizado una medida de la dispersión de los datos mediante el cálculo de la desviación estándar. Esta ha resultado ser de 0,67 (3,11% del valor de la media) para *HMGB2* y 0,84 (4,56% del valor de la media) para *GADPH*, confirmando la homogeneidad aparente de los resultados.

Los resultados de la cuantificación han sido tratados mediante un análisis por el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ seguido de un test t de Student al 95% de confianza, tal y como se describe en la sección de Material y Métodos.

Los valores medios de los datos se han representado gráficamente, incluyendo barras de error, tras cada normalización. Los datos sin normalizar no se representan, ya que se considera que no aportan información de interés.

La primera normalización (ΔCq) proviene de la diferencia entre los valores medios de Cq de las réplicas técnicas de cada réplica biológica del gen de interés (*HMGB2*) y los del gen control (*GADPH*). Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 12). Las medias de ΔCq para cada concentración de tratamiento se representan frente a los valores en μM de cisplatino utilizado (Figura 12).

Tabla 12 – Valores de ΔCq obtenidos. En las filas se indica la concentración de tratamiento, y en las columnas la réplica biológica.

	a	b	C
0	3,37	3,79	3,07
5	3,04	2,21	2,89
10	2,79	2,68	2,81

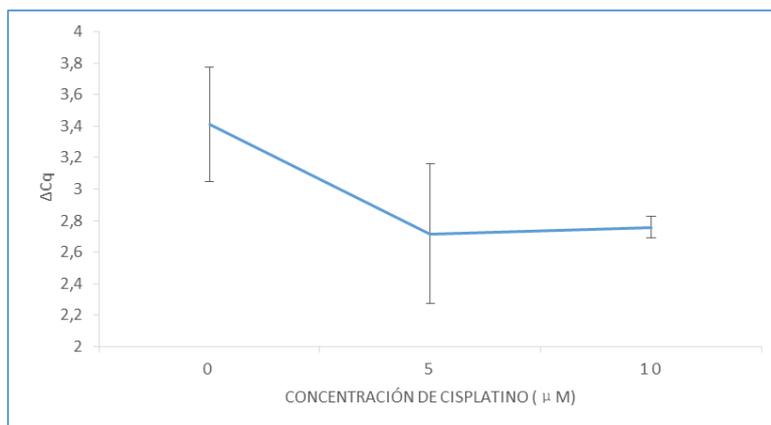


Figura 12 – Representación gráfica de las medias de ΔCq para cada concentración.

Los valores (Tabla 13) y la representación (Figura 13) tras la segunda normalización ($\Delta\Delta Cq$, que viene de la diferencia de cada valor de ΔCq menos el correspondiente valor de la placa sin tratamiento) se muestran a continuación.

Tabla 13 – Valores de $\Delta\Delta Cq$ obtenidos. En las filas se indica la concentración de tratamiento, y en las columnas la réplica biológica.

	a	b	c
0	0	0	0
5	-0,75	-1,16	-0,17
10	-0,58	-0,39	-0,26

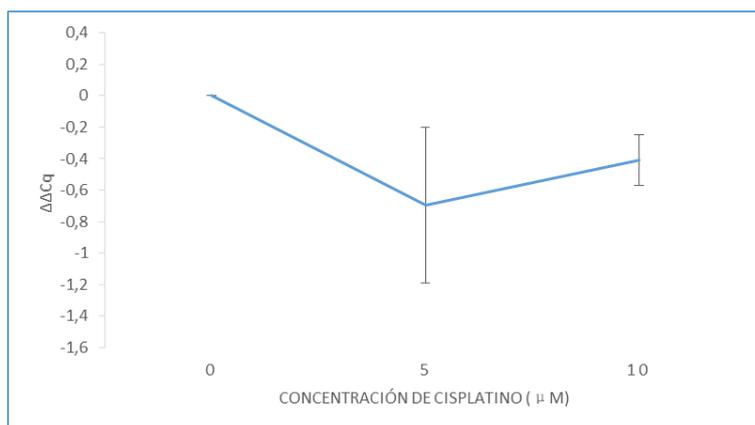


Figura 13 - Representación gráfica de las medias de $\Delta\Delta Cq$ para cada concentración.

Por último, los datos obtenidos para $2^{-\Delta\Delta Cq}$ se muestran a continuación (Tabla 14). La representación de estos datos se ha realizado en un gráfico de barras. Se ha marcado con dos asteriscos el dato que ha resultado significativo tras la aplicación del test t de Student, y se han incluido las medias de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para cada concentración (Figura 14).

Tabla 14 - Valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ obtenidos. En las filas se indica la concentración de tratamiento, y en las columnas la réplica biológica.

	a	b	c
0	1	1	1
5	1,68	2,23	1,13
10	1,49	1,31	1,20

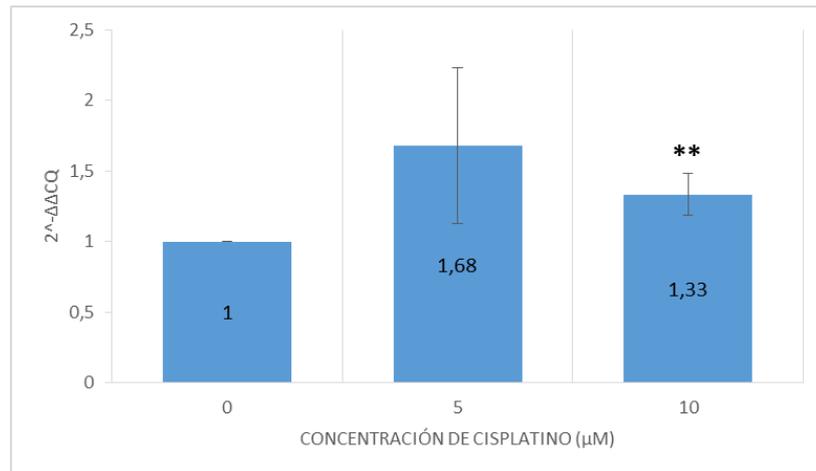


Figura 14 - Representación gráfica de las medias de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para cada concentración. Se señala con asteriscos el dato que resulta significativo tras el test T de Student.

Los datos obtenidos tras la aplicación de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ son también conocidos como *fold change*, o variación de expresión génica. Por definición del método, esta variación siempre será igual a uno para el control donde no se ha aplicado tratamiento, siendo éste el que representa ambas normalizaciones aplicadas (Livak and Schmittgen, 2001). Los otros valores representan la variación de la expresión del gen de interés (*HMGB2*, en este caso) con respecto al valor normalizado, uno.

Antes de aplicar el test estadístico, la mayor variación aparente en la expresión génica se encuentra en las células tratadas con una concentración 5 μM de cisplatino, pero tras aplicar el test estadístico no resulta significativa. Probablemente, esto se deba al error experimental en la preparación de las muestras para la realización de las medidas.

Por otro lado, la variación en la expresión de *HMGB2* para el tratamiento con 10 μM de cisplatino sí resulta significativa, indicando un aumento de la expresión de dicho gen cuando las células PC3 son tratadas con esa concentración de cisplatino.

4. Conclusiones.

Las medidas realizadas y los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de los datos indican que se produce un aumento significativo en la expresión del gen *HMGB2* con el tratamiento 10 μM de cisplatino en las células tumorales de próstata PC3 en cultivo, en las condiciones especificadas en este estudio. Sin embargo, dado el alto nivel de desviación de los datos, es necesario re-verificar este resultado, introduciendo un mayor número de réplicas biológicas.

Conclusión.

As medidas realizadas e os resultados obtidos tras o análise estatístico dos datos indican que se produce un aumento significativo na expresión do xen *HMGB2* co tratamento 10 μM de cisplatino nas células tumorais de próstata PC3 en cultivo, nas condicións especificadas neste estudio. Sen embargo, dado o alto nivel de desviación dos datos, é necesario re-verificar este resultado, introducindo un maior número de réplicas biolóxicas.

Conclusions.

Measurements and obtained results after statistical analysis of the data indicate that there is a significant increase in the expression of *HMGB2* gene with a 10 μM cisplatin treatment of the PC3 prostate tumor cells in culture, under the specified conditions in this study. However, given the high level of deviation of the data, it is necessary to re-verify this result, introducing a greater number of biological replicas.

5. Bibliografía.

American Society of Clinical Oncology (ASCO) (2005) *Prostate Cancer: Statistics*. Available at: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/statistics> (Consultado en: 9 July 2019).

Arany, I. and Safirstein, R. L. (1989) 'Cisplatin nephrotoxicity', *Toxicology Letters*, 46 (1–3), pp. 163–175.

Cai, X. *et al.* (2017) 'Expression of HMGB2 indicates worse survival of patients and is required for the maintenance of Warburg effect in pancreatic cancer', *Biochimica et Biophysica Acta*, 49 (2), pp. 119–127.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) 'Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Analytical Biochemistry*, 162 (1), pp. 156–159.

Cui, G. *et al.* (2019) 'HMGB2 promotes the malignancy of human gastric cancer and indicates poor survival outcome', *Human Pathology*, 84 , pp. 133–141.

Fuertes, M. *et al.* (2012) 'Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways', *Current Medicinal Chemistry*, 10 (3), pp. 257–266.

Galluzzi, L. *et al.* (2012) 'Molecular mechanisms of cisplatin resistance', *Oncogene*, 31 (15), pp. 1869–1883.

Gnanasekar, M. *et al.* (2013) 'HMGB1: A Promising Therapeutic Target for Prostate Cancer', *Prostate Cancer*, pp. 1–8.

Gómez-Ruiz, S. (2010) 'Investigación Química Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial como agentes antitumorales', *Anales Real Sociedad Española de Química.*, 106 (1), pp. 13–21.

Gregory, C. W. *et al.* (2001) 'A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy.', *Cancer research*, 61 (11), pp. 4315–9.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100 , pp. 57–70.

Lenis, O. A. (2017) *Diseño y estudio de compuestos de rutenio con actividad biológica*. Tesis doctoral. Universidade da Coruña. Acceso RUC <http://hdl.handle.net/2183/20142>.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method', *Methods*, 25 (4), pp. 402–408.

Mollman, J. E. (1990) 'Cisplatin neurotoxicity', *The New England Journal of Medicine*, 322 (16), pp. 1098–1105.

Roca, P., Oliver, J. and Rodríguez, A. M. (2003) *Bioquímica. Técnicas y métodos*. Madrid: Editorial Hélice. ISBN: 84-921124-8-4.

Rosenber, B., Van Camp, L. and Krigas, T. (1965) 'Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode', *Nature*, 206 , pp. 757–761.

Salimans, M. and Sol, C. J. A. (1990) 'Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids', *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), pp. 495–503.

Sawyer, W. H. and Puckridge, J. (1973) 'The dissociation of proteins by chaotropic salts', *Journal of Biological Chemistry*, 248 (24), pp. 8429–8433.

Shaloam, D. and Tchounwou, P. B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*, 740 (1), pp. 364–378.

Sirajuddin, M., Ali, S. and Badshah, A. (2013) 'DNA interactions and their study by UV – Visible , fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry', *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 124 , pp. 1–19.

Sociedad española de oncología médica (SEOM) (2018) 'Las cifras del cáncer en España 2018', p. 5. Disponible en: https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf.

Sorenson, C. M., Barry, M. A. and Eastman, A. (1990) 'Analysis of events associated with cell cycle arrest at g2 phase and cell death induced by cisplatin', *Journal of the National Cancer Institute*, 82 (9), pp. 749–755.

Štros, M. (2010) 'HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799 (1–2), pp. 101–113.

Suzuki, S. *et al.* (2018) 'Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2', *The Journal of Toxicological Sciences*, 43 (6), pp. 359–367.

Thomas, J. O. (2015) 'HMG1 and 2: "architectural" DNA-binding proteins', *Biochemical Society Transactions*, 29 (3), p. A49.1-A49.

UK Cancer research (2018) *Worldwide cancer mortality statistics*. Disponible en: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/mortality#heading-Zero> (Consultado en: 29 May 2019).

Wang, D. and Lippard, S. J. (2005) 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (4), pp. 307–320.

Yagoda, A. and Petrylak, D. (1993) 'Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer', *Cancer*, 71 (3), pp. 1098–1109.

Zaitso, M. *et al.* (2011) 'Surgical castration in hormone-refractory metastatic prostate cancer patients can be an alternative for medical castration', *Advances in Urology*, 2012