



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS
ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
BIOMARCADORES TUMORALES GENÓMICOS Y
PROTEICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE
MASAS CON FUENTE DE PLASMA DE
ACOPLAMIENTO INDUCTIVO.**

**Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y
Estructural y Modelización Computacional**

Alejandro Fernández Asensio

TESIS DOCTORAL

Oviedo, 2021

Agradecimientos

Tras más de 5 años, pero aún sorprendido de que ya haya llegado este momento, me encuentro ante este folio en blanco para expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han acompañado, de una u otra forma, durante este camino. Las palabras no son mi punto fuerte, pero espero ser capaz de expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas que han servido de apoyo para alcanzar la meta.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de Tesis, las doctoras Elisa Blanco González y Luisa María Sierra Zapico, por su dedicación, enseñanzas, apoyo y consejos. Gracias a María por ayudarme, tanto a dar mis primeros pasos como a conseguir la beca Severo Ochoa sin la que no estaría hoy escribiendo estas líneas. Gracias a Elisa por acogerme, guiarme en el campo de la Química Analítica, y aguantar los múltiples y diversos problemas que fueron apareciendo durante esta etapa. Quiero agradecer también a la doctora María Montes Bayón, para mí una directora de tesis más, tanto por ser la partícipe principal de que iniciase este camino como por ser un faro constante en el desarrollo experimental. Gracias por tu trabajo, tus consejos y por servirme de guía. Quiero agradecer también al doctor Jörg Bettmer por sus consejos, su colaboración, y por aportar siempre su punto de vista al trabajo experimental. Quiero agradecer también al Profesor Alfredo Sanz-Medel por darme la oportunidad de formar parte de su Grupo de Investigación y permitirme dar mis primeros pasos.

No puede haber trabajo de laboratorio sin compañeros de laboratorio. Quiero agradecerles a todos ellos su paciencia, sus consejos, su buen humor, sus enseñanzas, su colaboración y, en definitiva, servir de piolet en la escalada de esa montaña que es la Tesis. A los que estaban antes de mí: Tamara, Marta, Mario, Xavi, Nerea, Jenifer, Mona, Dani, Rober, Silvia, gracias por vuestros consejos, enseñanzas, paciencia y por facilitarme siempre las cosas. A los que vinisteis después y aún os queda camino: Enol, Alonso, Lucía, Paula, Sara, muchas gracias también por todo, especialmente por hacer del laboratorio un sitio agradable en el que estar. Ánimo en el camino que os queda por recorrer que, aunque sea duro, merece la pena. Muchas gracias a toda la gente del resto de

laboratorios, tanto del Departamento de Química Física y Analítica como del departamento de Biología Funcional, así como de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, por su colaboración y trabajo. Se que no soy una persona muy abierta y que no expreso mucho en el día a día, espero que estas palabras puedan expresar al menos mínimamente mi agradecimiento por todo.

También quiero agradecer a mi gente más cercana qué, aunque estén fuera, son los que más sufren las vicisitudes varias. A toda mi familia, especialmente a mi madre, mi padre, mi hermano y mis abuelos. A mis amigos más cercanos, los de toda la vida y los wargameros, en especial a Berto y a Piru por estar siempre ahí.

Y por supuesto quiero agradecer a Alexandra todo su apoyo, su comprensión, sus ánimos, su cariño, por estar para lo bueno y para lo malo y por sufrir el final de esta Tesis conmigo.

“El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría”.

Isaac Asimov

Resumen

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de las células de un tejido, que se multiplican sin control y se diseminan por todo el organismo, impidiendo su correcto funcionamiento. Este proceso se debe a la acumulación de cambios, genéticos y/o epigenéticos, que rompen el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La mayoría de estos cambios provocan la aparición en el organismo de características detectables indicadoras del proceso tumoral, conocidas como biomarcadores, que juegan un papel muy importante para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer. Sin embargo, su uso en clínica está supeditado a la disponibilidad de metodologías adecuadas para su determinación en muestras biológicas con exactitud y precisión. Por ello, el objetivo de la presente Tesis Doctoral fue la puesta a punto de nuevas estrategias analíticas basadas en el empleo de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para la cuantificación en muestras biológicas de tres tipos de biomarcadores tumorales, las variaciones en el número de copias, CNVs, y los cambios en la expresión de ciertos genes; así como los niveles de la proteína HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*).

En el primer capítulo, se desarrolló una metodología para la determinación de CNVs y de variaciones en la expresión génica de varios genes de forma simultánea, basada en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con detección por electroforesis en gel (GE)-ICP-MS (monitorizando el fósforo). La metodología se aplicó a la cuantificación de CNVs y de expresión génica de genes relacionados con procesos tumorales en células de cáncer de ovario. Los resultados obtenidos con la metodología desarrollada son comparables a los obtenidos para cada uno de los genes en estudio de forma individual mediante la técnica de PCR cuantitativa, pero con la ventaja de que permiten estudiar varios genes de forma simultánea sin la necesidad de marcaje.

En el segundo capítulo, se desarrolló una metodología para la determinación de HER2 en fluidos biológicos, que combina la especificidad de los inmunoensayos con la

capacidad de amplificación de la PCR y la detección selectiva de fósforo mediante ICP-MS. La metodología desarrollada presenta una sensibilidad superior al de un ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) espectrofotométrico, y se puede aplicar para la determinación de HER2 en el sobrenadante del cultivo de células tumorales y en suero humano a concentraciones clínicamente relevantes (muy por debajo del nivel fisiológico de $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) con buena exactitud y precisión.

En el tercer capítulo, se desarrolló una estrategia de análisis que permite estudiar los niveles de HER2, a nivel de célula individual, mediante el empleo de un anticuerpo específico contra HER2, marcado con un complejo del reactivo MAXPAR con el isótopo ^{175}Lu , y el posterior análisis de las células individuales mediante *single-cell*-ICP-MS monitorizando el $^{175}\text{Lu}^+$. La metodología desarrollada se aplicó al análisis de líneas celulares de cáncer de mama con distinto nivel de HER2. Además, se estudió su selectividad para estudiar, dentro de la misma población de células, dos proteínas diferentes presentes en la superficie celular (HER2 y el receptor de la transferrina 1) utilizando anticuerpos específicos para dichas proteínas marcados con distintos isótopos metálicos. Finalmente, se demostró la aplicabilidad de la metodología propuesta para distinguir células que expresan niveles elevados de HER2 de aquellas que tienen niveles constitutivos, dentro de una mezcla de ambos tipos de células. En comparación con un ensayo ELISA espectrofotométrico, la estrategia analítica propuesta proporciona información a nivel de célula individual de los niveles de HER2 presentes sólo en la superficie celular, que es la información clínicamente relevante.

Summary

Cancer is a disease characterized by the abnormal growth of cells, that multiplied themselves uncontrollably and spread for the whole organism preventing its correct functioning. This process is due to the accumulation of genetic and epigenetic changes, that break the equilibrium between proliferation and cell death. The most of these changes provoke the appearance of detectable characteristics of the tumoral process, known as biomarkers, that play a crucial role in diagnostic, prognosis and follow-up of the disease. However, their clinical use is dependent on the availability of adequate methodologies for their determination with precision and accuracy. Because of that, the aim of this thesis was the development of new analytical methodologies based on ICP-MS for the quantification on biological samples of tumoral biomarkers such as copy number variations (CNVs) and expression changes, as well as the concentration of the HER2 protein (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2).

In the first chapter, we developed a methodology for the determination of CNVs and expression changes for several genes simultaneously. It is based on the amplification through PCR and detection through GE (gel electrophoresis)-ICP-MS (monitoring phosphorous). The methodology was applied to the quantification of CNVs and expression changes of genes related with tumoral progress in ovarian cancer cells. The obtained results with the developed methodology were comparable with the results obtained for each gene individually in a qPCR assay, but with the advantage of studying them simultaneously and without any labelling needed.

In the second chapter, we developed a methodology for the determination of the HER2 in biological fluids, combining the specificity of the immunoassays with the amplification capability of the PCR and the selective phosphorous detection of ICP-MS. The developed methodology has a better sensitivity than spectrophotometric ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and was applied to HER2 determination in tumoral cells cell culture supernatant and human serum, at concentrations clinically

relevant (much lower than physiological concentration of $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), with good precision and accuracy.

In the third chapter, we developed an analytical methodology to study HER2 concentration, at single cell level, using an anti-HER2 antibody labelled with a MAXPAR- ^{175}Lu complex. Cells were analyzed individually through single cell-ICP-MS monitoring $^{175}\text{Lu}^+$. The developed methodology was applied to the analysis of different breast cancer cell lines with different HER2 concentration. Furthermore, the selectivity of the methodology was analyzed using two different antibodies, labelled with two different metal isotopes, to label two different membrane proteins (HER2 and Transferrin Receptor 1). Finally, we showed the applicability of the methodology to distinguish between cells with higher HER2 levels from those with constitutive levels, in a mixture with both cell types. In comparison with an ELISA, the developed methodology gave information about the HER2 levels in the membrane of each cell individually, which is the clinically relevant information.

Índice

A.- Introducción	1
A.1.- El cáncer: definición y generalidades.....	3
A.2.- Biomarcadores en cáncer.....	8
A.2.1.- Definición y utilidad clínica.....	8
A.2.2.- Tipos de biomarcadores tumorales según su naturaleza biológica.....	11
A.3.- Variación en el número de copias de un gen como biomarcador genómico en cáncer	14
A.3.1.- Conceptos generales.....	14
A.3.2.- Metodologías analíticas utilizadas para la determinación de variaciones en el número de copias de un gen.....	18
A.3.2.1.-Metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa.....	22
A.4.- La proteína HER2 como biomarcador proteico en cáncer de mama.....	33
A.4.1.- Conceptos generales.....	33
A.4.2.- Metodologías analíticas utilizadas para la determinación de la proteína HER2.....	38
A.4.2.1.- Inmuno-PCR.....	44
A.5.- Análisis de células individuales mediante ICP-MS.....	47
A.5.1.- Conceptos generales.....	47
A.5.2.- Aplicaciones: determinación de proteínas.....	54
B.- Objetivos	61
C.- Experimental	67
C.1.- Instrumentación.....	69
C.1.1.-Equipos de ICP-MS.....	69
C.1.2.-Equipos de HPLC.....	73
C.1.3.- Sistema de GE-ICP-MS.....	73
C.1.4.- Instrumentación complementaria.....	76
C.2.- Reactivos y disoluciones.....	79
C.3.- Líneas celulares.....	83
C.4.- Procedimientos experimentales.....	84
C.4.1.- Extracción de ADN de células procedentes de cultivos celulares.....	84
C.4.2.- Extracción de ARN de células procedentes de cultivos celulares y síntesis de ADN complementario.....	85
C.4.3.-Purificación del producto de PCR.....	87

C.4.4.- Electroforesis en gel.....	87
C.4.5.- Protocolo de ELISA para la determinación de HER2.....	88
D.- Resultados y discusión.....	89
D.1.- PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS: nueva estrategia analítica para la determinación de cambios en el número de copias y en la expresión génica de varios genes de forma simultánea.....	91
D.1.1. Introducción.....	91
D.1.2.- Diseño de cebadores para la amplificación simultánea de varios genes mediante PCR múltiple.....	93
D.1.3.- Optimización de la amplificación simultánea de varios genes mediante PCR múltiple.....	96
D.1.4.- Preparación de los geles de agarosa para la separación de los productos de la PCR múltiple.....	99
D.1.5.- Montaje de la celda de electroforesis y establecimiento de las condiciones de medida del ICP-MS.....	100
D.1.6.- Optimización de la separación de fragmentos de ADN mediante GE-ICP-MS.....	102
D.1.7.- Determinación de cambios en el número de copias de varios genes de forma simultánea.....	107
D.1.7.1.- Evaluación de las características analíticas de la metodología desarrollada.....	107
D.1.7.2.- Aplicación de la metodología desarrollada.....	111
D.1.8.- Determinación de cambios en la expresión génica de varios genes de forma simultánea.....	116
D.2.- Desarrollo de una metodología de inmuno-PCR con detección mediante ICP-MS para la determinación altamente sensible de HER2 en fluidos biológicos.....	122
D.2.1.- Introducción.....	122
D.2.2.- Optimización de la síntesis y la amplificación del fragmento de ADN marcador biotinilado.....	124
D.2.3.- Optimización del protocolo del inmunoensayo para la determinación de HER2.....	129
D.2.4.- Cuantificación de los productos de inmuno-PCR mediante ICP-MS.....	132
D.2.5.- Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de fluidos biológicos.....	136
D.2.6.- Comparación de la metodología de inmuno-PCR-ICP-MS con un inmunoensayo ELISA comercial.	137
D.3.- Puesta a punto de una estrategia analítica basada en el empleo de anticuerpos marcados con metales y detección por single cell-ICP-MS para el estudio de los niveles de HER2 en células individuales de cáncer de mama.....	141
D.3.1.- Introducción.....	141

D.3.2.- Marcaje del anticuerpo con lutecio y caracterización del anticuerpo marcado.....	143
D.3.3.- Establecimiento de las condiciones de trabajo para las medidas mediante single cell-ICP-MS.....	147
D.3.4.- Optimización de proceso de reconocimiento de HER2 en líneas celulares de cáncer de mama.....	150
D.3.5.- Evaluación de las características analíticas de la metodología desarrollada.....	158
D.3.6.- Aplicación de la metodología desarrollada al reconocimiento de HER2 en mezclas de células con diferentes niveles de la proteína.....	161
E.- Conclusiones.....	169
F.- Sugerencias para trabajos futuros.....	175
G.- Bibliografía.....	179
H.- Publicaciones derivadas.....	205

Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema de las principales características adquiridas por las células tumorales. Imagen modificada de [6].	5
Figura 2.- Incidencia estimada de tumores en la población mundial para el periodo 2018-2040. Foto tomada de [21].	7
Figura 3.- Tipos de biomarcadores según sus aplicaciones en clínica.....	10
Figura 4.- Clasificación de los biomarcadores tumorales según su naturaleza biológica.....	12
Figura 5.- Representación esquemática de las variaciones en el número de copias más comunes, delección, duplicación y amplificación. Se representa la variación producida en el locus “D” con respecto a un genoma de referencia (formado por los loci “A”, “B”, “C”, “D” y “E”). En la delección se puede ver que se produce la pérdida de dicho fragmento “D” en un cromosoma. En la duplicación se puede ver que se produce ganancia de una copia extra del fragmento “D” en dicho cromosoma. En la amplificación se produce ganancia de múltiples copias del fragmento “D” en un cromosoma.....	16
Figura 6.- Representación esquemática de la técnica de hibridación genómica comparada con microarrays de ADN (aCGH). Una mezcla con cantidades idénticas de un ADN tumoral (muestra) y un ADN de referencia (control) se hace hibridar con un conjunto de sondas, microarray de ADN. La hibridación diferencial genera diferencias de fluorescencia que permiten determinar CNVs en el ADN tumoral.....	20
Figura 7. - Representación esquemática de la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH). Las sondas fluorescentes hibridan con secuencias complementarias del ADN genómico presente en la muestra de células o de tejido. Tras lavar para eliminar las sondas no hibridadas se obtienen señales de fluorescencia medibles que permiten determinar CNVs.....	22
Figura 8.- Esquema del proceso de PCR. Se pueden ver parte de distintos reactivos necesarios y las tres etapas de las que consta cada ciclo de reacción.	24
Figura 9.- Evolución del producto de reacción a lo largo de los ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa.....	26
Figura 10.- Gráfica de amplificación de una reacción de PCR a tiempo real, en la que se muestra la evolución de la fluorescencia producida a lo largo de los distintos ciclos de la reacción, mostrando las tres fases de la que consta.....	28
Figura 11.- Esquema de una PCR digital. Se muestran tanto la división de la muestra en gotas como la reacción de PCR en cada una de las gotas, generando fluorescencia (resultado positivo) sólo en aquellas gotas en las que hay alguna molécula de ADN.	30

Figura 12.- Esquema de la técnica de MLPA. Parte de la secuencia de las sondas es complementaria a la secuencia diana (azul), otra parte es complementaria a la secuencia de los cebadores que se utilizarán en la amplificación por PCR (roja), y tienen además una región de tamaño variable (stuffer) distinta para cada pareja de sondas (verde).....	32
Figura 13.- Estructura de la proteína HER2. Imagen obtenida del Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology [168].....	34
Figura 14.- Representación esquemática de las rutas de señalización generadas por la unión del ligando y la formación del dímero EGFR-HER2. Se muestra el proceso de dimerización y activación del receptor HER2, así como las dos principales rutas de señalización, MAPK y PI3K, encargadas de transmitir señales al núcleo para modular la transcripción de genes involucrados en procesos de crecimiento, apoptosis, migración, adhesión y diferenciación celular.	35
Figura 15.- Esquema de la proteína HER2, donde se muestra el sitio de acción de las proteasas que producen la rotura proteolítica que da lugar a los fragmentos ECD y p95. Imagen modificada de [173].....	36
Figura 16.- Esquema de la proteína HER2 y sitio de unión de los principales fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento de tumores HER2+.....	37
Figura 17. Esquema de la estructura de una inmunoglobulina. Los dominios variables se representan con V, mientras que los dominios constantes se representan con C.....	40
Figura 18.- Representación esquemática de la técnica de IHC. Permite visualizar la presencia de HER2 en la membrana celular, utilizando un microscopio, tras un proceso de “tinción” de la proteína con un anticuerpo secundario marcado con HRP. La sección de tejido fue obtenida de Leica Biosystems [204].....	41
Figura 19.- Inmunohistoquímica de diferentes muestras tumorales de HER2, en la que se puede apreciar tinción diferencial según el nivel de HER2 en las membranas celulares (desde 0 a 3+). Imagen modificada de Marchiò et al. [207].....	42
Figura 20.- Representación esquemática de la técnica de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para la determinación del dominio extracelular de HER2.....	43
Figura 21. Esquema general de ensayos de ELISA e IPCR tipo sándwich. En el ELISA, una enzima unida al anticuerpo de detección convierte un sustrato en un producto detectable espectrofotométricamente. En la IPCR, se utiliza una sonda de ADN unida al anticuerpo de detección que se amplifica por PCR para la generación de señal.....	45
Figura 22.- Diferentes estrategias de unión entre el anticuerpo de detección y el fragmento de ADN marcador: (A) El primer formato establecido, en el que una proteína quimérica de fusión entre proteína A y estreptavidina hace de puente para la unión entre el anticuerpo y el ADN marcador biotilado; (B) sistema universal de IPCR, en el que la estreptavidina hace de puente para la unión entre el anticuerpo	

biotinilado y el ADN marcador biotinilado; (C) unión covalente entre el anticuerpo y el ADN marcador utilizando agentes de entrecruzamiento.....46

Figura 23.- Esquema del resultado de un análisis global frente al de un análisis de células individualizadas en un tejido tumoral. La información que proporciona el análisis global es una concentración celular promedio, mientras que el análisis de células individualizadas permite distinguir la concentración en las distintas poblaciones celulares presentes dentro del tumor.....49

Figura 24.- Representación esquemática de la intensidad de la señal obtenida frente al tiempo para: A) el análisis mediante ICP-MS de una disolución homogénea del analito; y B) el análisis mediante SC-ICP-MS de células individualizadas de una suspensión celular.....51

Figura 25. Diagrama del sistema HECIS para la introducción de células con alta eficiencia. Figura adaptada de Groombridge et al [271].....53

Figura 26.- Estructura de un compuesto quelante bifuncional utilizado para el marcaje elemental de anticuerpos. Está formado por el compuesto macrocíclico DOTA (I), que forma complejos de inclusión con iones metálicos trivalentes (M^{3+}) de lantánidos y grupo maleimida (III) para la unión a los grupos tiol del anticuerpo, ambos conectados por un espaciador (II).....56

Figura 27.- Compuestos quelantes bifuncionales y su unión a los anticuerpos. Dos tipos de quelantes bifuncionales: DOTA monomérico (A) y DTPA polimérico (B). Anticuerpo conjugado con el quelante DOTA monomérico (C) y anticuerpo conjugado con el quelante DTPA polimérico (C). Fotografía modificada de Han et al. [295]57

Figura 28.- Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al. [303].....59

Figura 29.- Esquema de un equipo de ICP-MS Thermo Element II. Modificada de Jakubowski et al. [306].....70

Figura 30.- Esquema de la medida de ^{31}P mediante ICP-MS con un analizador de masas de triple cuadrupolo, utilizando oxígeno como gas de reacción.....72

Figura 31.- Sistema de electroforesis en gel (GE) MiniPrep de Bio-Rad, con detalle de la cámara de elución. Foto modificada de Bio-Rad.....74

Figura 32.- Zona de elución del sistema GE-MiniPrep de Bio-rad.....75

Figura 33.- Electroferograma obtenido mediante GE-ICP-MS para la separación de los fragmentos de una escalera comercial de ADN de 50 pb. Identificación de los picos: 1, Patrón interno de fosfato; 2, 50 pb; 3, 100 pb; 4, 150 pb; 5, 200 pb; 6, 250 pb; 7, 300 pb; 8, 350 pb; 9, 400 pb; 10, 450 pb; 11, 500 pb. En la parte derecha se muestra la fotografía de la separación mediante electroforesis convencional aportada por la casa comercial.....104

Figura 34.- Relación entre los tiempos de migración corregidos (diferencia entre el tiempo de migración del analito y el tiempo de migración del PI) y el número de pares de bases de los fragmentos de la escalera comercial de ADN de 50 pb. Se muestra la ecuación de la recta obtenida y su coeficiente de correlación.....	105
Figura 35.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS para la separación de los amplicones generados tras un proceso de PCR múltiple. Los diferentes picos se corresponden con: PI, patrón interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1. Se muestra también la imagen obtenida en el análisis mediante electroforesis convencional en gel de agarosa.....	105
Figura 36.- Variación de la relación de áreas de pico (área del amplicón/área del PI) con la cantidad de ADN inicial (2-50 ng) para los cuatro amplicones de la PCR múltiple. Se muestran las ecuaciones de las rectas obtenidas y su coeficiente de correlación.....	108
Figura 37.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS para la separación de los amplicones generados tras un proceso de PCR múltiple (protocolo de ciclos de dos etapas). Los diferentes picos se corresponden con: PI, patrón interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1. Se muestra también la imagen obtenida en el análisis mediante electroforesis convencional en gel de agarosa.....	109
Figura 38.- Rectas de calibrado obtenidas mediante GE-ICP-MS para los 4 amplicones de la PCR múltiple (protocolo de dos pasos) utilizando distintas cantidades de ADN genómico molde (0,5-40 ng). Las áreas de pico se corrigieron para tener en cuenta el efecto del diferente tamaño de los amplicones. Se muestran las ecuaciones de las rectas y sus coeficientes de correlación.....	110
Figura 39.- Electroferogramas obtenidos por GE-ICP-MS de los productos de reacciones de PCR múltiple utilizando 5 ng de ADN genómico de células: (A) A2780 y (B) OVCAR-3. Los diferentes picos se corresponden con: PI, estándar interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1.....	112
Figura 40.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS del producto de una reacción de RT-PCR múltiple utilizando 18,8 ng de ARN de células A2780. Los diferentes picos se corresponden con: PI, estándar interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, BAX; 3, CTR1; 4, ERCC1. Se muestra también la imagen de esta muestra obtenida en la electroforesis convencional de un gel de agarosa con detección con bromuro de etidio.....	117
Figura 41.- Expresión diferencial, fold-change, de los genes BAX, CTR1 y ERCC1 con respecto al gen ACTB, en la línea celular A2780cis en comparación con la línea celular A2780 obtenidos mediante RT-PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS. El asterisco indica que los resultados obtenidos son estadísticamente diferentes de 1.....	118
Figura 42.- Expresión diferencial, fold-change, de los genes BAX, CTR1 y ERCC1 en la línea celular A2780cis en comparación con la línea celular A2780 obtenidos mediante RT-qPCR. El asterisco indica que los resultados obtenidos son estadísticamente diferentes de 1. Se utilizó el gen ACTB como control de expresión.....	120

Figura 43.- Plásmido pUC19, donde se muestra en color azul el fragmento de ADN amplificado que se utiliza como ADN marcador y en color verde la parte de este fragmento de ADN que se amplificará en el ensayo de inmuno-PCR. B. Parte de la secuencia de plásmido pUC19, donde se muestran la secuencia del ADN marcador (rojo, azul y verde), la de los cebadores utilizados para su amplificación (rojo) y la de la parte de dicho ADN marcador que se amplificará en el ensayo de inmuno-PCR (verde y azul).....	125
Figura 44.- Electroferograma del producto de PCR obtenido (derecha de la imagen) y del marcador de tamaño (izquierda de la imagen). Se muestra el producto de dos reacciones independientes para comprobar que el producto obtenido es siempre el mismo.....	126
Figura 45.- Electroferograma del producto de PCR obtenido en la amplificación del fragmento de 91 pb utilizando el ADN marcador como molde (derecha de la imagen) y del marcador de tamaño, escalera de ADN (izquierda de la imagen).....	128
Figura 46.- Esquema del procedimiento experimental del ensayo de inmuno-PCR secuencial tipo sándwich llevado a cabo. El producto final es un fragmento de ADN de cadena doble de 91 pb.....	129
Figura 47.- Electroforesis en gel de los productos de las PCR correspondientes a diferentes concentraciones iniciales de HER2 (entre 8,19 y 2000 pg·mL ⁻¹) y realizadas con distintas alícuotas de la disolución del ADN marcador procedente del inmunoensayo de: A) 4 µL B) 7µL y C) 10 µL.....	131
Figura 48.- Curva de calibrado obtenida representando la concentración de P en el amplicón frente al logaritmo de la concentración de HER2. La curva es el promedio de cuatro experimentos independientes realizados en cuatro días diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar entre días de las medidas (n = 4). Se muestra también la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación.....	134
Figura 49.- Comparación de los resultados obtenidos mediante IPCR-ICP-MS y ELISA para la determinación de HER2 en muestras de suero (azul) y de sobrenadante de cultivos celulares (gris) fortificadas con tres niveles de concentración de HER2 (15, 100 y 600 pg·mL ⁻¹). El eje vertical izquierdo corresponde a la concentración de HER2 encontrada para las adiciones teóricas de 15 y 100 pg·mL ⁻¹ , y el vertical derecho para la de 600 pg·mL ⁻¹ . Se representan las medias de 3 experimentos independientes, junto con sus respectivas desviaciones estándar (barras de error). * Significativamente mayor que el resultado de IPCR-ICP-MS (p < 0,05 en un test t de Student).....	139
Figura 50.- Esquema de la reacción de marcaje del anticuerpo con el reactivo MAXPAR formando complejos con iones de un lantánido (Ln ³⁺). A: formación del complejo de Ln ³⁺ con los grupos DTPA (bola rosa) del MAXPAR; B: reducción parcial del anticuerpo con el reactivo tris(2-carboxietil)-fosfina (TCPE); C: reacción maleimida-tiol entre el complejo con el lantánido y el anticuerpo parcialmente reducido. Esquema extraído de las instrucciones del MAXPAR® Antibody Labeling Kit.....	144

Figura 51.- Cromatograma obtenido mediante SEC-ICP-MS monitorizando $^{175}\text{Lu}^+$, para el anticuerpo conjugado con el complejo MAXPAR- ^{175}Lu	146
Figura 52.- Representación esquemática del sistema de introducción de muestra de alta eficiencia High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System de Glass Expansion.....	149
Figura 53.- Diagrama de la dispersión lateral frente a la dispersión frontal obtenido por citometría de flujo de una suspensión de células BT-474. La línea azul delimita la ventana donde las células se consideran viables y se tienen en cuenta en el conteo.....	152
Figura 54.- Eventos celulares registrados para la medida de $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ y ^{175}Lu mediante SC-ICP-TQ-MS, después de tratar las células con el anticuerpo anti-HER2 marcado con ^{175}Lu . A) y C) línea celular MDA-MB-231; B) y C) línea celular SKBR-3.....	153
Figura 55.- Curva de calibración obtenida para lutecio elemental y ecuación empleada para determinar la masa de ^{175}Lu presente en cada célula.....	154
Figura 56.- Diagramas de cajas y bigotes de la masa de Lu por célula (fg/célula) obtenido por SC-ICP-MS utilizando distintas concentraciones de anticuerpo marcado con ^{175}Lu (entre 2 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) para el reconocimiento de HER2 en las líneas celulares: MDA-MB-231 (A), BT-474 (B) y SKBR-3 (C).....	156
Figura 57.- Resultados obtenidos de la cantidad de HER2 por célula, en las tres líneas celulares analizadas. A) masa de ^{175}Lu /célula obtenida mediante SC-ICP-MS. B) moléculas de HER2/célula (media \pm desviación estándar, $n=3$) obtenida mediante ELISA en el lisado celular.....	158
Figura 58.- Diagrama de cajas y bigotes de las señales de $^{175}\text{Lu}^+$ y $^{142}\text{Nd}^+$ correspondientes al reconocimiento simultáneo de HER2 y Tfr1, respectivamente, en las líneas celulares MDA-MB-231 y SKBR-3.....	160
Figura 59.- Eventos celulares obtenidos en la medida del $^{175}\text{Lu}^+$ por SC-ICP-MS para mezclas de células que contienen: 0% (A), 20% (B), 50% (C) y 100% (D) de células BT-474 en células MDA-MB-231.....	162
Figura 60.- Diagramas de cajas y bigotes de la masa de ^{175}Lu por célula obtenida mediante SC-ICP-MS para el análisis de mezclas de células MDA-MB-231 y BT-474 con un contenido de: 0, 20, 50, 80 y 100 % de BT-474 en MDA-MB-231.....	163
Figura 61.- Recta de regresión obtenida al representar la mediana de fg Lu/célula frente al porcentaje de células BT-474 en células MDA-MB-231. Se presentan también los valores del primer (triángulos azules) y tercer (líneas azules) cuartil para cada mezcla celular.....	165
Figura 62.- Número de moléculas de HER2 por célula (media \pm SD, $n=3$) encontradas en lisados celulares mediante ELISA para el análisis de mezclas de células con un contenido de: 0, 20, 50, 80 y 100 % de células BT-474 en células MDA-MB-231.....	166

Índice de Tablas

Tabla 1.- <i>Receptores de la familia EGFR y sus ligandos [163]</i>	33
Tabla 2 - <i>Parejas de cebadores seleccionados para la amplificación mediante PCR múltiple de los diferentes genes de interés, para la determinación tanto de CNVs como de variaciones en la expresión génica. Se muestra la secuencia de los cebadores y el tamaño esperado del producto de PCR amplificado</i>	95
Tabla 3- <i>Condiciones de trabajo seleccionadas para la amplificación por PCR múltiple de fragmentos de los genes ACTB, CCNE1, GSTM1 y HER2 utilizando como molde ADN genómico de células en cultivo</i>	97
Tabla 4.- <i>Condiciones de trabajo seleccionadas para la amplificación por RT-PCR múltiple de fragmentos de los genes ACTB, BAX, ERCC1 y CTR1 utilizando como molde ADN complementario de células en cultivo</i>	98
Tabla 5.-. <i>Parámetros instrumentales utilizados para la medida de fósforo mediante ICP-MS de doble enfoque</i>	102
Tabla 6.- <i>Condiciones de trabajo de la técnica de GE-ICP-MS.</i>	106
Tabla 7.- <i>Condiciones de la PCR para la amplificación de un fragmento de 91 pb utilizando como molde el ADN marcador biotinilado.</i>	127
Tabla 8.- <i>Parámetros instrumentales utilizados para la medida de fósforo mediante ICP-MS de triple cuadrupolo.</i>	133
Tabla 9.- <i>Recuperaciones obtenidas en el análisis de muestras de sobrenadante de cultivos celulares y suero humano fortificadas con distintas cantidades de HER2.</i>	137
Tabla 10.- <i>Características analíticas comparadas de las metodologías de IPCR-ICP-MS vs ELISA convencional para la determinación de HER2 en suero y en el sobrenadante de cultivos celulares</i>	138
Tabla 11.- <i>Parámetros instrumentales utilizados para las medidas mediante SC-ICP-MS</i>	148
Tabla 12.- <i>Datos extraídos de los diagramas de cajas y bigotes representados en la figura 60, para las diferentes mezclas de las células BT-474 y MDA-MB-231</i>	164

Lista de acrónimos y abreviaturas

aCGH	array-based Comparative Genomic Hybridization (hibridación genómica comparada)
ACTB/ACTB	Gen/ proteína beta actina
ADN	Ácido 2-desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASCO	American Society of Clinical Oncology (Sociedad americana de Oncología Clínica)
ATCC	American Type Culture Collection (colección americana de cultivos celulares)
BAX/ BAX	Gen/ proteína X asociada a BCL2
CAP	College of American Pathologists (colegio patólogos estadounidenses)
CCNE1/ CCNE1	Gen/ proteína ciclina E1
Ct	Cycle Threshold (ciclo umbral)
CTC	Célula tumoral circulante
CTR1/ CTR1	Gen/ proteína transportadora de cobre 1
CNV	Copy Number Variation (variaciones en el número de copias)
DF	Double focusing mass analyzer (Analizador de masas de doble enfoque)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
dPCR	digital Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa digital)
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
ECD	Extracellular Domain (dominio extracelular)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)
EMA	European Medicines Agency (Agencia europea del medicamento)

ERCC1/ ERCC1	Gen/ proteína del grupo 1 de complementación cruzada de la reparación por escisión, subunidad endonucleasa no catalítica
FDA	Food and Drug Administration (Agencia de medicamentos y alimentos)
FIA	Flow injection analysis (análisis mediante inyección en flujo)
FISH	Fluorescence In situ Hybridation
GSTM1/ GSTM1	Gen proteína glutatión S-Transferasa Mu1
HECIS	High efficiency cell introduction system (sistema de introducción de células de alta eficiencia)
HER2/ HER2	Gen/ proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico humano de tipo 2
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HRP	Horseradish Peroxidase (peroxidasa de rábano)
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo)
Ig	Immunoglobulin (inmunoglobulina)
IHC	Immunohistochemistry (inmunohistoquímica)
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas)
NGS	Next Generation Sequencing (secuenciación de nueva generación)
PBS	Phosphate Buffered Saline (disolución tampón de fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PI	Patrón interno
Q(TQ)	Quadrupole mass analyzer (triple quadrupole mass analyzer) (Analizador de masas de cuadrupolo (triple cuadrupolo))
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
SC-ICP-MS	Single cell ICP-MS (análisis de células individuales mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo)

sECD	soluble Extracellular Domain (Dominio extracelular soluble)
SEM	Secondary electron multiplier (Multiplicador de electrones secundarios)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucléotido único)
TBS	Tris buffered saline (disolución tampón de Tris-HCl)
TfR1	Transferrin Receptor 1 (Receptor de la transferrina 1)
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitors (inhibidores de la actividad tirosina quinasa)
TOF	Time-of-flight (tiempo de vuelo)

A.- Introducción

A.1.- El cáncer: definición y generalidades

Según la *American Cancer Society*, el cáncer (o tumor maligno) es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la formación de células anormales, que se dividen y crecen de forma descontrolada hasta sobrepasar a las células normales en cualquier tejido de nuestro organismo, dificultando con ello su correcto funcionamiento [1]. De forma similar, el *National Cancer Institute* lo define como el conjunto de enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control, y que tienen la capacidad de invadir los tejidos adyacentes y de migrar desde su lugar de origen para proliferar en otras partes del organismo, proceso conocido como metástasis [2]. Por lo tanto, cuando se habla de cáncer no se hace referencia a una única enfermedad, sino a un grupo muy numeroso de enfermedades que, aunque pueden tener características epidemiológicas y clínicas diferentes, se originan todas por un crecimiento anormal de las células de un tejido, que proliferan de forma excesiva e irreversible y, a través del sistema linfático y del torrente circulatorio, se diseminan sin control por todo el organismo impidiendo su correcto funcionamiento.

En la actualidad se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer, que se clasifican según el tejido donde se originan [3]. Así, los carcinomas tienen su origen en el tejido epitelial, los sarcomas en los tejidos mesenquimatosos, las leucemias, linfomas y mielomas en el tejido hematopoyético, y los neuroblastomas y gliomas en el tejido del sistema nervioso central [1]. Además, los diferentes tipos de cáncer también se denominan según el órgano donde se forman: cáncer de pulmón, de ovario, de colon, de estómago, de testículos, de mama, de páncreas, etc. [1].

El cáncer es un conjunto de enfermedades causadas fundamentalmente por cambios genéticos y/o epigenéticos que permiten que las células se liberen de los mecanismos que controlan el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular [4]. Todas las células del organismo se desarrollan, crecen, se diferencian y mueren, de acuerdo con una secuencia de procesos específicos para cada tejido que están estrictamente controlados mediante genes, que contienen las instrucciones para la síntesis de las proteínas necesarias en cada momento para regular el funcionamiento celular. Cuando la actividad normal de estos genes se altera por una sucesión de

A.- Introducción

cambios genéticos y/o epigenéticos, que se producen y acumulan a lo largo del tiempo, las células normales de un tejido se van transformando de manera progresiva en células tumorales (carcinogénesis) [4]. Estas células dejan de funcionar correctamente y adquieren unas características intrínsecas, que no existen en las células normales, y que son el origen del desarrollo tumoral, como son [5,6] (Figura 1):

- Autosuficiencia de señales de crecimiento (prolifera bajo la acción de estímulos propios).
- Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento (no responden a los estímulos que inhiben la proliferación celular).
- Evasión de la apoptosis, o muerte celular programada, proceso natural controlado genéticamente por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos intrínsecos (p.e. daño en el ADN) y/o extrínsecos.
- Potencial de replicación ilimitado (capacidad de proliferar indefinidamente puesto que tienen sus propias señales de proliferación y pueden evadir las señales antiproliferativas).
- Angiogénesis sostenida (inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes que dotan de nutrientes y oxígeno a las células tumorales, facilitando así el crecimiento del tumor).
- Capacidad de invasión de tejidos y metástasis.
- Evasión de la destrucción por el sistema inmune.
- Desregulación del metabolismo energético (consumen una gran cantidad de glucosa que transforman en lactato incluso en presencia de oxígeno, mediante glicólisis aeróbica, lo que se conoce como efecto Warburg).
- Inestabilidad genómica (debido a una mayor tasa de división celular, así como a defectos en los sistemas de reparación de daños en el ADN, acumulan un mayor número de mutaciones en su genoma).
- Inflamación promotora de tumores (la inflamación crónica del tumor colabora en el desarrollo tumoral debido a la secreción tanto de factores de crecimiento como angiogénicos por parte de células del sistema inmune).

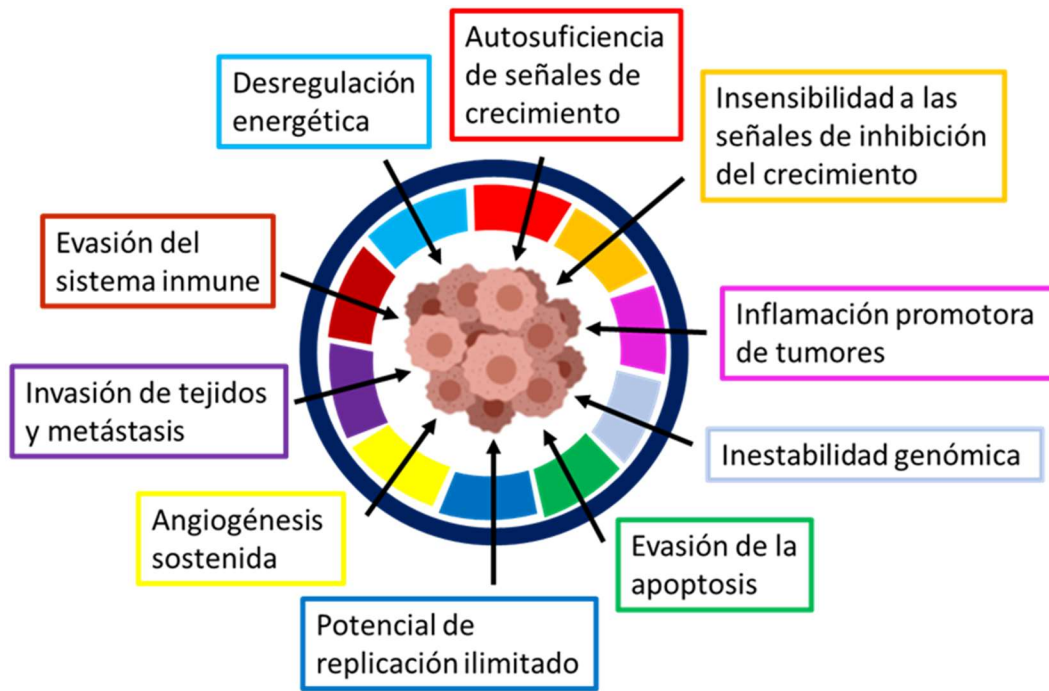


Figura 1. - Esquema de las principales características adquiridas por las células tumorales. Imagen modificada de [6].

Los cambios genéticos y/o epigenéticos que originan el desarrollo tumoral pueden heredarse si están presentes en las células germinales. Esto es poco frecuente, pues solo un 5% -10% de todos los tipos de cáncer son hereditarios. En la mayoría de los casos el cáncer es esporádico (90%-95%), debido a los cambios que se adquieren en las células somáticas a lo largo de la vida de una persona, bien sea de una manera espontánea por errores de la propia célula, o por exposición a determinados agentes carcinogénicos, ya sean químicos (determinadas sustancias químicas, p.e. benceno), físicos (algunos tipos de radiación electromagnética, p.e. radiación ultravioleta), o biológicos (algunos parásitos, bacterias, p.e. *Helicobacter pylori*, virus, p.e. el virus de la hepatitis C, etc.) [5–7].

Los cambios genéticos, o mutaciones, son alteraciones heredables del ADN (tanto numéricas como estructurales) que afectan a la secuencia de nucleótidos. Las mutaciones que mayor contribución tienen a la aparición de un cáncer son las que ocurren en tres tipos de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de los sistemas de reparación del ADN [8]. Los proto-oncogenes son genes implicados en el crecimiento normal de la célula, ya que contienen la información

A.- Introducción

necesaria para la producción de las proteínas responsables de estimular la división celular normal, inhibir la diferenciación celular y controlar la apoptosis [9]. Las mutaciones en estos genes alteran su secuencia, y los convierten en lo que se conoce como oncogenes, lo que provoca cambios en los niveles y/o estructura de las proteínas que codifican. Esto da lugar a una división y diferenciación celular incontroladas y una inhibición de la apoptosis, características típicas de las células tumorales. De la misma manera, las mutaciones en los genes supresores de tumores alteran su función, que es la de codificar proteínas responsables de inhibir la proliferación celular excesiva o descontrolada [9]. El ejemplo más famoso de gen supresor de tumores es el del gen *TP53*, o *p53*, mutado en aproximadamente el 50% de los tumores humanos y conocido como guardián del genoma [10]. Finalmente, las mutaciones en los genes de los sistemas de reparación del ADN, como puede ser el sistema de reparación por escisión de nucleótido (NER, *Nucleotide Excision Repair*), hacen que los daños que se producen en el genoma no se reparen y se fijen como mutaciones, de forma que se van acumulando estas mutaciones, de manera progresiva, y acaban originando un proceso tumoral [11].

Los cambios epigenéticos son modificaciones químicas, tanto del ADN como de las histonas (proteínas que proporcionan soporte y forma al ADN en el interior del núcleo celular), que modulan la actividad de los genes sin modificar su secuencia de nucleótidos [4]. Las dos modificaciones epigenéticas más importantes son la metilación del ADN (adición de un grupo metilo al carbono 5 de las citosinas) y las modificaciones postraduccionales de las histonas, principalmente la acetilación y la metilación de lisinas y argininas de sus colas amino-terminal [12,13]. La metilación del ADN contribuye al proceso de carcinogénesis de dos formas [4,14]: (i) la reducción de los niveles de metilación global del ADN que presentan las células tumorales en comparación a las células normales favorece el aumento de la actividad de proto-oncogenes, y (ii) el silenciamiento de genes supresores de tumores mediante la hipermetilación de sus regiones promotoras (secuencias específicas que regulan la transcripción del gen). Por otro lado, las modificaciones de las histonas afectan al grado de empaquetamiento del ADN, lo que conduce a cambios en la transcripción de genes, en la reparación y en la replicación del ADN [15]. Así, se han relacionado

patrones de modificación de histonas con procesos tumorales, debido a cambios en la expresión de determinados proto-oncogenes y genes supresores de tumores [16].

El cáncer es un problema muy importante de salud pública que, en la actualidad, y de acuerdo con los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la segunda causa de muerte a nivel mundial. También en España, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad, con 26,3% de los fallecimientos, solo superado por las enfermedades cardiovasculares [17]. Además, según la *International Agency for Research on Cancer*, en 2018 la incidencia de cáncer a nivel mundial fue de 18,1 millones de casos nuevos, y se estima que aumentará hasta los 29,5 millones en 2040 (Figura 2) [18]. Este aumento en la incidencia se debe, por una parte, al aumento de la población y de su esperanza de vida y, por otra, al aumento de la exposición a agentes cancerígenos [19,20]. En España, la tendencia es similar a la del resto de los países desarrollados, con un número de diagnósticos de cáncer por año que se estima alcanzará la cifra de 277.394 en el año 2021. [21]. Esto indica que, si se sigue con esta tendencia, el número de casos en el año 2040 se habrá incrementado en un 40% y se superarán los 370.000 casos.

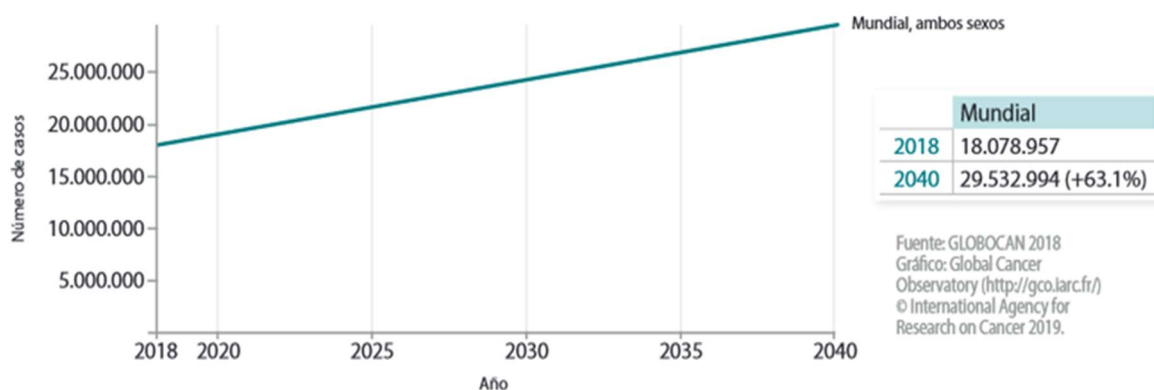


Figura 2. - Incidencia estimada de tumores en la población mundial para el periodo 2018-2040. Foto tomada de [21].

Aunque la incidencia del cáncer, tanto a nivel mundial como en España, sigue una tendencia al alza, la mortalidad, es decir, el número de decesos debidos al cáncer, ha ido disminuyendo durante las últimas décadas en los países desarrollados, donde el control sanitario es mayor, y todo parece indicar que seguirá disminuyendo en los próximos años [22]. Este descenso de mortalidad se debe principalmente al aumento de las actividades preventivas, a la mejora del diagnóstico precoz y a los avances

A.- Introducción

terapéuticos [23]. Es evidente por tanto que mejoras en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer son necesarias para seguir reduciendo la mortalidad, especialmente en aquellos tipos de cáncer en los que la incidencia es alta y la mortalidad aún sigue siendo muy grande. En este sentido, uno de los campos de investigación de mayor importancia en Oncología es la búsqueda de biomarcadores de utilidad clínica, tanto para la detección temprana y la predicción del desarrollo de la enfermedad como para evaluar la respuesta terapéutica.

A.2.- Biomarcadores en cáncer

A.2.1.- Definición y utilidad clínica

No es fácil definir de una manera clara el concepto de marcador biológico, o biomarcador, y, por lo tanto, existen numerosas definiciones del mismo. Una de las más completas es la establecida por el *Biomarker Definition Working Group*, que define un biomarcador como una característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como indicadora de un proceso biológico normal, de un proceso patogénico, o de la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica [24]. Por lo tanto, en esta definición se incluyen una amplia variedad de características, desde parámetros fisiológicos como la temperatura, la presión arterial o la frecuencia cardiaca; características histológicas como el patrón de invasión celular en muestras de tejido tumoral obtenidas por biopsia; los niveles sanguíneos de moléculas de diferente naturaleza, como la glucosa, el colesterol o la tiroglobulina; hasta mutaciones en determinados genes, o la presencia en sangre de células tumorales circulantes de origen epitelial. En cualquier caso, un biomarcador tiene que poder ser medido de manera objetiva en el organismo, a ser posible, en muestras biológicas que puedan ser obtenidas con relativa facilidad, como son los fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, etc.), y la información que proporcione tiene que estar claramente demostrada y contrastada [25].

Los biomarcadores se pueden utilizar en la práctica clínica con diferentes fines [26]. De hecho, se puede hablar de cinco tipos de biomarcadores según sus aplicaciones clínicas (Figura 3) [27], aunque existen biomarcadores que pueden pertenecer a más de un tipo siempre que existan pruebas que lo justifiquen [28]:

- **Biomarcadores de predisposición:** son aquellos que permiten predecir el riesgo de desarrollar una determinada enfermedad antes de que se detecten sus síntomas.
- **Biomarcadores de diagnóstico:** son aquellos que permiten detectar o confirmar la presencia de una enfermedad. Son especialmente relevantes aquellos que permiten un diagnóstico precoz de la enfermedad. También se incluyen en esta categoría los biomarcadores que sirven para estratificar a los pacientes de una enfermedad en subgrupos; es decir, para identificar a las personas con un subtipo de la enfermedad.
- **Biomarcadores de pronóstico:** son aquellos que proporcionan información sobre el curso probable de la enfermedad; es decir, pronostican su gravedad y probabilidad de recurrencia.
- **Biomarcadores farmacodinámicos o de respuesta:** son aquellos que permiten pronosticar como responderá un paciente al tratamiento de una enfermedad. Estos biomarcadores evitan la aplicación de tratamientos innecesarios, o que puedan producir reacciones adversas.
- **Biomarcadores de seguimiento:** son aquellos que permiten realizar el seguimiento de una enfermedad, o del efecto de un tratamiento sobre una enfermedad.

En el campo concreto de la Oncología, los biomarcadores juegan un papel cada vez más importante en el manejo clínico de los pacientes con cáncer. Existen numerosos biomarcadores tumorales aprobados para su uso en clínica por distintas agencias regulatorias sanitarias, como la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) [29], tanto para la detección precoz, como el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de determinados tipos de

A.- Introducción

tumores y su tratamiento. Así, en la actualidad, los biomarcadores tumorales son la herramienta más poderosa para la detección precoz de la existencia de un determinado tipo de cáncer en personas aparentemente sanas, o con riesgo de padecer dicho cáncer por su estilo de vida o sus antecedentes familiares. Un ejemplo es el nivel de la alfafetoproteína en sangre, que se utiliza para el cribado del cáncer hepático en pacientes con hepatitis B crónica [30]. Otros ejemplos de biomarcadores tumorales comunes son la determinación de la proteína calcitonina en sangre, para evaluar el pronóstico del cáncer de tiroides medular, la respuesta al tratamiento y detectar su reaparición después del tratamiento (recidiva) [31]; o el nivel en sangre de la proteína denominada CA-125 (*Cancer Antigen-125*) para evaluar la respuesta a tratamientos de quimioterapia y la recidiva del cáncer de ovario [32].



Figura 3. - Tipos de biomarcadores según sus aplicaciones en clínica.

En este sentido, varias organizaciones nacionales e internacionales han establecido pautas para el uso de biomarcadores tumorales en la práctica clínica para algunos tipos de cáncer, como La Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*), La Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO, *European Society of Medical Oncology*), La Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NACB, *National Academy of Clinical Biochemistry*) y El Grupo Europeo de Marcadores Tumorales (EGTM, *European Group on Tumor Markers*).

Es evidente la importancia que tienen los biomarcadores, y, por lo tanto, es entendible que el desarrollo de nuevos biomarcadores en cáncer sea un campo de

investigación multidisciplinar muy activo. Sin embargo, a pesar de que constantemente se están descubriendo nuevos biomarcadores, su validación y aprobación para su uso en clínica es un proceso largo y difícil, que implica los siguientes pasos: descubrimiento (identificación) del biomarcador; validación analítica, es decir, el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su determinación en las muestras de interés con adecuada sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud; validación de su utilidad clínica; y, finalmente, su implementación clínica, que implica su aprobación por las agencias reguladoras y su inclusión en las guías de práctica clínica [33,34]. Dada la complejidad de todos estos pasos, se estima que la tasa de éxito de la traslación a clínica de un nuevo biomarcador es sólo del 0,1% [35].

A.2.2.- Tipos de biomarcadores tumorales según su naturaleza biológica

La mayoría de las células de nuestro organismo contienen en el ADN, presente en el núcleo celular, los genes que codifican la síntesis de proteínas, que son moléculas implicadas en numerosos procesos biológicos, entre otros, el metabolismo celular [36]. Como ya se ha comentado, en el proceso de carcinogénesis, transformación de una célula normal en una célula cancerosa, se producen cambios genéticos y epigenéticos que afectan a la expresión de determinados genes [4]. Estas variaciones en la expresión se traducen en cambios en la concentración de las correspondientes proteínas (Figura 4) que, a su vez, pueden dar lugar a cambios en el metabolismo celular y, en consecuencia, en las moléculas implicadas en dicho metabolismo (metabolitos) (Figura 4). Cuando estos cambios ocurren en un número suficiente de pacientes con un tipo de cáncer en particular, las moléculas implicadas pueden llegar a ser utilizadas como biomarcadores tumorales [37]. De esta manera, atendiendo a su naturaleza biológica, los biomarcadores tumorales pueden ser clasificados en: genómicos, proteicos y metabólicos (Figura 4) [37].

A.- Introducción

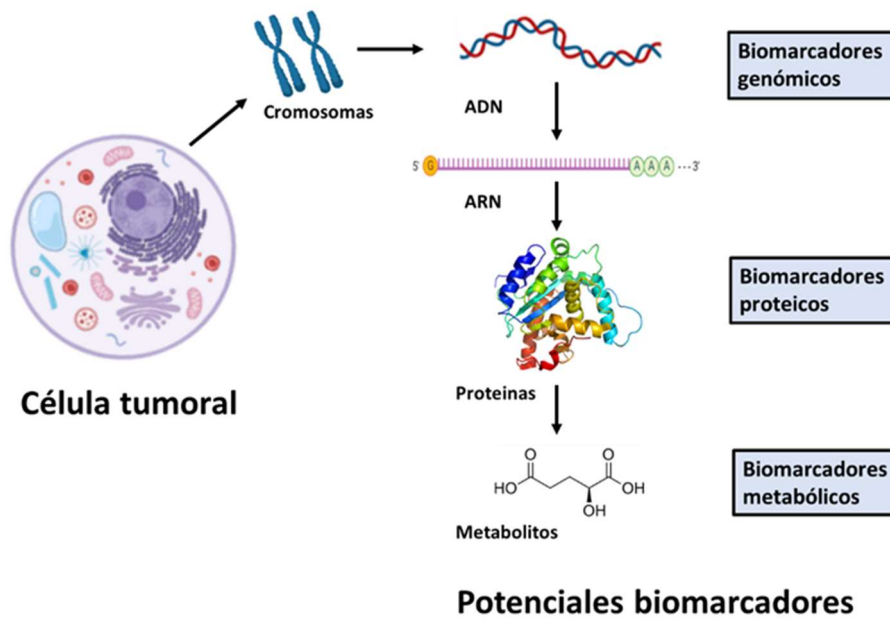


Figura 4. - Clasificación de los biomarcadores tumorales según su naturaleza biológica.

Los biomarcadores genómicos son aquellos relacionados con cambios en el ADN, bien sean mutaciones [38], distintos niveles de metilación del ADN [38], o variaciones en el número de copias de un gen [39], entre otros. Así, por ejemplo, se ha demostrado que mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* son un indicador de una mayor propensión a padecer cáncer de mama y ovario, por lo que se realiza un análisis genético de estos genes como una de las pruebas de control a aquellas personas con antecedentes familiares de cáncer de mama [40–42].

Los biomarcadores proteicos son aquellos relacionados con cambios en la concentración de proteínas o sus modificaciones post-traduccionales (metilación, fosforilación, acetilación). Son los más numerosos entre los aprobados actualmente para su uso en clínica, tanto por la EMA como por la FDA [29]. Algunos ejemplos de biomarcadores proteicos de uso común son la calcitonina y el CA-125, comentados en el apartado anterior, pero se pueden mencionar muchos más, como la proteína denominada PSA (*Prostate Specific Antigen*), cuyos niveles en sangre proporcionan información sobre la probabilidad de desarrollar cáncer de próstata [43]; la tiroglobulina, cuya concentración en sangre es útil como biomarcador de pronóstico y seguimiento de pacientes con cáncer de tiroides [44]; o la microglobulina beta-2, que

se determina en sangre, orina o líquido cefalorraquídeo para evaluar el pronóstico y seguir la respuesta al tratamiento del mieloma múltiple, la leucemia linfocítica crónica y algunos linfomas [45].

Los marcadores metabólicos son aquellos relacionados con cambios en la concentración de metabolitos; es decir, sustancias de diferente naturaleza (ácidos orgánicos, aminoácidos, fosfolípidos, etc.) utilizadas o generadas por procesos metabólicos celulares. Normalmente son pequeñas moléculas relacionadas con el metabolismo energético (ciclo de Krebs, glicólisis, etc.), generalmente alterado en los procesos tumorales [46]. Un ejemplo es el succinato, metabolito del ciclo de Krebs, cuyo aumento de concentración en sangre ha sido propuesto recientemente como un nuevo biomarcador de diagnóstico y pronóstico del carcinoma escamoso de cabeza y cuello [47].

Los biomarcadores genómicos, proteicos o metabólicos, se pueden a su vez clasificar en celulares y humorales [48]. Los marcadores celulares son aquellos que están presentes en el tejido tumoral, por lo que se necesita una biopsia sólida para su determinación. Un ejemplo típico de este tipo de biomarcadores son los receptores de estrógenos (ER, *Estrogen Receptors*) y de progesterona (PR, *Progesterone Receptors*), proteínas cuya determinación en muestras obtenidas por biopsia del tejido tumoral permite identificar subtipos de cáncer de mama con diferentes características clínico-patológicas y evolutivas y, por lo tanto, seleccionar un tratamiento adecuado [49]. Los biomarcadores humorales son aquellos que se pueden encontrar en los fluidos corporales (sangre, suero, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.), por lo que se pueden determinar mediante biopsias líquidas no invasivas, a veces en simples análisis de rutina [46]. Ejemplos de biomarcadores de este tipo son los biomarcadores proteicos ya comentados: calcitonina, CA-125, PSA, tiroglobulina y microglobulina beta-2, entre otros. La fácil toma de muestra cobra especial importancia en la utilización de estos biomarcadores como marcadores de diagnóstico, permitiendo la detección temprana de un proceso tumoral de forma previa incluso a la localización física del tumor [50]. La sencillez de la toma de muestra facilita también su empleo como biomarcadores para la realización de un seguimiento de la evolución de la enfermedad o el tratamiento [51]. El desarrollo de metodologías analíticas que

permitan la determinación de biomarcadores humorales en fluidos biológicos es clave, por tanto, para realizar un diagnóstico, pronóstico y seguimiento más efectivo y sencillo de las enfermedades oncológicas y sus tratamientos [52].

A.3.- Variaciones en el número de copias de un gen como biomarcador genómico en cáncer

A.3.1.- Conceptos generales

En el organismo humano se calcula que existen, en cada célula, unos 21.000 genes diferentes que codifican proteínas [53]. Estos genes se encuentran en la secuencia de ADN (genoma humano) repartida en los cromosomas dentro del núcleo celular. Las células somáticas humanas tienen 23 pares de cromosomas, con un cromosoma de cada par procedente de cada progenitor. De esos 23 pares de cromosomas, 22 son pares de cromosomas homólogos (los cromosomas 1 a 22), es decir, ambos cromosomas del mismo par poseen idéntica estructura y tienen los mismos genes. El par restante lo constituyen los cromosomas sexuales (no homólogos): dos cromosomas X en las mujeres, y uno X y otro Y en los varones. Por lo tanto, en el genoma de las células somáticas existen, en principio, dos copias de cada uno de los genes contenidos en el genoma, una en cada cromosoma de cada pareja [54]. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que en el genoma se pueden producir cambios, tanto en su secuencia como en su estructura, entre individuos de una misma especie. Los cambios en la secuencia más frecuentes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) (variaciones en la secuencia de un único nucleótido que se encuentran en al menos el 1% de la población) [55], y las mutaciones por pequeñas inserciones y eliminaciones (deleciones) de unos pocos nucleótidos; mientras que los cambios estructurales incluyen pérdida, ganancia o recolocación de partes de cromosomas, así como variaciones en el número de copias de determinadas regiones del genoma [56].

Las variaciones en el número de copias (CNVs, *Copy Number Variations*) se refieren a regiones del genoma, con un tamaño de al menos 1000 pares de bases, cuyo número de copias varía, en determinadas circunstancias, si se compara con un genoma de referencia [56–59]. Es decir, segmentos de ADN ≥ 1000 pares de bases que están presentes en un número de copias mayor o menor de dos [60]. Estos segmentos de ADN pueden incluir secuencias codificantes de proteínas (uno o varios genes contiguos), en cuyo caso se producen cambios en el número de copias de los genes que contienen [61,62].

Según la ganancia o pérdida de material genético se pueden distinguir varios tipos de CNVs. Las más comunes son (Figura 5) [56]:

- **Deleciones:** implican pérdida de un fragmento de ADN en una región determinada del genoma. Generalmente ocasionan monosomía parcial (presencia de una sola copia) para los genes que se encuentran en la región que sufre la deleción.
- **Duplicaciones:** implican ganancia de un fragmento de ADN en una región determinada del genoma. Generalmente ocasionan trisomías parciales (presencia de tres copias) para los genes que se encuentran en la región que sufre la duplicación.
- **Amplificación:** implica un aumento en el número de copias en que está presente un fragmento de ADN en una región determinada del genoma. Los fragmentos implicados en procesos de amplificación génica pueden llegar a estar presentes en un genoma en cientos de copias. Es el tipo de variación en el número de copias más frecuente en los procesos tumorales.

A.- Introducción

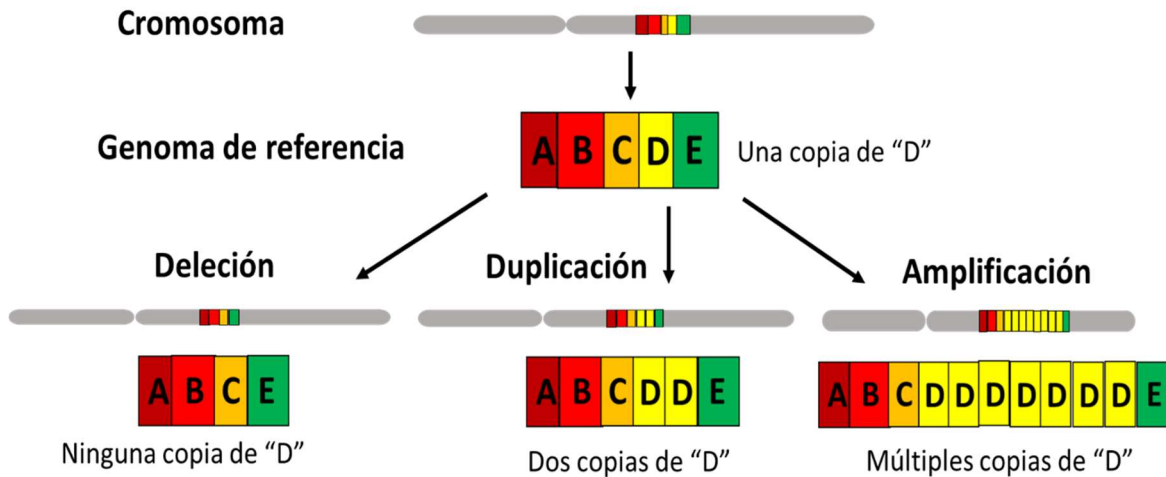


Figura 5.- Representación esquemática de las variaciones en el número de copias más comunes, deleción, duplicación y amplificación. Se representa la variación producida en el locus "D" con respecto a un genoma de referencia (formado por los loci "A", "B", "C", "D" y "E"). En la deleción se puede ver que se produce la pérdida de dicho fragmento "D" en un cromosoma. En la duplicación se puede ver que se produce ganancia de una copia extra del fragmento "D" en dicho cromosoma. En la amplificación se produce ganancia de múltiples copias del fragmento "D" en un cromosoma.

Las CNVs representan la mayor fuente de variabilidad genética en humanos. Constituyen, en número de bases, un 5- 10% del genoma humano [63], un número mucho mayor del que representan todos los SNPs juntos [57]. La gran mayoría de CNVs son simplemente variaciones polimórficas inocuas, sin ningún tipo de relevancia fenotípica; es decir, no introducen ninguna diferencia respecto a la función génica, ya que se producen en regiones del genoma sin una función determinante (normalmente regiones no codificantes). Sin embargo, cuando las CNVs se producen en regiones del genoma codificantes, dan lugar, como ya hemos indicado, a cambios en el número de copias del gen, o genes, presentes en dicha región. Este tipo de situación se conoce como cambios en la dosis génica, y conlleva normalmente cambios en los niveles de las proteínas codificadas por dichos genes [64–67]. Los estudios realizados al respecto indican una mayor expresión génica (mayor nivel de proteína) cuando los genes han sufrido un aumento en el número de copias (amplificación génica), y una menor expresión cuando los genes han sufrido deleciones [64]. Estos cambios en la expresión génica son aún más notables en los casos en los que en un locus (posición precisa de un gen en un cromosoma) se pierde una de las copias de un gen, lo que se conoce

como pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*), de manera que la otra copia del gen es la única que se expresa. Esto es relevante sobre todo en casos de genes supresores de tumores [68]. Por lo tanto, cuando las CNVs producen cambios en la dosis génica influyen en la variabilidad fenotípica, y pueden ser el origen, o al menos un factor de riesgo muy importante, de una gran cantidad de enfermedades o síndromes [69–72], como pueden ser el cáncer [73], el Alzheimer [74], el autismo [75] o la psoriasis [76].

El cáncer es una de las enfermedades con las que más se han relacionado las CNVs, tanto en el caso de CNVs somáticas, como en el caso de CNVs de la línea germinal [77–79]. Estas últimas se han asociado no solo con una mayor predisposición genética a padecer un cáncer hereditario [78,80], sino también con una peor prognosis para diversos tipos de cáncer hereditario, entre los que se encuentran el cáncer de próstata [81], de ovario [82], colorrectal [83] y de mama [77]. Por ejemplo, variaciones en el número de copias del gen *BRCA1* (gen 1 de susceptibilidad a cáncer de mama) han demostrado ser un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama [84,85], encontrándose claras diferencias entre las CNVs encontradas en pacientes con tumores esporádicos y aquellos tumores relacionados con el gen *BRCA1* [86].

En el caso de las CNVs de origen somático, se cree que son una de las causas principales que contribuyen al proceso de carcinogénesis [78]. Al igual que ocurre con mutaciones que tienen lugar en genes puntuales, la aparición de CNVs genera inestabilidad y desregulación genómica, sobre todo cuando afectan a proto-oncogenes y genes supresores de tumores, dando lugar a la aparición de un cáncer [87]. Así, la amplificación génica es uno de los mecanismos más frecuentes de activación de oncogenes en los tumores sólidos [88]. En cáncer de pulmón, por ejemplo, se ha descrito la amplificación de los oncogenes *MYC*, *MYCN*, *MYCL*, *EGFR*, *AKT-2*, *ERBB2*, *PIK3CA* y *REL* [89]. En el cáncer de mama también se ha relacionado un aumento en el número de copias de los genes *PGAP3*, *GRB7*, *MIR4728*, *PNMT*, *STARD3*, *TCAP* y *ERBB2* con el inicio y la progresión del tumor, permitiendo incluso clasificar diferentes subtipos de tumores de mama de acuerdo a las diferencias en CNVs de estos genes [39]. En el caso del cáncer colorrectal, se han identificado deleciones frecuentes en el gen *MACROD2*, que tienen como consecuencia una deficiencia en los mecanismos de

A.- Introducción

reparación del ADN, que contribuye a la progresión del tumor [90]. En los carcinomas renales de células claras (los carcinomas renales más agresivos) se han identificado CNVs del gen *MPDZ*, producidas por la delección de dicho gen en un 28,65% de los pacientes, que dan lugar a una menor tasa de supervivencia, y se pueden utilizar como biomarcador de pronóstico en este tipo de tumores [91]. Asimismo, en las formas más agresivas de cáncer de endometrio, se ha visto que existe, en un alto porcentaje de pacientes, un aumento del número de copias del oncogén *CCNE1* [92,93] lo que supone un peor pronóstico y un mayor riesgo de recaída, pudiendo utilizarse, por tanto, como biomarcador en este tipo de cáncer [94]. Se ha relacionado también un mayor número de copias del gen *CCNE1* con una mayor resistencia de los tumores al tratamiento con fármacos antitumorales, como los inhibidores de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas en tumores de mama, o los agentes antitumorales basados en compuestos de platino en tumores de ovario [95,96]. Estos estudios abren la puerta a la utilización de CNVs de *CCNE1* como biomarcador predictivo del efecto de tratamientos antitumorales en tumores de ovario, entre otros [95,96].

A.3.2.- Metodologías analíticas utilizadas para la determinación de variaciones en el número de copias de un gen

Como se ha puesto de manifiesto, las CNVs de un determinado gen pueden ser de utilidad como biomarcador de diagnóstico, pronóstico y predictivo en cáncer. Por lo tanto, es muy importante disponer de metodologías analíticas adecuadas para su determinación con exactitud y precisión en el genoma celular. El desarrollo de dichas metodologías es un área de investigación de gran interés que, durante los últimos quince años, ha estado en constante evolución y que está aún abierta a innovación.

La determinación de CNVs puede ser abordada desde un punto de vista global, estudiando las variaciones en el número de copias que se producen en un grupo amplio de regiones del genoma e incluso a nivel de genoma completo (metodologías de alto rendimiento), o desde un punto de vista puntual, estudiando las CNVs que se producen en una, o en unas pocas regiones concretas del genoma.

Las metodologías más utilizadas en la actualidad para la determinación de CNVs a nivel de genoma completo están basadas en la técnica de secuenciación de nueva generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) y en la técnica de hibridación genómica comparada con *microarrays* de ADN (aCGH, *array-based Comparative Genomic Hybridization*) [97]. Para el estudio de CNVs de regiones concretas del genoma se utilizan fundamentalmente la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence In situ Hybridization*) [98,99] y metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), tanto PCR cuantitativa como PCR digital [100,101], así como la técnica de amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas (MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) [102].

La **secuenciación de nueva generación (NGS)** hace referencia a un conjunto de técnicas, con los mismos fundamentos básicos, que permiten establecer la secuencia de nucleótidos de una gran cantidad de moléculas de ADN de forma masiva y en paralelo, en menos tiempo y con menor coste que la técnica de secuenciación de primera generación (secuenciación de Sanger) [103,104]. La NGS se puede aplicar a la secuenciación completa del genoma, del exoma (únicamente las regiones codificantes del genoma), o de un panel de genes (una serie de genes concretos). Además, según el diseño del estudio, se puede obtener información de SNPs, de pequeñas inserciones o deleciones, o de CNVs [105–107]. El análisis de la gran cantidad de resultados que generan estas metodologías de secuenciación de nueva generación es complejo, y requiere la utilización de diversas herramientas de análisis y *softwares* de tratamiento de datos para su adecuada interpretación [108,109]. A pesar de la utilización de estos *softwares*, la gran cantidad de datos que se manejan, la complejidad de su tratamiento y los problemas intrínsecos de la metodología, que presenta limitaciones cuando se trata de CNVs de pequeño tamaño que afectan a uno o unos pocos exones [110], hacen que la NGS sea muy útil a la hora de encontrar nuevas CNVs, pero el análisis cuantitativo de las mismas sea aún un desafío [109].

La técnica de **hibridación genómica comparada con *microarrays* de ADN (aCGH)** permite detectar CNVs a través de todo el genoma con alta resolución y rapidez, y puede, además, ser implementada de forma automatizada en plataformas

A.- Introducción

de alto rendimiento [111]. La técnica se basa, como se muestra en la Figura 6, en la hibridación (unión de secuencias complementarias de ADN) competitiva de dos genomas (muestra y control), marcados con distintos fluoróforos, con un conjunto de sondas (oligonucleótidos de cadena sencilla de secuencia complementaria a la región del genoma de interés) fijadas de manera ordenada sobre un soporte de vidrio de pequeñas dimensiones (*microarray* de ADN) [112]. Las sondas utilizadas tienen una secuencia conocida, complementaria a las secuencias de interés del genoma. Una vez producida la hibridación, la intensidad de la fluorescencia en cada punto del *microarray*, medida con un escáner de fluorescencia de alta resolución, informa sobre la cantidad relativa de cada genoma (muestra y control) en dicho punto, y permite detectar la presencia de ganancias, o de pérdidas, de material genético (CNVs), en regiones concretas del genoma muestra [112].

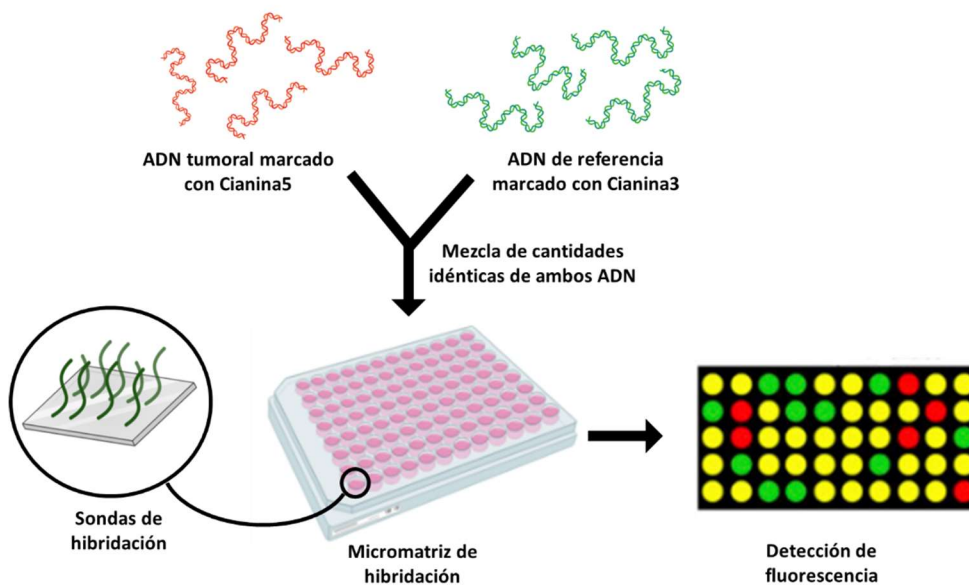


Figura 6.- Representación esquemática de la técnica de hibridación genómica comparada con microarrays de ADN (aCGH). Una mezcla con cantidades idénticas de un ADN tumoral (muestra) y un ADN de referencia (control) se hace hibridar con un conjunto de sondas, microarray de ADN. La hibridación diferencial genera diferencias de fluorescencia que permiten determinar CNVs en el ADN tumoral.

En la actualidad, existe un gran número de plataformas comerciales de aCGH, basadas en *microarrays* que utilizan sondas de cromosomas bacterianos artificiales o sondas de oligonucleótidos sintéticos, y que están diseñadas para cubrir el genoma

completo (tienen 40.000-400.000 sondas), para cubrir zonas concretas del genoma, o para el estudio de determinados genes [112]. Al igual que con el uso de la técnica de NGS, con esta técnica es fundamental disponer de herramientas de *software* adecuadas para analizar e interpretar de forma correcta la información que se obtiene [113]. Las principales ventajas de la metodología son su alta capacidad para detectar CNVs de pequeño tamaño. Además, permite el estudio del genoma completo, pero conlleva un alto coste en equipamiento y reactivos además de tener un bajo rendimiento [102].

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es otra técnica basada en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de unirse entre sí por complementariedad de bases (hibridación). Permite la detección de secuencias específicas de ADN directamente en preparaciones celulares y cortes de tejido [114,115]. Se basa, como se muestra esquemáticamente en la Figura 7, en la utilización de sondas, marcadas con un fluoróforo, que hibridan con la región del genoma en estudio dentro de la célula y, a continuación, las secuencias hibridadas con el genoma de la muestra se pueden visualizar mediante microscopía de fluorescencia [114,115]. El número, la ubicación y las posiciones relativas de las señales fluorescentes de la sonda indican ganancias o pérdidas del número de copias del gen en estudio en una célula en particular [99]. Generalmente, para la cuantificación de CNVs, se compara la señal obtenida para el gen de interés con respecto a un gen de referencia [116].

La técnica FISH permite realizar hibridación con múltiples sondas marcadas con diferentes fluoróforos, por lo que se pueden determinar CNVs de múltiples genes a la vez, siendo la única limitación para ello la disponibilidad de fluoróforos [117]. Sin embargo, el análisis está realmente restringido a unos pocos genes cada vez, debido a la poca cantidad de fluoróforos diferentes para las sondas utilizadas [118], y además, en la práctica, la realización de ensayos múltiples resulta difícil de optimizar [119]. Por otro lado, la determinación por FISH está restringida a aquellas CNVs de gran tamaño (>5-10 millones de pares de bases) debido a su baja resolución [120,121]. A pesar de estas limitaciones, se utiliza en clínica para la determinación de CNVs en genes concretos [122]; así como para validar las CNVs identificadas mediante otras técnicas, en especial MLPA o aCGH [123].

A.- Introducción

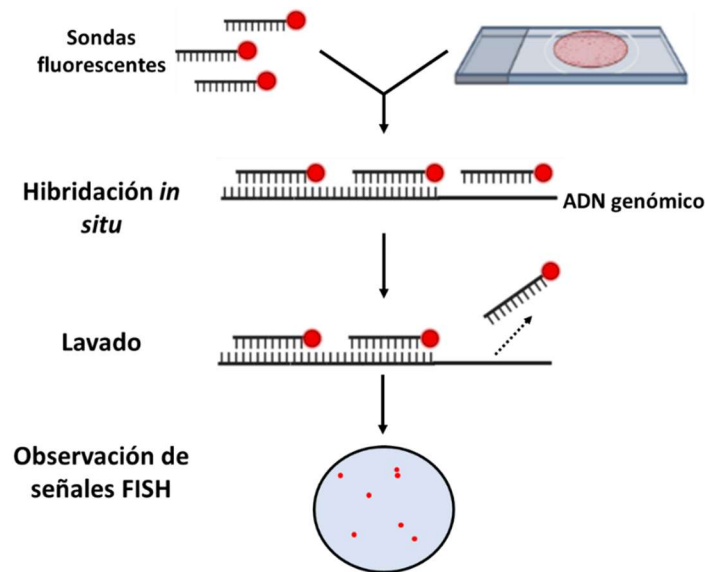


Figura 7. - Representación esquemática de la técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH). Las sondas fluorescentes hibridan con secuencias complementarias del ADN genómico presente en la muestra de células o de tejido. Tras lavar para eliminar las sondas no hibridadas se obtienen señales de fluorescencia medibles que permiten determinar CNVs.

Por último, existen un grupo muy importante de metodologías, que se describen en el siguiente apartado, que permiten la determinación de secuencias específicas de ADN, con gran sensibilidad, a través de su amplificación *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y que son ampliamente utilizadas para la determinación de CNVs a nivel de regiones concretas del genoma.

A.3.2.1- Metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Kary Mullis en 1986 [124], y que le sirvió para obtener el Premio Nobel de Química en 1993, es la técnica más utilizada en muchos tipos de análisis genómico en los laboratorios de todo el mundo, tanto en los de investigación básica como en los de clínica, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un determinado fragmento de ADN a partir de una sola molécula [125]. En palabras de su propio creador, “lets you pick the piece of DNA you’re interested in and have as much of it as you want” [124].

Para llevar a cabo una reacción de PCR se requiere del ADN que contiene el fragmento que se quiere amplificar (ADN molde), una pareja de oligonucleótidos de 15-25 nucleótidos iniciadores de la reacción, complementarios con los extremos de la secuencia del fragmento a amplificar (cebadores o *primers*), una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPS) (de adenina (dATP), citosina (dCTP), guanina (dGTP) y timina (dTTP)) y una enzima ADN polimerasa termoestable. Además, se necesita un tampón apropiado como medio de reacción para el funcionamiento de la enzima, y la presencia de cationes divalentes (generalmente Mg^{2+}) como cofactores [126]. La reacción se lleva a cabo, en un instrumento denominado termociclador, mediante una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Cada ciclo consta de varias etapas, como puede verse en la Figura 8:

- **Desnaturalización:** separación de las dos cadenas del ADN molde mediante calentamiento a una temperatura entre 90 y 95°C para romper los puentes de hidrógeno que las unen. De esta manera, cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN tras la unión de los cebadores.
- **Hibridación:** los cebadores se unen, por complementariedad de bases, en sitios específicos a las cadenas sencillas obtenidas en el paso anterior. Para ello, se enfría la reacción hasta temperaturas de entre 50 y 65°C para permitir la hibridación.
- **Elongación o extensión:** la enzima polimerasa incorpora los distintos dNTPs, según la regla de la complementariedad, a partir del extremo 3'-OH libre de los cebadores, unidos en el paso anterior, para sintetizar una nueva cadena de ADN complementaria a la existente. La temperatura a la que se lleva a cabo esta etapa de elongación suele ser de 72°C.

A.- Introducción

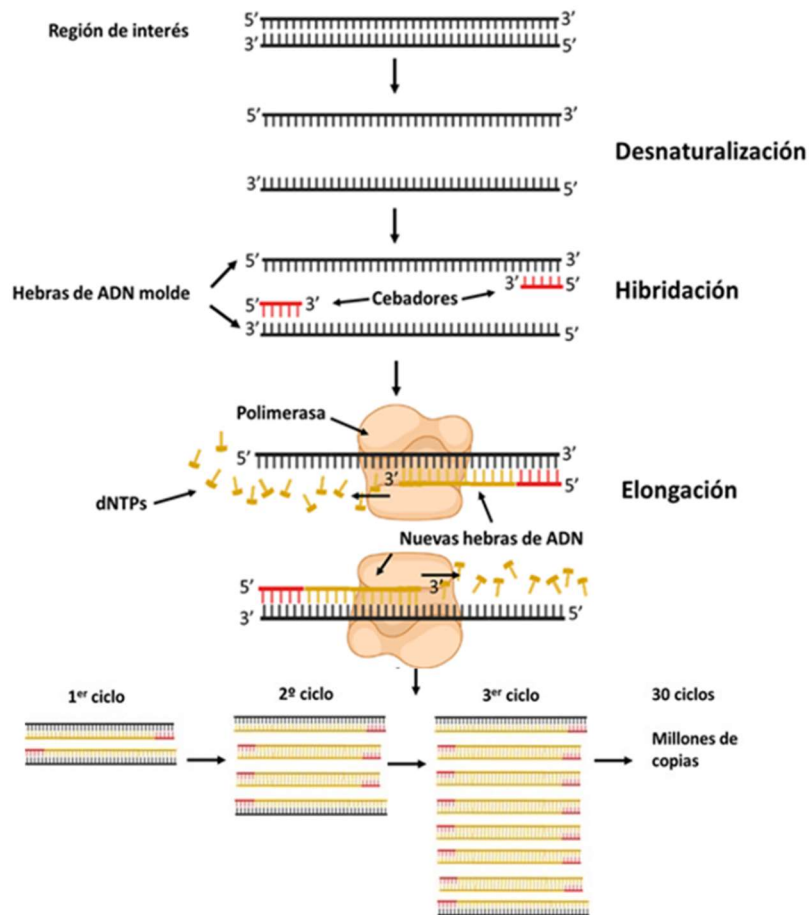


Figura 8.- Esquema del proceso de PCR. Se pueden ver parte de los reactivos necesarios y las tres etapas de las que consta cada ciclo de reacción.

Estas tres etapas, que constituyen un ciclo de PCR, se repiten sucesivamente entre 20 y 40 veces, de tal forma que en cada ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias de cada molécula de ADN presente en la reacción. De esta forma, la cantidad de los productos generados aumenta de manera exponencial, porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos siguientes [125]. Así, a partir de una pequeña cantidad de ADN molde, y utilizando una pareja de cebadores de una secuencia determinada, se pueden obtener millones de copias del fragmento de interés [127].

La técnica de PCR permite la amplificación de dos o más regiones del ADN molde, de forma simultánea, en una misma reacción, lo que se denomina PCR múltiple o multiplex [128]. Para ello, son necesarias varias parejas de cebadores, cada una de

ellas específica para la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés. Las distintas parejas de cebadores deben ser diseñadas de forma que trabajen a temperaturas de hibridación similares. Además, deben comprobarse los alineamientos de las distintas secuencias de cebadores para asegurarse que no hibriden entre ellos, produciendo dímeros de cebadores y/o amplificación indeseada [129]. Los procedimientos de PCR múltiple requieren de una buena optimización, siendo a veces un proceso bastante laborioso, ya que los distintos fragmentos de interés pueden tener distinta eficiencia de amplificación, pueden requerir de distinta cantidad de cebadores, de distinta temperatura de hibridación o incluso de distinto tiempo de elongación [130,131].

La PCR también permite amplificar uno o varios fragmentos específicos de ácido ribonucleico (ARN), mediante un proceso previo de retrotranscripción (también conocido como transcripción inversa), que copia el ARN inicial (muestra) en forma de su ADN complementario, por acción de una enzima denominada transcriptasa reversa. A partir de este ADN complementario, se realiza una reacción de amplificación normal obteniendo millones de copias de la región o regiones de interés. La técnica se denomina RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*).

Las ventajas de la PCR son principalmente su alta sensibilidad y especificidad [126]. A partir de una cantidad muy pequeña de ADN molde se pueden obtener millones de copias del fragmento de interés deseado, siempre de manera específica si el diseño del experimento se realiza correctamente. Además, es una técnica rápida y relativamente sencilla de llevar a cabo [126]. Su principal desventaja es también su alta sensibilidad, pues pequeñas trazas de ADN no deseado pueden dar problemas de contaminación, obteniéndose resultados engañosos a pesar a su elevada especificidad [126]. Además, es necesario conocer la secuencia de ADN del fragmento de interés que se quiere amplificar (o al menos de las regiones que lo flanquean), por lo que existen ciertas limitaciones en la aplicabilidad de la PCR [127].

Dadas estas ventajas, existen diferentes metodologías basadas en la PCR que se pueden utilizar, como ya se ha comentado, para la determinación de CNVs, como son la PCR cuantitativa (qPCR, *quantitative PCR*) [101], la PCR digital (dPCR, *digital PCR*) [100],

A.- Introducción

y la técnica de amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas (MLPA) [102]

En la cinética enzimática de la reacción de PCR, como se puede ver en la Figura 9, la concentración del fragmento de ADN de interés (fragmento diana) sigue un incremento exponencial a medida que aumenta el número de ciclos de PCR, hasta que se alcanza un máximo de reacción (*plateau*) y cesa la amplificación. No se conoce con certeza la razón por la que se produce este máximo, aunque se cree que puede ser debido a la inactivación térmica de la polimerasa, la descomposición térmica de los cebadores y/o dNTPs, o simplemente por acumulación del producto de reacción [132–135].

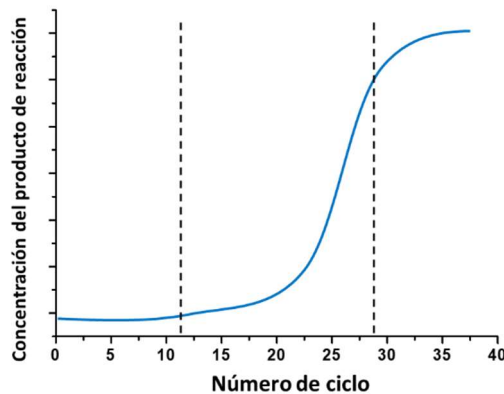


Figura 9.- Evolución del producto de reacción a lo largo de los ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa.

En la técnica de **PCR convencional**, o PCR a tiempo final, que es, como su propio nombre indica, la técnica clásica de PCR, el proceso enzimático de amplificación se hace durante un número de ciclos lo suficientemente grande como para alcanzar el máximo de reacción [136]. Una vez completada la PCR, los fragmentos de interés generados (amplicones) se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa, con detección mediante bromuro de etidio u otro agente intercalante del ADN que emita fluorescencia [126,127]. Por estas razones, la PCR convencional suele emplearse solo para análisis cualitativos; es decir, para establecer la presencia o ausencia de una secuencia específica de ADN, porque la cantidad de producto final de reacción en el máximo (*plateau*) no es proporcional a la cantidad inicial de ADN, pudiendo obtenerse

la misma cantidad de producto de PCR final a partir de cantidades distintas de ADN inicial [132].

La **PCR cuantitativa (qPCR)**, o PCR a tiempo real, es una modificación de la técnica de PCR convencional que permite cuantificar la cantidad inicial de un fragmento diana presente en la muestra de ADN original [126]. Para ello se utilizan, además de los reactivos habituales, moléculas marcadoras que producen una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto de la PCR. La reacción se realiza en un equipo que integra un termociclador convencional y un fluorímetro, que mide la fluorescencia que se produce en todo momento a lo largo del proceso. Las moléculas marcadoras utilizados para seguir la amplificación del ADN pueden ser de tipo inespecífico, como el compuesto orgánico SYBR Green, que emite fluorescencia cuando se intercala en la doble cadena del ADN generado [137]. También pueden ser de tipo específico, como las sondas TaqMan®, que son oligonucleótidos, complementarios a una zona intermedia del fragmento de ADN que se quiere amplificar, marcados con un fluoróforo (F) y un inhibidor de la fluorescencia (Q, *quencher*). De esta manera, mientras que la sonda está libre, la cercanía del Q al F anula su fluorescencia, pero cuando la sonda hibrida con el ADN molde, la polimerasa la hidroliza durante la reacción de amplificación, de manera que F se separa de Q y emite fluorescencia [138]. Sea cual sea el marcador de fluorescencia utilizado, la fluorescencia producida es medida tras cada ciclo de PCR y representada frente al número de ciclos. Así, se obtiene una “gráfica de amplificación” que se muestra en la Figura 10 y que refleja la cinética ya comentada de la PCR (ver Figura 9). En dicha gráfica se pueden distinguir tres fases: una fase inicial en la que la cantidad de producto formado es muy pequeña y, por lo tanto, la señal fluorescente está por debajo del nivel de detección del equipo (fluorescencia basal o ruido de fondo); una fase exponencial en la que el número de copias del fragmento de interés producidas crece de forma exponencial, por lo que la fluorescencia aumenta de forma exponencial también; y una fase final (*plateau*) en la que el producto de reacción, y por tanto la fluorescencia, llegan a un máximo y se estabilizan.

A.- Introducción

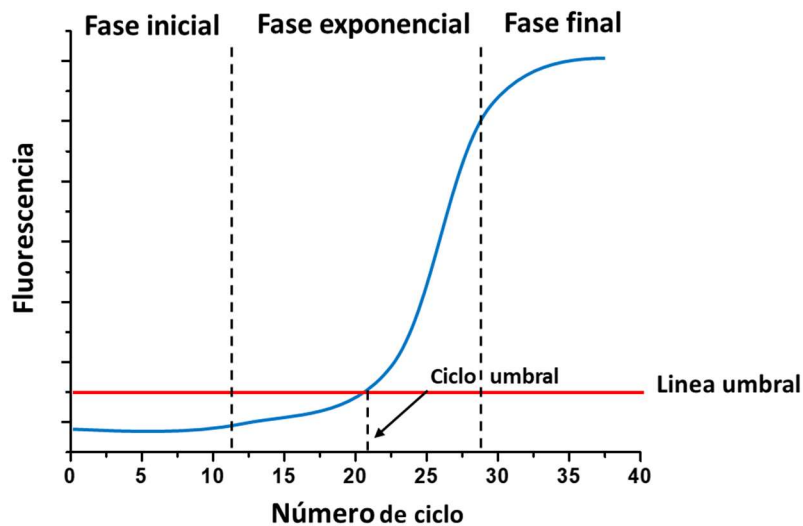


Figura 10.- Gráfica de amplificación de una reacción de PCR a tiempo real, en la que se muestra la evolución de la fluorescencia producida a lo largo de los distintos ciclos de la reacción, mostrando las tres fases de las que consta.

La gráfica de amplificación (Figura 10) se utiliza para establecer una línea umbral que señala el nivel de fluorescencia que se puede distinguir, de forma significativa, de la fluorescencia basal. El punto de corte de la gráfica de amplificación con esa línea se denomina ciclo umbral (*Ct*, *Cycle Threshold*), y se corresponde con el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento significativo de la fluorescencia con respecto a la señal de base (ver Figura 10) [139]. El valor de *Ct* es inversamente proporcional a la cantidad de fragmento diana presente en el ADN inicial, y es el parámetro que se utiliza para su cuantificación [140]. El valor de la línea umbral puede ser establecido de manera automática por el *software* del equipo, mediante diferentes algoritmos, o bien se puede asignar de forma manual tras observar la gráfica de amplificación obtenida [141].

La cuantificación mediante qPCR puede realizarse de forma absoluta o relativa [142]. En la cuantificación absoluta, se traza una curva de calibrado representando los valores de *Ct* obtenidos para disoluciones de ADN patrón, de concentración conocida y creciente, frente al logaritmo de dicha concentración. La interpolación en esta curva de calibrado del valor de *Ct* obtenido para el ADN muestra permite determinar el número de copias de una determinada secuencia de ADN (un gen) en dicha muestra [142]. Para la preparación de las disoluciones patrón se puede utilizar ADN plasmídico, ADN genómico, grandes oligonucleótidos comerciales o productos de PCR [142]. La

cuantificación puede ser también relativa, comparando el valor de Ct obtenido para el gen de interés con el Ct obtenido para un gen de referencia [143].

La técnica de qPCR se puede aplicar a la amplificación y cuantificación de varios fragmentos de ADN simultáneamente, es decir en modo multiplex, teniendo en cuenta los requerimientos ya comentados. Además, es necesario utilizar sondas fluorescentes específicas (no se pueden utilizar agentes intercalantes no específicos), marcadas con un fluoróforo distinto para cada uno de los fragmentos de interés. Por tanto, una de las grandes limitaciones de la qPCR multiplex es el número de fluoróforos distintos que pueden utilizarse y determinarse a la vez en un mismo ensayo [144,145]. Esta limitación puede solventarse parcialmente utilizando sondas doblemente marcadas, para obtener combinaciones de fluoróforos, que permitan aumentar el número de amplicones que se pueden determinar de forma simultánea, pero son metodologías aún más complejas de optimizar y con sus propias limitaciones [146].

Durante los últimos años la qPCR ha sido una metodología muy utilizada para la determinación de CNVs de distintos genes [147,148], debido principalmente a su alta sensibilidad y bajo coste, así como la alta capacidad de adaptación del ensayo al objetivo a conseguir en cada caso concreto [101,121]. Sin embargo, la determinación de CNVs por qPCR requiere de moléculas marcadoras como SYBR Green o sondas de hidrólisis, que aumentan el coste de los ensayos a medida que aumenta el número de CNVs a determinar. Además, el uso de estas moléculas marcadoras en la PCR tiene sus propias desventajas, como puede ser la mayor optimización necesaria, la alteración de la temperatura de desnaturalización o la unión preferencial por ciertas secuencias [149]. Además, la determinación múltiple de distintas CNVs está limitada por el número de sondas con fluoróforos diferentes disponibles.

La técnica de **PCR digital (dPCR)** está basada (ver Figura 11) en la división de la muestra de ADN, que contiene el fragmento a amplificar (secuencia diana), en multitud de gotas de tan sólo unos pocos nanolitros cada una. Las gotas formadas deberían idealmente contener una única molécula de ADN, o ninguna, aunque en la práctica pueden contener más de una [150,151]. Tras esta división de la muestra en pequeñas gotas, se realiza una reacción de PCR de forma individual en cada una de ellas. Utilizando agentes intercalantes del ADN, o sondas fluorescentes (igual que las

A.- Introducción

utilizadas en qPCR), se pueden distinguir aquellas gotas en las que ha tenido lugar la amplificación de la secuencia diana de aquellas en las que no ha habido amplificación, mediante la medida de la señal fluorescente. De esta forma se obtiene un resultado binomial en cada una de las gotas (presencia de fluorescencia=1, ausencia de fluorescencia =0) [150]. Basándose en la relación entre positivos y negativos, y aplicando la distribución de Poisson para incluir la variabilidad que puede producirse en la división de la muestra en gotas, se puede realizar la cuantificación absoluta sin necesidad de una curva de calibrado de la cantidad de secuencia diana en la muestra de partida [150,152].

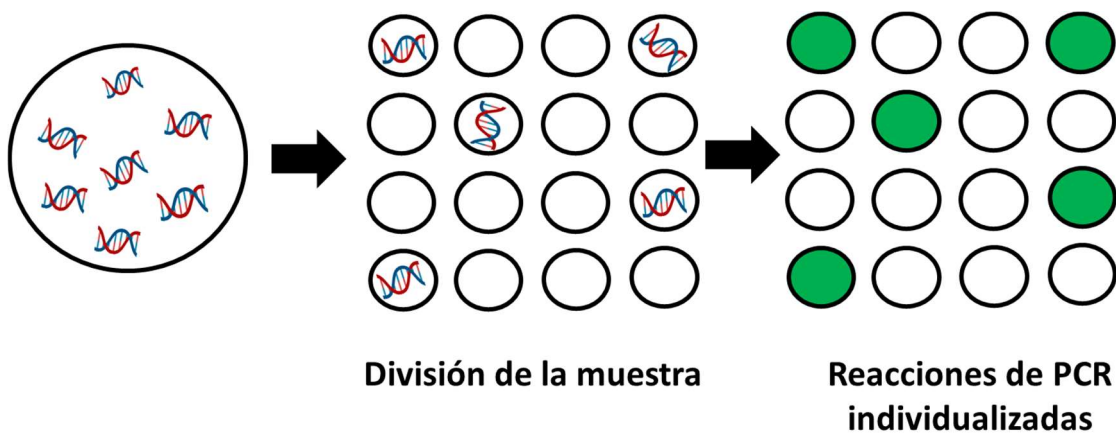


Figura 11.- Esquema de una PCR digital. Se muestran tanto la división de la muestra en gotas como la reacción de PCR en cada una de las gotas, generando fluorescencia (resultado positivo) sólo en aquellas gotas en las que hay una molécula de ADN.

Gracias a los recientes avances desarrollados en el campo de la Microfluídica, se han conseguido desarrollar metodologías, tanto para la división de la muestra en gotas como para el reparto de reactivos de PCR, lo suficientemente buenas como para que la determinación de CNVs mediante ensayos de dPCR tengan una precisión comparable a la que se obtiene mediante qPCR [152]. Sin embargo, ofrece menor sensibilidad debido a la menor cantidad de muestra en cada ensayo individual [153–156].

Finalmente, la técnica de **amplificación múltiple dependiente de la ligación de sondas (MLPA)** permite la determinación de CNVs en hasta 50 regiones del ADN diferentes de forma simultánea [157,158]. Para llevarla a cabo se utiliza una pareja de

sondas por cada secuencia diana (gen) a estudiar, como se muestra en la Figura 12. Estas sondas poseen parte de su secuencia (azul en la Figura 12) complementaria a la secuencia diana, y otra parte de su secuencia (rojo en la Figura 12) complementaria a la secuencia de los cebadores que se utilizarán en la amplificación por PCR. Una de las sondas de cada pareja utilizada tiene, además, una región de tamaño variable (secuencia *stuffer*) y distinta para cada pareja de sondas (verde en la Figura 12), que permite la separación mediante electroforesis de los fragmentos amplificados. De esta forma, se produce en primer lugar una desnaturalización del ADN genómico y una etapa de hibridación entre las sondas y sus secuencias diana correspondientes. A continuación, solo las sondas de cada una de las parejas que han hibridado correctamente se ligan por la acción de una enzima ligasa y, posteriormente, se amplifican por PCR (Figura 12), utilizando sólo un par de cebadores universales (igual para todas las sondas), uno de los cuales está marcado con un fluoróforo [157]. Un aspecto clave en los ensayos de MLPA es que los cebadores no amplifican las secuencias diana, sino las sondas ligadas, de tal forma que los mismos cebadores generan amplicones de tamaño variable dependiendo del tamaño de la región *stuffer* [157]. Como sólo se pueden amplificar las sondas que están ligadas, la cantidad de producto ligado es una medida del número de secuencias diana presentes en la muestra: a mayor número de secuencias diana en la muestra mayor número de amplicones se obtienen tras el ensayo de MLPA [157,159]. Finalmente, los amplicones obtenidos, que tienen distinto tamaño gracias a la distinta secuencia *stuffer* de las distintas sondas utilizadas, se separan mediante electroforesis capilar con detección fluorescente [157]. Tras la electroforesis, se mide el área del pico de cada amplicón en el electroferograma obtenido, correspondiente a cada una de las secuencias diana estudiadas, y se comparan con las obtenidas para un genoma de referencia. De esta manera, se obtiene una cuantificación relativa de las CNVs para los distintos genes estudiados.

A.- Introducción

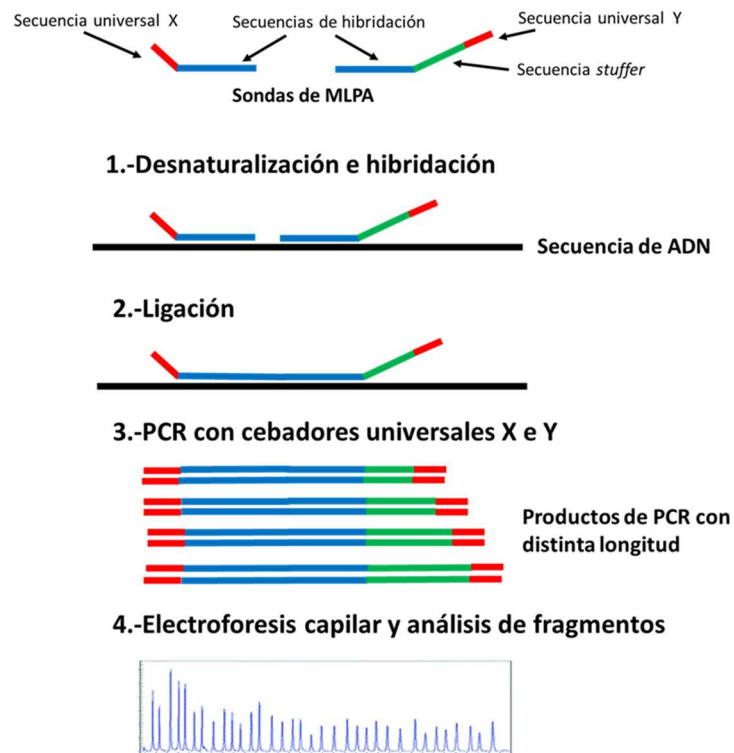


Figura 12.- Esquema de la técnica de MLPA. Parte de la secuencia de las sondas es complementaria a la secuencia diana (azul), otra parte es complementaria a la secuencia de los cebadores que se utilizarán en la amplificación por PCR (roja), y tienen además una región de tamaño variable (*stuffer*) distinta para cada pareja de sondas (verde).

Los kits comerciales que existen en el mercado contienen, además de las sondas específicas para las secuencias de los genes que se quieren estudiar, sondas para otras regiones genómicas, que se utilizan como secuencias de referencia en el análisis de los datos, y sondas control que proporcionan información acerca de la calidad de la reacción [102]. El tratamiento de los datos en la técnica de MPLA es bastante complejo, y se lleva a cabo por *softwares* informáticos como es el caso del Coffalyser [160]. Además, las señales de la sonda pueden verse afectadas por diferentes factores, como la pureza de la muestra o pequeños cambios en las condiciones experimentales. Por ello, los cambios en el número de copias detectados por MLPA siempre deben ser confirmados por otros métodos. El análisis de CNVs mediante MLPA tiene como principal ventaja su capacidad de análisis múltiple, pero debido al tiempo necesario para la síntesis de las sondas requeridas, está limitado en parte a la disponibilidad comercial de las mismas [102].

A.4.- La proteína HER2 como biomarcador proteico en cáncer de mama

A.4.1.- Conceptos generales

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2, *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), también conocido como ErbB2 o HER2/neu, es una glicoproteína transmembrana, perteneciente a la familia de receptores de factores de crecimiento, con actividad tirosina-quinasa (enzimas que catalizan la fosforilación de residuos de tirosinas de determinadas proteínas). Esta familia, denominada EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), está formada por cuatro receptores: HER1 (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) [161,162], a los que se unen factores de crecimiento (ligandos), un grupo de polipéptidos involucrados en la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular, que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Receptores de la familia EGFR y sus ligandos [163].

Receptor	Ligando
HER1	Factor de crecimiento epidérmico Factor de crecimiento transformador α Anfirregulina
HER2	Ligando específico desconocido
HER3	Heregulina
HER4	Heregulina

HER2 es una proteína de 185 kDa codificada por el oncogén *HER2*, localizado en el cromosoma 17, en la región cromosómica q12-21 [164–166], que posee en su estructura (ver Figura 13), como todos los receptores de la familia EGFR, un dominio extracelular altamente glicosilado (ECD, *Extracellular Domain*), donde está localizado el sitio de unión del ligando (extremo amino-terminal), un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio intracelular (citósólico), en el cual se localiza el sitio catalítico con actividad de tirosina-quinasa (extremo carboxi-terminal) [167].

A.- Introducción

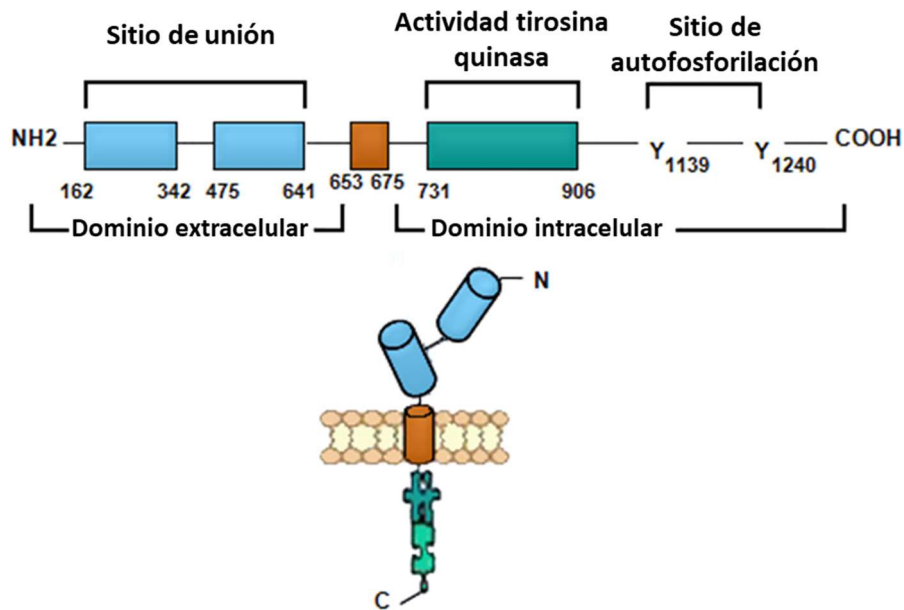


Figura 13.- Estructura de la proteína HER2. Imagen obtenida del *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* [168].

Los receptores de la familia EGFR se encuentran en la membrana plasmática como monómeros inactivos. La unión del ligando específico (Tabla 1) al dominio extracelular de estos receptores provoca un cambio conformacional que permite su dimerización, bien por unión entre dos receptores adyacentes iguales, formando homodímeros, o diferentes, para formar heterodímeros [167]. A diferencia del resto de receptores de la familia, la proteína HER2 no tiene ligandos específicos identificados, si no que se une a los ligandos del resto de receptores. Tras la unión del ligando se produce la formación de los dímeros, como se muestra en la Figura 14. La generación de dímeros entre dos proteínas HER2, o entre HER2 y otro receptor de la familia EGFR, produce la activación de la región intracelular del HER2, con actividad tirosina-quinasa (ver Figura 14). Como consecuencia de ello, la proteína HER2 se autofosforila y, en este estado, es capaz de fosforilar a otras proteínas, desencadenando cascadas de transmisión de señales al núcleo celular, donde se activan determinados factores de transcripción. Estos factores de transcripción regulan la actividad de genes involucrados en procesos celulares, como el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la adhesión, la apoptosis y la migración celular (Figura

14) [169]. Las dos cascadas de señalización de HER2 más estudiadas son la ruta PI3K (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*) y la ruta MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [170] (Figura 14).

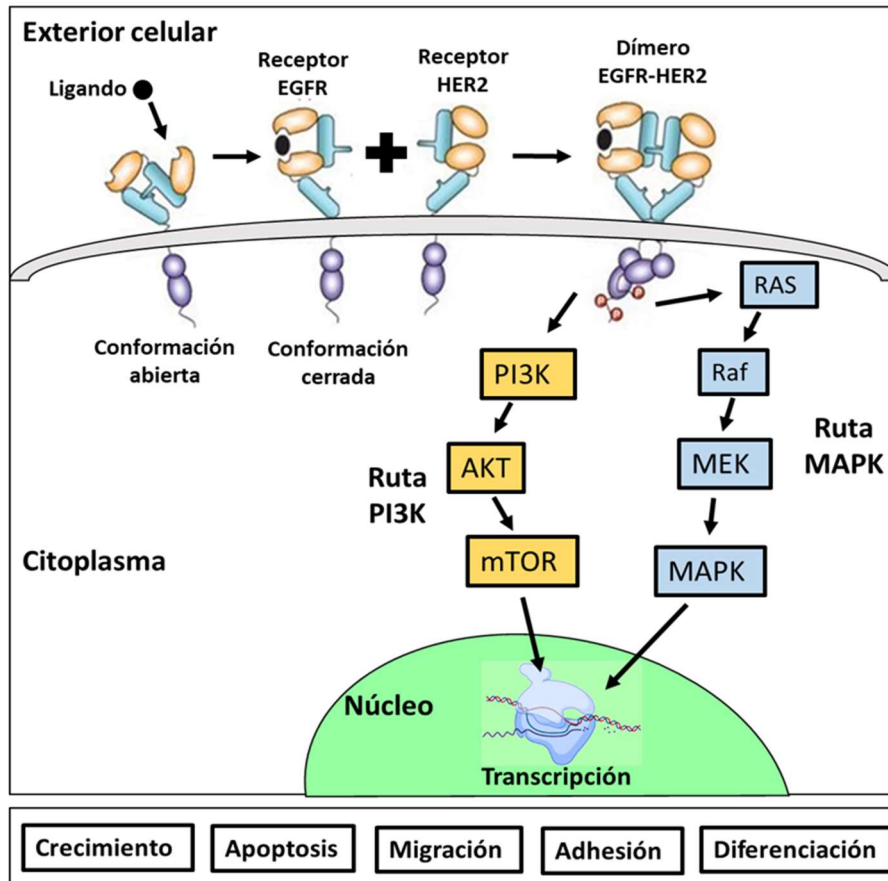


Figura 14.- Representación esquemática de las rutas de señalización generadas por la unión del ligando y la formación del dímero EGFR-HER2. Se muestra el proceso de dimerización y activación del receptor HER2, así como las dos principales rutas de señalización, MAPK y PI3K, encargadas de transmitir señales al núcleo para modular la transcripción de genes involucrados en procesos de crecimiento, apoptosis, migración, adhesión y diferenciación celular.

Una de las peculiaridades del receptor HER2 es que puede ser objeto de rotura proteolítica producida por enzimas como las metaloproteasas dependientes de zinc [171]. Esta rotura proteolítica de HER2 tiene lugar en la región yuxtamembrana de la proteína (ver Figura 15), produciendo la escisión del dominio extracelular (ECD, *Extracellular domain*), que se libera al torrente sanguíneo, dejando en la membrana el receptor de membrana truncado conocido como p95 [172].

A.- Introducción

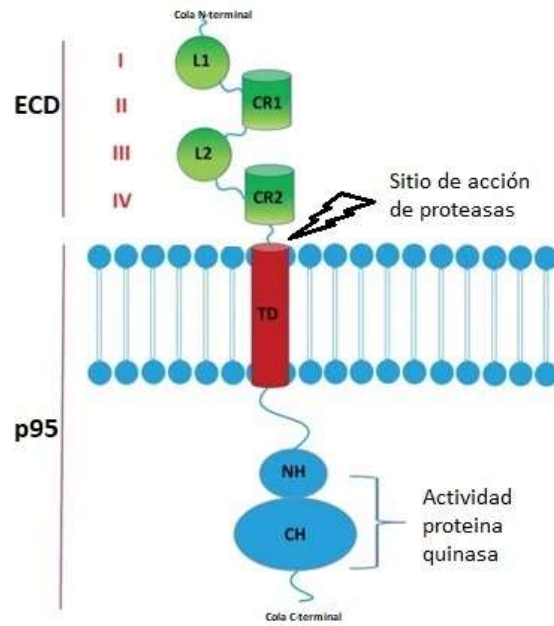


Figura 15.- Esquema de la proteína HER2, donde se muestra el sitio de acción de las proteasas que producen la rotura proteolítica que da lugar a los fragmentos ECD y p95. Imagen modificada de [173].

En condiciones normales, el gen *HER2* se expresa de forma constitutiva y la proteína HER2 está presente en unos niveles fisiológicos apropiados para mantener el equilibrio entre proliferación y muerte celular [174,175]. Sin embargo, cuando se produce la amplificación del gen *HER2*, se induce la sobreexpresión de la proteína HER2 (generalmente a niveles de 10 a 100 veces mayor de lo normal) [176], lo que origina una mayor activación de las cascadas de señalización dependientes de factores de crecimiento, ya comentadas (ver Figura 14), que favorecen el proceso de carcinogénesis [177,178]. Así, se ha demostrado que el gen *HER2* está amplificado, y la proteína HER2 está sobreexpresada, desde etapas muy tempranas de dicho proceso, en ciertos tipos de tumores como son el de mama, el de ovario, el de próstata y el gástrico, entre otros [179]. De todos ellos, el más estudiado es el cáncer de mama, en el que la amplificación del gen *HER2*/sobreexpresión de la proteína HER2 se produce en aproximadamente el 25%-30% de todos los tumores diagnosticados [180,181], aunque la prevalencia varía según la región [182,183]. Este subtipo de tumores de mama con amplificación/sobreexpresión de HER2 se denominan HER2 positivos (HER2+) [182], y se caracterizan por tener un comportamiento biológico muy agresivo y un mal pronóstico [184]. De hecho, la tasa de supervivencia general, así como el tiempo de recaída, son notablemente más cortos para los pacientes con cáncer de mama HER2+ que para los pacientes con otros subtipos de cánceres de mama [167].

Este hecho hace que la proteína HER2 se haya convertido en un biomarcador utilizado de forma rutinaria en la práctica clínica, tanto para el diagnóstico, como para el pronóstico del cáncer de mama [179]. Además, la proteína HER2 es una importante diana terapéutica para el desarrollo de fármacos adecuados para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ [185], mejorando significativamente el estado clínico de los pacientes con este subtipo de cáncer [186].

En la actualidad, son varios los fármacos aprobados por la FDA para su utilización en quimioterapia anti-HER2. Por un lado están los fármacos basados en anticuerpos monoclonales, Trastuzumab y Pertuzumab, que se unen a distintas partes del dominio extracelular de HER2, impidiendo la formación de heterodímeros (Figura 16) [187]. Por otro lado están los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa (TKI, Tyrosine Kinase Inhibitors), Lapatinib, Neratinib y Tucatinib, que son pequeñas moléculas que se unen al sitio catalítico con actividad de tirosina-quinasa del dominio intracelular de HER2 (Figura 16) evitando que se desencadenen las vías de señalización intracelulares ya comentadas [188].

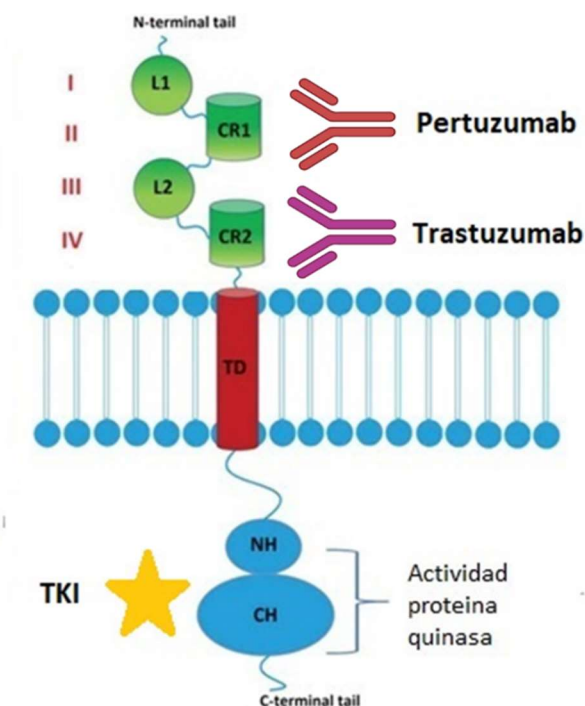


Figura 16.- Esquema de la proteína HER2 y sitio de unión de los principales fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento de tumores HER2+.

A.- Introducción

Debido al diferente comportamiento de los tumores de mama según su nivel de proteína HER2, es de gran importancia su determinación como biomarcador, no solo de diagnóstico y de pronóstico, sino también predictivo [189]. Así, se utiliza de forma rutinaria en clínica para establecer si el cáncer es HER2+ o no, para estratificar a los pacientes para su tratamiento con quimioterapia anti-HER2, y para realizar el seguimiento de la respuesta a dicho tratamiento [189]. Además, también tiene un valor predictivo como biomarcador de respuesta, no solo a la terapia anti-HER2, sino también a otros regímenes terapéuticos, que incluyen terapias endocrinas, o quimioterapia con diferentes agentes como antraciclinas y taxanos [189]. Por lo tanto, el disponer de metodologías analíticas adecuadas para estudiar los niveles de HER2 en pacientes con cáncer de mama es de enorme importancia clínica.

A.4.2.- Metodologías analíticas utilizadas para la determinación de la proteína HER2

La determinación del estado de HER2 en pacientes con cáncer de mama se realiza mediante dos tipos de metodologías: aquellas basadas en la determinación de la amplificación del gen *HER2* (variaciones en el número de copias) o de los niveles de transcripción de dicho gen (niveles de ARN mensajero), y aquellas basadas en la determinación de los niveles de la proteína HER2 [190]. Para la determinación de la amplificación génica en muestras de tejidos tumorales obtenidos mediante biopsias se utilizan las técnicas FISH, qPCR y MPLA, cuyas ventajas y desventajas ya se han comentado [190]. De todas ellas, solo la técnica FISH ha sido implementada para su empleo de forma rutinaria en clínica, y son varios los kits comerciales aprobados por la FDA para tal fin [191]. Además, también se puede utilizar la técnica de RT-qPCR para determinar los niveles de transcripción del gen *HER2* [190,192]. Sin embargo, dado que la integridad del ARN mensajero puede verse dañada por numerosos factores, incluidos el procesamiento del tejido tumoral y el tiempo de almacenamiento [193], la evaluación del estado de *HER2* a nivel del ARN mensajero mediante RT-qPCR es bastante problemática, lo que limita su uso con fines clínicos [193].

Con respecto a la determinación de los niveles de la proteína HER2, las principales técnicas analíticas utilizadas en la práctica clínica son: la inmunohistoquímica (IHC, *Immunohistochemistry*), que permite evaluar la presencia de HER2 en tejidos tumorales, y la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), que permite determinar la concentración del dominio extracelular de la proteína (ECD) en suero sanguíneo [194,195]. Ambas son técnicas inmunoquímicas, o inmunoensayos, que son aquellas técnicas basadas en la interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno para formar un complejo que permite la detección y/o determinación de un analito, normalmente el propio antígeno, aunque también puede ser el anticuerpo.

Para la realización de un inmunoensayo se requieren anticuerpos que reconozcan de manera específica el analito (antígeno) a determinar. Los anticuerpos son glicoproteínas plasmáticas, inmunoglobulinas (Ig), producidas por el sistema inmunitario de los vertebrados en respuesta a una sustancia extraña al organismo (antígeno). Las inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE) constan de cuatro cadenas peptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 17). Disponen de una sección denominada “región constante”, que es la que puede unirse a los receptores de las células inmunes, y una “región variable”, específica para cada antígeno, que es donde se une dicho antígeno, por complementariedad espacial, mediante múltiples interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas e hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals) [196].

La formación del complejo antígeno-anticuerpo no genera por sí misma una señal medible, por lo que es necesario marcar el anticuerpo con un reactivo que genere alguna propiedad físico-química (fluorescencia, absorbancia, radiactividad, etc.) que se pueda medir y relacionar con la concentración del analito (antígeno) [197]. De esta manera, y de acuerdo con el reactivo marcador utilizado, se pueden clasificar los inmunoensayos en: radioinmunoensayos, basados en la medida de la radiación emitida por el isótopo radioactivo utilizado para el marcaje; fluoroinmunoensayos, cuando el marcador es una molécula fluorescente y se mide su fluorescencia; e enzimoimmunoensayos, que utilizan enzimas para el marcaje y se mide la absorbancia del producto formado en la reacción catalizada por dicha enzima [198].

A.- Introducción

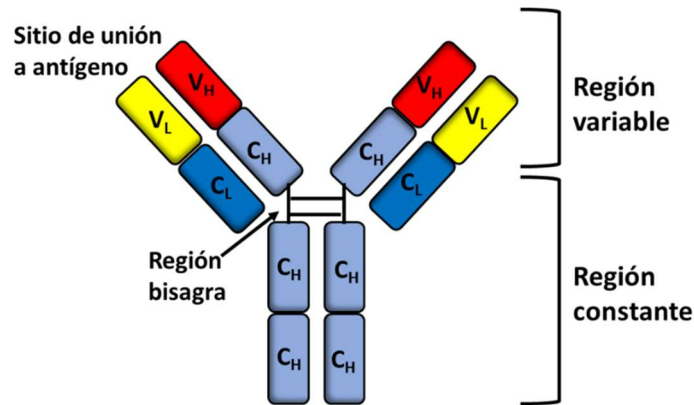


Figura 17. Esquema de la estructura de una inmunoglobulina. Los dominios variables se representan con V, mientras que los dominios constantes se representan con C.

Por otro lado, si en un inmunoensayo se marca el anticuerpo que reconoce el antígeno (anticuerpo primario), el ensayo se denomina directo. Si por el contrario se marca un segundo anticuerpo que a su vez se une al anticuerpo que reconoce el antígeno (anticuerpo secundario), el ensayo se denomina indirecto. Además, los inmunoensayos pueden ser homogéneos cuando la reacción antígeno-anticuerpo y la medida de la señal tienen lugar en el mismo medio, o heterogéneos cuando tienen lugar en distintos medios [198]. Los ensayos homogéneos son competitivos, el antígeno de interés (analito) compite con el antígeno marcado añadido a la muestra por los sitios de unión al anticuerpo; mientras que los heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. En los no competitivos más utilizados, el antígeno (analito) presente en la muestra se une a un anticuerpo fijado en un soporte sólido (anticuerpo de captura), y, a continuación, se adiciona un segundo anticuerpo marcado (anticuerpo de detección) que también se une al antígeno. De esta manera, el antígeno queda empaquetado entre dos anticuerpos, denominándose por ello esta configuración tipo sándwich. La señal que se mide (procedente del anticuerpo marcado) es directamente proporcional a la concentración de antígeno (analito) presente en la muestra. El formato tipo sándwich ofrece una serie de ventajas frente a otro tipo de formatos (mayor sensibilidad y especificidad, principalmente) por lo que es el más utilizado en la mayoría de las aplicaciones de los inmunoensayos [198,199].

De los distintos tipos de inmunoensayos que existen en la actualidad, la inmunohistoquímica (IHC) y el ELISA son dos de los más utilizados en clínica para la detección/determinación de antígenos de diferente naturaleza, entre ellos la proteína

HER2, en muestras biológicas [190]. **La inmunohistoquímica (IHC)** es una técnica que utiliza anticuerpos para detectar y visualizar la presencia, distribución y localización de una determinada proteína en una sección de un tejido procedente de una biopsia, ya sea un tejido congelado o embebido en parafina [200,201]. En el caso concreto de la detección de HER2, las secciones de tejido tumoral se fijan y se incuban con un anticuerpo primario dirigido contra la proteína HER2 (Figura 18) y, a continuación, se añade un anticuerpo secundario, dirigido contra el anticuerpo primario, marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP, *Horseradish Peroxidase*). Finalmente, se añade el sustrato específico de la enzima, 3,3'-diaminobencidina tetracloruro (DAB), que se transforma en un compuesto de color pardo que permite visualizar la presencia de HER2 en la membrana celular con un microscopio (ver Figura 18) [202,203]. De esta manera, se puede observar distinto patrón de tinción de las membranas celulares entre los tumores con distinto niveles de HER2.

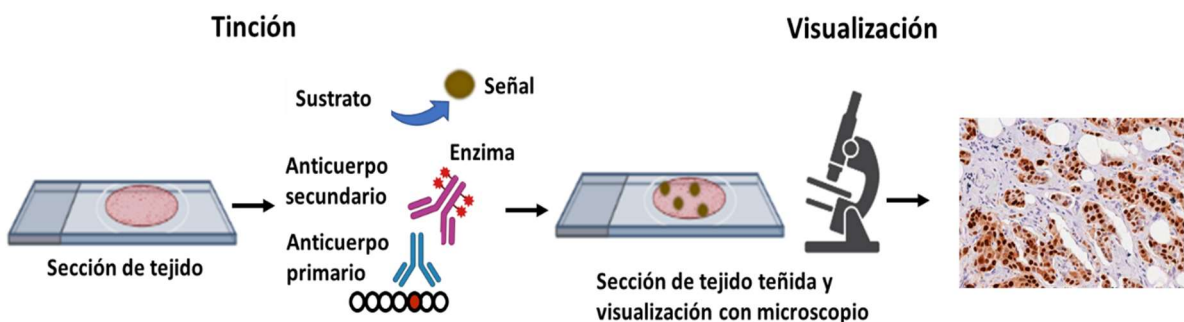


Figura 18.- Representación esquemática de la técnica de IHC. Permite visualizar la presencia de HER2 en la membrana celular, utilizando un microscopio, tras un proceso de “tinción” de la proteína con un anticuerpo secundario marcado con HRP. La sección de tejido fue obtenida de Leica Biosystems [204].

El grado de tinción de la membrana en un determinado porcentaje de células tumorales se puntúa en una escala semicuantitativa que va desde 0 a 3+ (ver Figura 19) de acuerdo con las pautas establecidas por la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*) y el Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP, *College of American Pathologists*) [205,206].

A.- Introducción

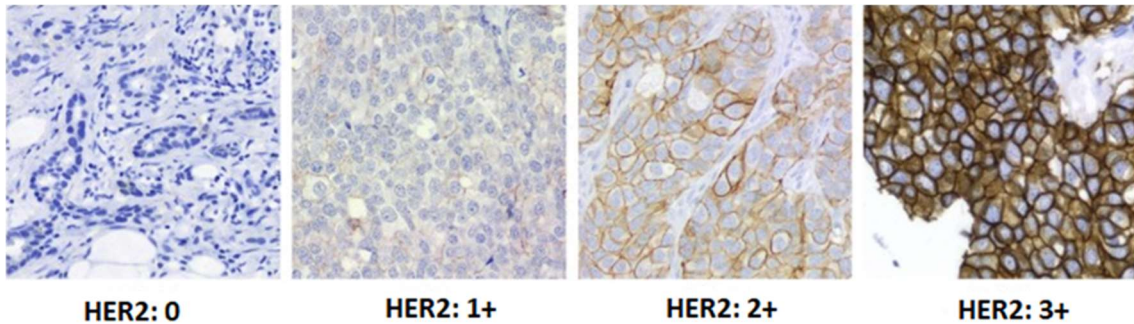


Figura 19.- *Inmunohistoquímica de diferentes muestras tumorales de HER2, en la que se puede apreciar tinción diferencial según el nivel de HER2 en las membranas celulares (desde 0 a 3+). Imagen modificada de Marchiò et al. [207].*

Las ventajas principales de la IHC son su rapidez, relativamente bajo coste y facilidad de análisis. Es una metodología fácilmente implementable en un laboratorio clínico de rutina, y en la actualidad, existen varios kits comerciales de IHC aprobados por la FDA para la realización de test diagnósticos [190]. Sin embargo, la información que proporciona es semicuantitativa, y la exactitud de los resultados está muy influenciada por numerosos factores experimentales [191,208] y por la experiencia del anatomopatólogo que realice el análisis [170,190].

En cuanto a la técnica de **inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)**, es un tipo de inmunoensayo que permite la detección y cuantificación de proteínas en fluidos biológicos y lisados celulares [209–211]. En el caso concreto de HER2, se utiliza para la determinación de la concentración sérica del dominio extracelular (ECD) de la proteína mediante un ELISA tipo sándwich [212], utilizando dos anticuerpos específicos para HER2, uno de ellos inmovilizado en una placa (anticuerpo de captura) y el otro marcado con la enzima HRP (anticuerpo de detección) (Figura 20). Después de la aplicación del sustrato de la enzima HRP se mide la absorbancia del producto formado por espectrofotometría, que se correlaciona con la concentración del ECD de HER2 en la muestra (suero).

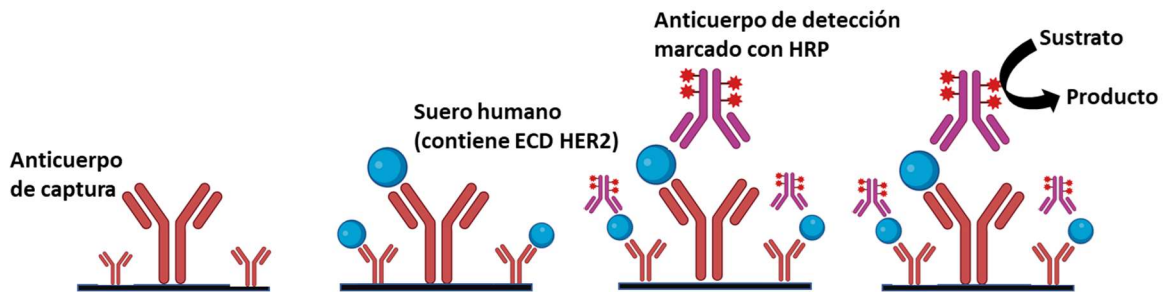


Figura 20.- Representación esquemática de la técnica de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) para la determinación del dominio extracelular (ECD) de HER2.

El ensayo ELISA es un ensayo rápido y sencillo, además de ser menos invasivo que la IHC (solo se necesitan muestras de sangre) y proporcionar resultados cuantitativos [190,213]. Además, dado que el ECD de HER2 puede ser medido directamente en suero, el ensayo ELISA se puede utilizar para controlar los cambios dinámicos del estado de HER2 en el transcurso de la progresión del cáncer de mama o durante el tratamiento [214]. Por ello, se está tratando de implementar su uso en clínica y varios kits de ELISA están siendo evaluados para su aprobación por la FDA con dicha finalidad. Sin embargo, todavía existe mucha controversia sobre la relevancia clínica de los resultados de este ensayo [214–216]. Existen estudios en los que niveles altos de ECD de HER2 en suero (superiores a 15 ng.mL^{-1}) [216] parecen estar correlacionados con los resultados obtenidos para HER2 mediante inmunohistoquímica en el caso de pacientes con tumores HER2+ metastáticos, por lo que se ha propuesto como un biomarcador adecuado para realizar el seguimiento de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento [194,212]. Sin embargo, en general, los resultados de la correlación entre los niveles circulantes de ECD de HER2 y los niveles de HER2 en el tumor son muy variables [214], por lo que el uso clínico del ensayo ELISA para la determinación de ECD de HER2 en el suero del paciente aún no ha sido ampliamente implementado. En consecuencia, el desarrollo de metodologías para la determinación de HER2, sobre todo en el caso de su ECD, es un tema de gran interés.

A.4.2.1.- Inmuno-PCR

En la actualidad, los enzimoimmunoensayos tipo ELISA son una forma relativamente sencilla y eficaz de cuantificar antígenos de diferente naturaleza con elevada selectividad y sensibilidad. En general, y aunque depende del sistema de generación de la señal, el límite de detección de un ensayo ELISA se encuentra en el orden de los $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ o $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [212,217,218]. Por ello, se utilizan ampliamente en clínica para determinar biomarcadores de naturaleza proteica en muestras biológicas [199]. Sin embargo, la metodología de ELISA presenta limitaciones de sensibilidad para la determinación de algunas proteínas cuando están en concentraciones muy bajas y/o en matrices muy complejas [199].

Una forma de incrementar la sensibilidad de los ensayos ELISA es utilizar moléculas marcadoras diferentes a las enzimas para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. En este sentido, en 1992, Sano *et al.* [219] desarrollaron una nueva técnica denominada inmuno-PCR (IPCR), que combina la especificidad y versatilidad de los ensayos ELISA con la amplificación exponencial de la señal de la PCR. Esta combinación permite realizar ensayos de IPCR que presentan límites de detección que pueden llegar a ser varios ordenes de magnitud menores que los de un ELISA análogo [219–221].

En términos generales, un ensayo de IPCR, como se muestra en la Figura 21, es muy similar a un ELISA típico en el que, en lugar de utilizar como marcador una enzima unida a un anticuerpo de detección, se utiliza un fragmento de ADN (sonda de ADN) que, tras la reacción antígeno-anticuerpo, será amplificado mediante PCR para la generación de la señal de detección. El número de moléculas producidas en la PCR, que se determinan, generalmente, mediante qPCR, es proporcional a la cantidad inicial de antígeno capturado por el inmunocomplejo [219–221].

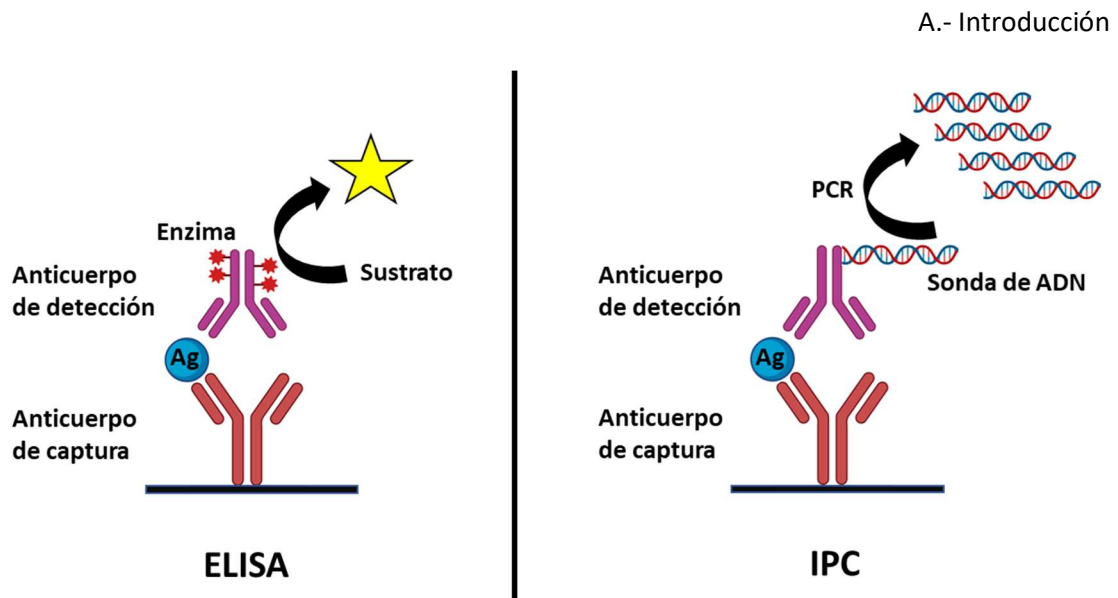


Figura 21. Esquema general de ensayos de ELISA e IPCR tipo sándwich. En el ELISA, una enzima unida al anticuerpo de detección convierte un sustrato en un producto detectable espectrofotométricamente. En la IPCR, se utiliza una sonda de ADN unida al anticuerpo de detección que se amplifica por PCR para la generación de señal.

El aspecto crítico de los ensayos de IPCR es el marcaje del anticuerpo de detección con el fragmento de ADN que actúa de marcador [222]. En el primer ensayo de IPCR desarrollado, que era un inmunoensayo directo, se utilizó una proteína recombinante de fusión (“quimera”), compuesta por cadenas polipeptídicas de proteína A y estreptavidina, como molécula de unión entre el anticuerpo y un fragmento de ADN biotinilado [219], gracias a la elevada afinidad de la proteína A por las inmunoglobulinas y de la estreptavidina por la biotina. De esta manera, como se puede ver en la Figura 22A, la utilización de esta proteína quimérica con afinidad bifuncional permitió, por un lado, la unión específica entre la proteína A y la región constante del anticuerpo [223] y, por el otro, la unión entre la estreptavidina y la biotina del fragmento de ADN marcador. Sin embargo, la proteína quimérica a menudo se conjuga de forma inespecífica con los anticuerpos de captura si el inmunoensayo se realiza en un formato tipo sándwich, que es el más común [221]. Por lo tanto, Zhou *et al.* [224] desarrollaron una nueva estrategia de IPCR, que denominaron IPCR “universal”, en la que el ADN marcador y el anticuerpo de detección están biotinilados y la unión entre ambos se realiza a través de una molécula de estreptavidina (Figura 22B). Esta estrategia de marcaje dio lugar al primer ensayo de IPCR comercial, y se puede aplicar a cualquier tipo de formato de inmunoensayo: directo, indirecto y

A.- Introducción

sándwich, de ahí su nombre de universal. Por ello, es la estrategia más empleada en la mayoría de las aplicaciones de la IPCR publicadas hasta la fecha [221]. Posteriormente, con el fin de hacer los ensayos más sencillo y rápidos, se desarrollaron estrategias de marcaje basadas en la unión covalente del ADN sonda a grupos amino, tiol o carboxilo, presentes en el anticuerpo de detección (Figura 22C), a través de agentes de entrecruzamiento como la etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida o la N-hidroxisuccinamida [225,226]. Sin embargo, el procedimiento de conjugación es laborioso, con bajos rendimientos y relativamente costoso, por lo que no se utiliza demasiado [227].

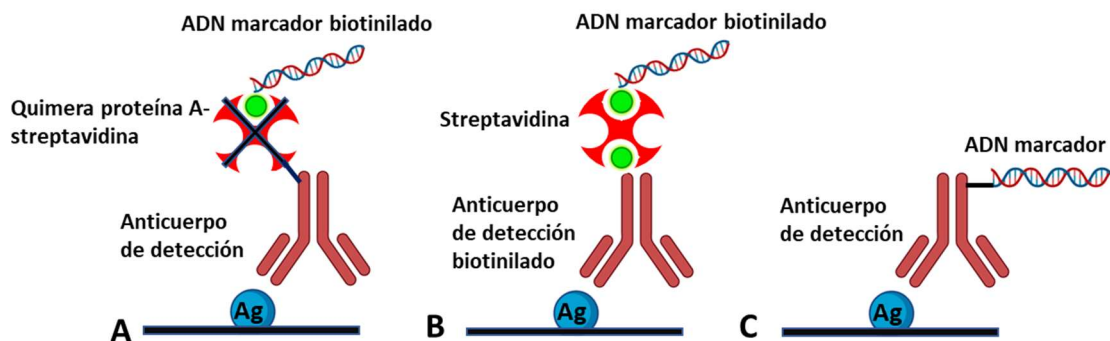


Figura 22.- Diferentes estrategias de unión entre el anticuerpo de detección y el fragmento de ADN marcador: (A) El primer formato establecido, en el que una proteína quimérica de fusión entre proteína A y estreptavidina hace de puente para la unión entre el anticuerpo y el ADN marcador biotinilado; (B) sistema universal de IPCR, en el que la estreptavidina hace de puente para la unión entre el anticuerpo biotinilado y el ADN marcador biotinilado; (C) unión covalente entre el anticuerpo y el ADN marcador utilizando agentes de entrecruzamiento.

Además de estas estrategias (ver Figura 22), se han propuesto muchos otros procedimientos de marcaje de anticuerpos con sondas de ADN, [221,222,228]. De esta manera, en la actualidad existen diversas metodologías de IPCR que difieren en versatilidad, rapidez y coste [126,229–231]. En la mayoría de ellas, la cuantificación del antígeno de interés se lleva a cabo mediante el análisis de los fragmentos de ADN amplificados utilizando la técnica de qPCR [221,222], ya comentada.

Aunque la IPCR se ha aplicado con éxito a la determinación de trazas de biomoléculas de diferente naturaleza, los antígenos diana más comunes son proteínas

que se pueden utilizar como biomarcadores tumorales [221]. Así, se han desarrollado metodologías de Inmuno-qPCR para la determinación en sangre del antígeno específico de próstata (PSA), marcador en cáncer de próstata, con un límite de detección 1000 veces inferior a un ELISA equivalente [232]; del antígeno carcinoembrionario (CEA), marcador en carcinoma colorrectal, con un límite de detección 1500 veces menor que el del correspondiente ELISA [233]; o la proteína EGFLP7 (*Epidermal Growth Factor-Like Protein 7*), marcador en cáncer de ovario, con un límite de detección 16 veces menor que el ELISA [234]. Estos son algunos de los ejemplos que ponen de manifiesto el enorme potencial de la técnica de Inmuno-qPCR para la cuantificación, de forma muy sensible y selectiva, de biomarcadores tumorales proteicos [235]; ya que combina las ventajas de los inmunoensayos y de la qPCR en una única técnica [221,222]. Ofrece, además, un mayor rango dinámico que el ELISA convencional, superando una de las limitaciones de este ensayo [220]. Las principales desventajas de la técnica de IPCR son su mayor complejidad y coste que los ensayos ELISA [221].

A.5.- Análisis de células individuales mediante ICP-MS

A.5.1.- Conceptos generales

La heterogeneidad celular es una propiedad fundamental y bien conocida de todos los sistemas celulares que implica variabilidad en la morfología, composición de los componentes celulares, u otra característica medible, entre las distintas células que componen una determinada población celular [236,237]. Es decir, en una población celular siempre están presentes variaciones célula a célula, que se manifiestan a diferentes niveles: genómico, epigenómico, transcriptómico o proteómico, entre otros, de manera que el comportamiento conjunto de la población celular no tiene por qué ser representativo del comportamiento de cada una de las células que la componen [238]. Estas diferencias entre células pueden tener origen genético y/o epigenético, o pueden producirse por estímulos, internos o externos, distintos para diferentes células de una misma población [239,240]. Además, se sabe que existen diferencias

A.- Introducción

estocásticas en la expresión génica y, por tanto, en la concentración de proteínas, entre células con el mismo genoma y sometidas a los mismos estímulos [241,242], lo que aumenta aún más la heterogeneidad entre células de una misma población.

Como ya se ha indicado anteriormente, el proceso de carcinogénesis se origina tras la acumulación de cambios genéticos y/o epigenéticos por parte de las células de un tejido. Estos cambios originan una desregulación de los procesos de crecimiento y división celular, que implica un mayor crecimiento y división de las células tumorales con respecto a las células no tumorales [5,243]. La mayor velocidad de división que poseen las células tumorales genera una mayor heterogeneidad en este tipo de células, siendo los tejidos tumorales los que mayores diferencias célula a célula presentan [244,245]. De hecho, el concepto de heterogeneidad celular se definió inicialmente para las células tumorales [246]. Esta alta heterogeneidad dificulta, en muchos casos, el diagnóstico y el tratamiento del tumor [247], ya que da lugar a diferencias significativas en la concentración intracelular de elementos y biomoléculas, como por ejemplo proteínas [248], que pueden ser utilizadas como biomarcadores tumorales para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer. De ahí la importancia de disponer de metodologías analíticas que permitan la determinación a nivel de célula individual de biomoléculas de interés en oncología (análisis de células individuales) [249,250].

En las metodologías convencionales de análisis de una muestra de células procedente de un tejido tumoral, las células se lisan o se digieren y el analito de interés (p.e. una proteína biomarcadora) se cuantifica en el lisado o digerido resultante. El resultado obtenido se normaliza al contenido celular de partida utilizando parámetros como el número de células, peso seco o la concentración proteica total, determinada previamente. Este tipo de análisis global proporciona información del contenido promedio del analito en la muestra, asumiendo el comportamiento homogéneo de todas las células de dicha muestra (Figura 23). En contraposición, el análisis de células individuales proporciona información del contenido del analito en cada una de las células de la muestra; es decir, información más completa de lo que ocurre en el tejido tumoral, ya que permite distinguir la concentración de las distintas poblaciones celulares presentes dentro del tumor (Figura 23) [251]. Por ello, en la actualidad existe

un gran interés en el desarrollo y aplicación de estrategias de análisis que permitan la cuantificación a nivel de célula individual de elementos y biomoléculas de diferente naturaleza (p.e. proteínas) [252].

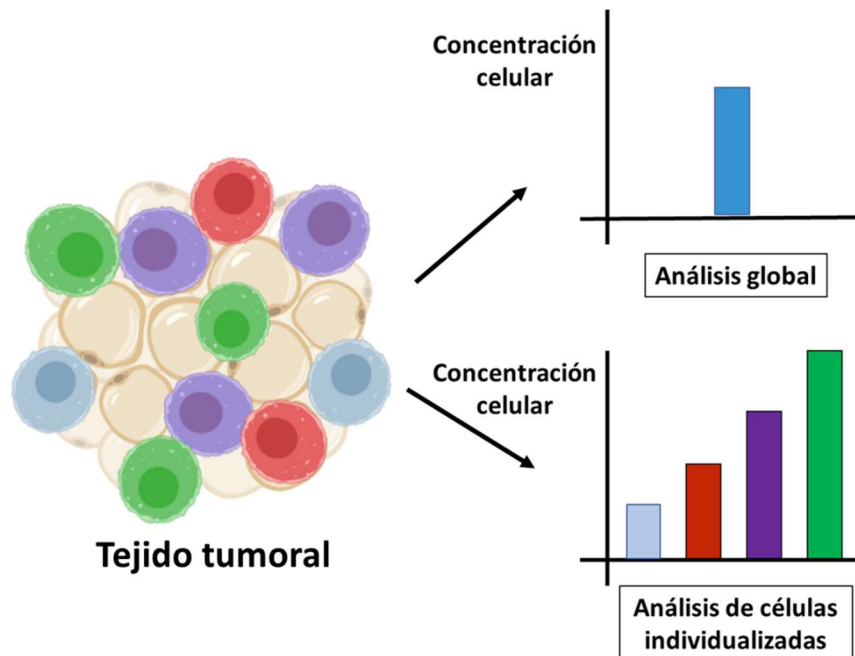


Figura 23.- Esquema del resultado de un análisis global frente al de un análisis de células individualizadas en un tejido tumoral. La información que proporciona el análisis global es una concentración celular promedio, mientras que el análisis de células individualizadas permite distinguir la concentración en las distintas poblaciones celulares presentes dentro del tumor.

Pese al interés actual por el análisis de células individualizadas, existen pocas metodologías que reúnan las características analíticas adecuadas para llevar a cabo dicho análisis. Las principales limitaciones metodológicas son: la necesidad de un proceso adecuado de preparación de la muestra que permita la individualización de las células en el momento de la medida, y la poca cantidad de analito presente en una única célula, dado su pequeño tamaño y volumen, que, además, se encuentra en una matriz muy compleja, por lo que se necesitan técnicas con elevada sensibilidad y selectividad [252–254]. En este sentido, la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) posee una elevada especificidad y sensibilidad, tanto elemental como isotópica, con límites de detección en el rango de los $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$ - $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para la mayoría de los elementos de la tabla periódica; capacidad multi-elemental y multi-

A.- Introducción

isotópica; un amplio rango dinámico lineal (6-8 órdenes de magnitud); y gran robustez, ya que la señal obtenida es prácticamente independiente de la estructura del analito y la composición de la matriz, por lo que se puede calibrar de manera sencilla con patrones elementales [255]. Estas excepcionales características analíticas hacen que el ICP-MS, que en la actualidad es la técnica más utilizada para la determinación de trazas y ultratrazas de elementos metálicos en muestras biológicas, sea también una técnica muy prometedora para el desarrollo de metodologías de análisis de células individuales [256,257].

El análisis de células individuales mediante ICP-MS (SC-ICP-MS, *single cell*-ICP-MS) se basa en el mismo principio que el análisis de partículas individuales (*single particle*-ICP-MS) [256,258]. De forma breve, en el análisis convencional mediante ICP-MS, la muestra en disolución es transformada en un aerosol líquido mediante un sistema de nebulización. Este aerosol es conducido mediante un flujo de gas portador (Ar) hasta el plasma, por el tubo central de la antorcha de cuarzo en la que se genera dicho plasma, al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo electromagnético oscilante inducido por una corriente de radiofrecuencias. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de 5000-10000 K, de manera que cuando el aerosol de la muestra llega al centro del plasma, este posee energía suficiente para provocar la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de, prácticamente, todos los componentes de la muestra. Todos aquellos elementos con un potencial de ionización menor a 15,76 eV (primer potencial de ionización del Ar) son ionizados, formándose, principalmente, iones monoatómicos y monopositivos [259,260]. Una vez generados los iones de los elementos químicos presentes en la muestra, son conducidos hacia un analizador de masas a través de una interfase de extracción, donde son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y, finalmente, llegan a un detector donde se mide su abundancia en la muestra [261]. De esta manera, cuando se determina mediante ICP-MS un analito que se distribuye de manera homogénea en la disolución de la muestra, la masa de analito que entra al plasma por unidad de tiempo es constante, por lo que produce una señal continua y estable durante todo el tiempo de medida, como se puede ver en la Figura 24A. Sin embargo, sí en lugar de una disolución homogénea del analito, se analiza una

suspensión de células lo suficientemente diluida como para que las células de la suspensión lleguen de forma individual al plasma, cada célula generará una nube o pluma de iones cuando es vaporizada, atomizada e ionizada en el plasma, por lo que la señal obtenida en el análisis mediante SC-ICP-MS es una señal transitoria de muy corta duración que se conoce como evento, o *spike*, como se muestra en la Figura 24B [256,262,263].

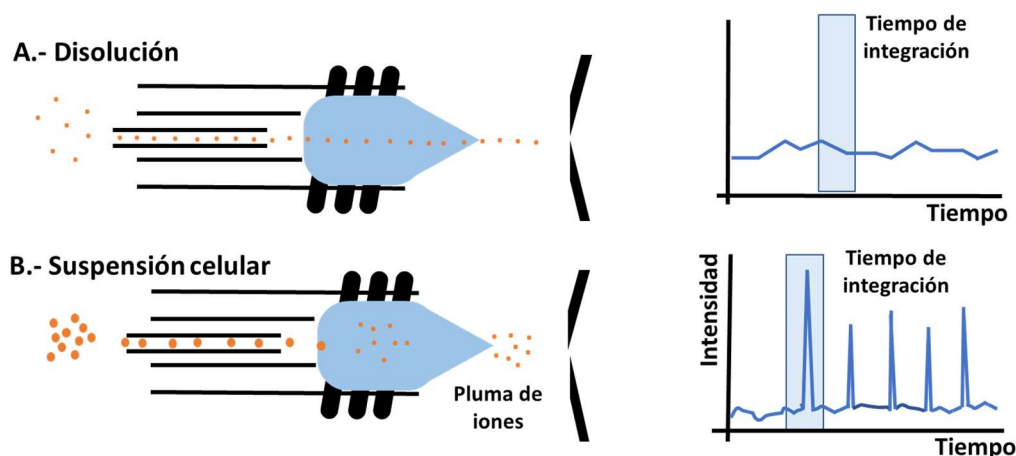


Figura 24.- Representación esquemática de la intensidad de la señal obtenida frente al tiempo para: A) el análisis mediante ICP-MS de una disolución homogénea del analito; y B) el análisis mediante SC-ICP-MS de células individualizadas de una suspensión celular.

La detección de los iones del analito en ICP-MS se realiza durante un intervalo de tiempo determinado, conocido como *dwell time* o tiempo de integración, normalmente de 100 ms. Sin embargo, en la técnica de SC-ICP-MS se generan, como acabamos de comentar (Figura 24B), nubes de iones que corresponden a células individuales, y que producen señales transitorias (eventos) de una duración de 100-500 μ s para una célula típica [262,263]. Por lo tanto, es fundamental utilizar un tiempo de integración lo suficientemente pequeño como para que cada evento registrado sea el resultado de una sola célula [264,265]. Cuando esto se consigue, la frecuencia de dichos eventos (ver Figura 24B) se corresponde directamente con el número de células presentes en la suspensión celular analizada; mientras que la intensidad de los mismos es proporcional a la masa del analito presente en la célula; y la señal del fondo se relaciona con la concentración del analito disuelto en la suspensión celular y que no forma parte de las células individuales [256,265–267].

A.- Introducción

Además de que la adquisición de la señal respecto al tiempo se debe realizar con una alta resolución temporal, debido a la corta duración de los eventos, otro aspecto crítico de la técnica de SC-ICP-MS es que, para la correcta medida de una suspensión celular, se necesita un sistema de introducción de muestras que convierta un flujo continuo de células en un aerosol de células individuales y lo transfiera al plasma, para su análisis con una alta eficiencia de transporte (porcentaje de células que llegan al plasma con respecto a las células de la suspensión). Además, las células deben permanecer intactas y sin roturas durante el proceso de nebulización y transporte, para garantizar que cada célula individual produzca una única nube de iones dentro del plasma [268]. Los sistemas de nebulización utilizados en el análisis convencional por ICP-MS están formados generalmente por nebulizadores neumáticos de tipo concéntrico donde se forma el aerosol líquido, que trabajan a flujos de alrededor de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, y cámaras de nebulización de diferentes geometrías donde se eliminan las gotas del aerosol mayores de $5\text{--}8 \mu\text{m}$. Estos sistemas poseen una eficiencia de transporte muy baja, típicamente inferior al 5% [268–270]. Para aumentar esta eficiencia de transporte y poder trabajar con volúmenes de muestra pequeños se han desarrollado micronebulizadores de alta eficiencia, acoplados a cámaras de nebulización de volumen interno reducido, que permiten el transporte total de muestras líquidas al plasma utilizando flujos de introducción de muestra en el rango de los $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta estrategia ha sido utilizada por Groombridge *et al.* [271] para diseñar el sistema de introducción de células de alta eficiencia HECIS (*High Efficiency Cell Introduction System*), que se muestra en la Figura 25. Este sistema consiste en un micronebulizador concéntrico de alta eficacia (HPCN, *High Performance Concentric Nebulizer*), de triple tubo y con un diámetro del capilar central de $110 \mu\text{m}$, que trabaja a un flujo de $0,01 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, y una cámara de nebulización de consumo total de pequeño volumen (15 cm^3), alineada con el eje del cilindro formado por la entrada del flujo del gas Ar de arrastre del nebulizador en el plasma (*on-axis*). Además, la cámara permite la introducción de un flujo de Ar adicional que ayuda a incrementar la eficiencia de transporte minimizando la deposición de células por el impacto en sus paredes.

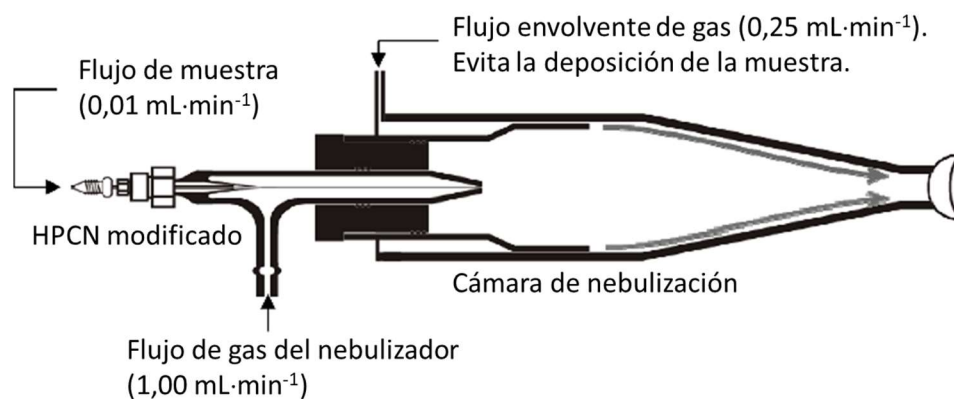


Figura 25. Diagrama del sistema HECIS para la introducción de células individuales con alta eficiencia. Figura adaptada de Groombridge et al. [271].

El sistema de introducción de células HECIS (Figura 25) se ha aplicado a la introducción de células individuales de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), con una eficiencia de transporte de un $75,0 \pm 4,7$ % [271]. Modificaciones posteriores del sistema lograron aumentar aún más la eficiencia de transporte. La empresa Perkin Elmer comercializa un sistema de introducción de muestras propio, basado en el mismo concepto [272–274]; y la empresa Glass Expansion comercializa, bajo el nombre de *High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS* [275], un sistema similar, compuesto por un nebulizador concéntrico de vidrio diseñado para mantener una alta eficiencia de nebulización a bajos flujos de introducción de muestra ($15\text{--}45 \mu\text{L min}^{-1}$) sin comprometer la integridad de las membranas y paredes celulares, y una cámara de nebulización de flujo laminar, consumo total y bajo volumen, que utiliza un flujo de Ar adicional a mayor velocidad para prevenir la deposición de las células en las paredes de la cámara, a la vez que permite un buen lavado entre muestras [258,268,275].

En cuanto a los analizadores de masas empleados en el análisis de células individuales por ICP-MS, los más comunes son: de tipo cuadrupolo (*quadrupole*, ICP-Q-MS), de doble enfoque (*double focusing*, ICP-DF-MS) y de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, ICP-TOF-MS) [257,268,276,277]. En cualquier caso, el analizador de masas separa los iones generados en el plasma de acuerdo con su relación m/z y los guía al detector. Según el tipo de analizador de masas, los iones de una determinada relación

A.- Introducción

m/z pueden ser detectados secuencialmente, como ocurre en los equipos de ICP-Q-MS e ICP-DF-MS, o cuasi-simultáneamente, como ocurre en los equipos de ICP-TOF-MS [278].

Cuando la adquisición de señales es de tipo secuencial, se necesita un cierto tiempo (*settling time*) entre la medida de dos relaciones m/z distintas. Este tiempo es prácticamente del mismo orden que el tiempo de integración necesario para la medida de las señales transitorias (eventos) generadas en el análisis de células individuales. Por lo tanto, con los equipos de ICP-Q-MS e ICP-DF-MS no es posible la determinación secuencial de varios elementos en el evento procedente de una única célula, solo es posible la monitorización de un solo elemento/isotopo en cada medida [257,277]. Por el contrario, los equipos de ICP-TOF-MS permiten la detección cuasi-simultánea, y con alta resolución temporal (en pocos μ s), del espectro de masas completo [268,279]. Esto los convierte en los equipos más adecuados para la medida multielemental de señales transitorias muy cortas, como las que se obtienen en el análisis de células individuales [280–282]. No obstante, la sensibilidad de estos equipos disminuye notablemente, hasta uno o dos órdenes de magnitud menor que en el caso de los equipos de tipo cuadrupolo o doble enfoque [283].

A.5.2.- Aplicaciones: determinación de proteínas

Hasta la fecha, la técnica de SC-ICP-MS se ha aplicado, fundamentalmente, para el desarrollo de estrategias analíticas que permiten la cuantificación de elementos metálicos y no metálicos en células individuales; tanto elementos presentes de forma natural en las células, como el K, Ca, Fe, Co, Cu, Mn, Zn, P y S, entre otros [271,284]; como elementos introducidos artificialmente en ellas mediante la incorporación celular de metalofármacos [266,273,285] o de nanopartículas metálicas [286–288].

Por otro lado, también se han desarrollado numerosas metodologías, basadas en la detección elemental mediante ICP-MS, para la determinación de biomoléculas de diferente naturaleza [289]. Esta determinación se puede realizar de manera directa si la biomolécula de interés contiene en su estructura un elemento medible por ICP-MS, es decir, un heteroelemento (elemento diferente de C, H, O y N), como puede ser un

metal en las metaloproteínas, P en el ADN, Se en selenoproteínas, etc. [266]; o de forma indirecta mediante el marcaje artificial de la biomolécula de interés con un heteroelemento [276,290]. Alternativamente, en el caso sobre todo de proteínas, la determinación indirecta se puede llevar a cabo mediante el uso de un anticuerpo específico para la proteína de interés marcado con un heteroelemento [276,290]. De esta manera, el anticuerpo reconoce la proteína en estudio de una manera específica a través de la reacción antígeno-anticuerpo, y, una vez completado el reconocimiento antígeno-anticuerpo, la detección mediante ICP-MS del heteroelemento unido al anticuerpo permite la cuantificación de la proteína en la muestra (inmunoensayos con detección por ICP-MS) [276,290,291].

Para ello, en primer lugar, es necesario el marcaje del anticuerpo con un heteroelemento, generalmente lantánidos, utilizando compuestos quelantes bifuncionales [292–294]. Estos compuestos poseen en su estructura, tal como se muestra en la Figura 26, un grupo quelante del ion lantánido separado, por un espaciador, de un grupo reactivo que permite la unión covalente al anticuerpo [295]. Esta unión se puede efectuar a través de los grupos amino primarios (-NH₂) de los aminoácidos lisina del anticuerpo, o a través de los grupos tiol (-SH) generados previamente mediante la reducción de algunos de los enlaces disulfuro que forman los aminoácidos cisteína en el anticuerpo [291]. En el primer caso, se utiliza como grupo reactivo un isotiocianato de bencilo o un éster de N-hidroxisuccinimida, y, en el segundo caso, el grupo reactivo es un grupo maleimida (ver Figura 26). En cuanto al grupo quelante, este puede ser un compuesto macrocíclico como el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) (Figura 26), o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), que forman complejos de inclusión muy estables con iones trivalentes de los lantánidos en un amplio rango de pH y de concentraciones salinas (ver Figura 26) [291]. El empleo de lantánidos como heteroelementos es debido a que se pueden medir por ICP-MS con gran sensibilidad, como consecuencia de la elevada eficiencia de ionización, al poseer un primer potencial de ionización bajo, y a su baja abundancia en la naturaleza, que hace que la señal del fondo en las muestras biológicas donde no están presentes sea muy baja lo que incrementa la relación señal/ruido [296]. Además, los quince elementos lantánidos proporcionan al menos 37

A.- Introducción

isótopos con diferentes masas, lo que permite el diseño de metodologías para la determinación simultánea de varias proteínas diferentes utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas marcados con diferentes lantánido o sus isótopos [257].

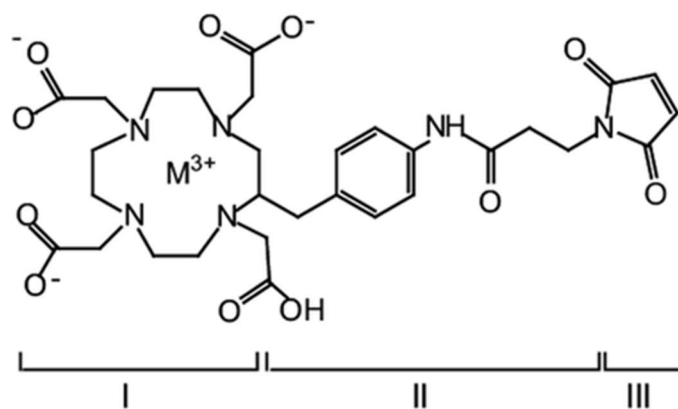


Figura 26.- Estructura de un compuesto quelante bifuncional utilizado para el marcaje elemental de anticuerpos. Está formado por el compuesto macrocíclico DOTA (I), que forma complejos de inclusión con iones metálicos trivalentes (M^{3+}) de lantánidos y un grupo maleimida (III) para la unión a los grupos tiol del anticuerpo, ambos conectados por un espaciador (II).

Los reactivos de marcaje que acabamos de comentar, quelantes bifuncionales, contienen solo un grupo quelante, DTPA o DOTA (DOTA monómero, Figura 27A), para formar complejos con los iones lantánidos, por lo que, dependiendo de la estequiometría de su unión al anticuerpo, se añaden entre 1 y 4 iones detectables por ICP-MS [295], como se puede ver en la Figura 27C. Por tanto, la sensibilidad de la detección mediante ICP-MS utilizando estos reactivos de marcaje puede no ser suficiente para la determinación de proteínas en muy baja concentración, como ocurre en el análisis a nivel de célula individual. Por ello, se han desarrollado nuevos reactivos de marcaje como el MAXPAR® [297], con una estructura polimérica que contiene muchos grupos DTPA quelantes de lantánidos, y un grupo reactivo maleimida para su unión a los grupos tiol del anticuerpo, como se muestra en la Figura 27B. De esta manera, cuando se marca el anticuerpo con este reactivo se añade un gran número de iones detectables por ICP-MS (Figura 27D), que depende de nuevo de la estequiometría de la unión al anticuerpo [295]. Se han propuesto estequiometrías de unión de hasta 4 marcas poliméricas por anticuerpo, que implican la presencia de unos

30 iones metálicos por molécula de anticuerpo, aumentando significativamente la sensibilidad de la medida por ICP-MS y permitiendo su aplicación al análisis de células individuales [289].

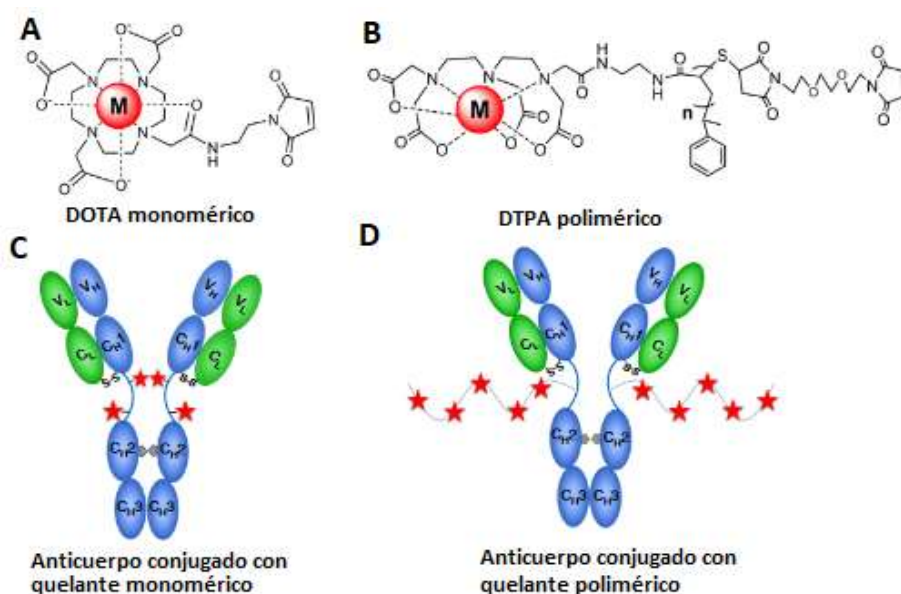


Figura 27.- Compuestos quelantes bifuncionales y su unión a los anticuerpos. Dos tipos de quelantes bifuncionales: DOTA monomérico (A) y DTPA polimérico (B). Anticuerpo conjugado con el quelante DOTA monomérico (C) y anticuerpo conjugado con el quelante DTPA polimérico (C). Fotografía modificada de Han et al. [295].

En este sentido, la estrategia de marcaje de anticuerpos con MAXPAR® ha sido utilizada para la puesta a punto de una metodología de SC-ICP-MS para cuantificar los niveles del receptor de la transferrina tipo 1 (TfR1, *Transferrin Receptor 1*), presente en la membrana celular, en células individuales de líneas celulares de cáncer de mama de diferente malignidad (MCF-7 y MDA-MB-231) [289]. Para ello se utilizó un anticuerpo específico anti-TfR1, que se marcó con el quelante polimérico MAXPAR® formando complejos con $^{142}\text{Nd}^{3+}$. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el número de receptores por célula era significativamente más alto en el fenotipo celular con mayor malignidad (MDA-MB-231) [289].

Además, el empleo de la estrategia de marcaje de anticuerpos con MAXPAR®, junto con la capacidad ya comentada de los equipos de ICP-TOF-MS de determinación multielemental a nivel de célula individual, ha dado lugar al desarrollo de una técnica

A.- Introducción

conocida como citometría de masas (comercialmente CyTOF) [263]. Esta técnica, similar a la citometría de flujo, utiliza anticuerpos marcados con MAXPAR® formando complejos con diferentes isótopos de los lantánidos y detección mediante ICP-TOF-MS, en lugar de anticuerpos marcados con fluoróforos para el reconocimiento de proteínas y detección fluorescente [298]. El empleo de fluoróforos para el marcaje en citometría de flujo limita el análisis simultáneo a unas 10 proteínas, debido al número de fluoróforos diferentes disponibles en el mercado y al solapamiento espectral entre las señales fluorescentes de los diferentes fluoróforos utilizados [298]. Al sustituir el marcaje fluorescente de los anticuerpos utilizados en citometría de flujo por el marcaje elemental utilizado en citometría de masas, se puede realizar el análisis de hasta 40 proteínas diferentes de forma simultánea en una misma célula [299,300].

Como se muestra esquemáticamente en la Figura 28, la técnica de citometría de masas se basa, como se muestra esquemáticamente en la Figura 28, en la incubación de las células en estudio con anticuerpos específicos de las proteínas de interés marcados con isótopos de lantánidos mediante el reactivo MAXPAR®. Los anticuerpos marcados reconocen y se unen a las proteínas diana presentes en la superficie celular [254,295]. Además, las células también pueden incubarse con moléculas, que contienen elementos como el Rh o Ir, capaces de entrar en la célula e intercalarse en el ADN, para confirmar la detección de eventos celulares y obtener información del contenido en ADN [301], o con cisplatino [302]. Después de la incubación, las células en suspensión son introducidas en el plasma en forma de aerosol (Figura 28). Las nubes iónicas formadas se transfieren al analizador de masas de tiempo de vuelo, que permite la medida cuasi-simultánea de los diferentes isótopos utilizados como marcas en las señales transitorias (eventos) que genera cada célula [303].

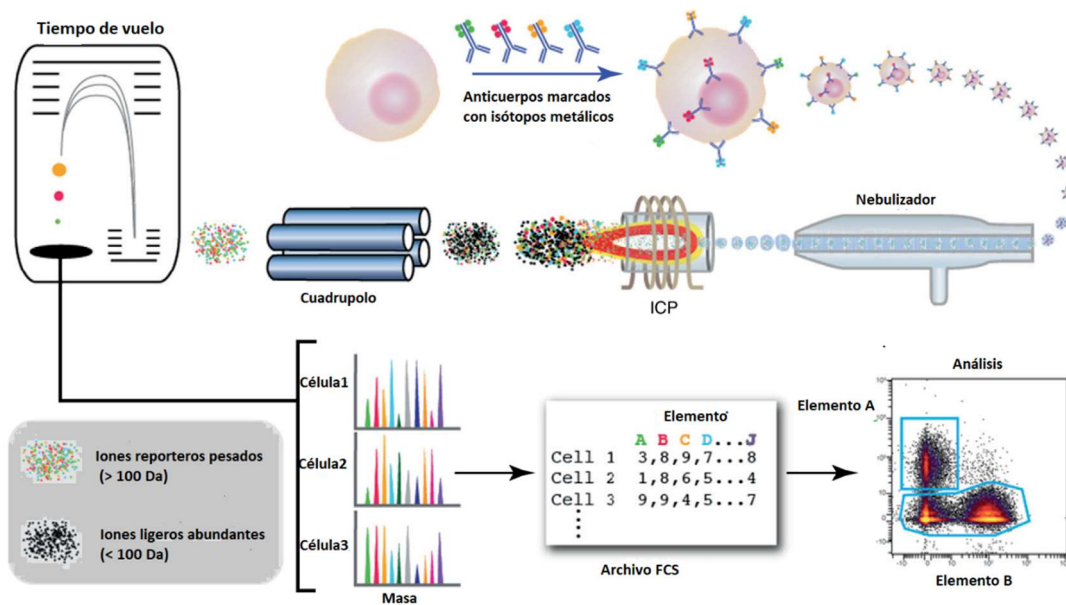


Figura 28.- Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al. [303].

Para separar los iones de los lantánidos (procedentes del marcaje) de los iones de otros elementos mucho más abundantes, presentes de forma natural en las células, el equipo utilizado en citometría de masas (CyTOF) dispone de un cuadrupolo, previo al analizador de masas de tiempo de vuelo, que actúa como un filtro de masas (ver Figura 28). De esta manera, el cuádruplo solo permite a los iones elementales más pesados, que son los de los lantánidos, pasar al analizador de tiempo de vuelo, donde se separan y luego se detectan los iones con m/z entre 80 y 200 [303].

La citometría de masas se ha utilizado ampliamente en numerosos campos, desde la investigación básica hasta áreas clínicas y farmacéuticas, incluida la inmunofenotipificación, inmunología, oncología y búsqueda de nuevos biomarcadores, entre otras [254,301,303].

B.- Objetivos

El cáncer sigue siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial, debido en parte a las dificultades asociadas con la prevención, el diagnóstico precoz y el tratamiento de los diferentes tipos de tumores. Existen una serie de moléculas biológicas, denominadas biomarcadores tumorales, que pueden ser de utilidad para la detección temprana de un determinado cáncer y su pronóstico, la elección de un tratamiento acorde a las características del tumor, y el seguimiento tanto de la enfermedad como del tratamiento escogido. Sin embargo, su utilidad en la práctica clínica está supeditada, entre otros factores, a la disponibilidad de metodologías analíticas adecuadas para su determinación en las muestras biológicas de interés. Dos de los biomarcadores más relevantes en cáncer, especialmente en el cáncer de mama, son las variaciones en el número de copias de ciertos genes, CNVs (Copy Number Variations), y los niveles del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2, HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2). Existen diversas metodologías que permiten la determinación de estos biomarcadores, cada una de ellas con sus ventajas y sus limitaciones. Sin embargo, la principal desventaja de todas ellas es la carencia de capacidad de cuantificación con exactitud y/o precisión.

Por ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral consiste en *el desarrollo de nuevas estrategias analíticas, basadas en el empleo de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que permitan la cuantificación en muestras biológicas de biomarcadores tumorales de interés en clínica, como son las CNVs de determinados genes y los niveles de la proteína HER2.*

Este objetivo general se puede dividir en varios objetivos parciales, enunciados a continuación, que se presentan de forma individual en cada uno de los capítulos de la presente Tesis Doctoral:

1. Desarrollo de una metodología analítica que permita la determinación tanto de CNVs como de variaciones en la expresión génica, de varios genes de forma simultánea, y su aplicación al análisis de células tumorales humanas en cultivo. Este objetivo se llevó a cabo combinando la amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en su modalidad múltiple, con la cuantificación de los productos obtenidos (amplicones) mediante

B.- Objetivos

electroforesis en gel acoplada en línea al ICP-MS (monitorizando la señal de fosforo presente de forma constitutiva en el ADN). La aplicabilidad de la metodología desarrollada se evaluó mediante la determinación de CNVs de varios genes (*GSTM1*, *CCNE1* y *HER2*) relacionados con procesos tumorales en líneas celulares de cáncer de ovario (A2780 y OVCAR-3); así como la determinación de cambios en la expresión génica de genes (*BAX*, *CTR1*, *ERCC1*) relacionados con la resistencia al fármaco antitumoral cisplatino, en líneas celulares sensibles (A2780) y resistentes (A2780cis) al mismo.

2. Puesta a punto de una nueva metodología analítica para la cuantificación altamente sensible de los niveles de la proteína HER2 en fluidos biológicos. Para ello, se utilizó la técnica de inmuno-PCR, que combina la especificidad de los inmunoensayos con el poder de amplificación de la PCR, mediante el empleo de anticuerpos marcados con un fragmento de ADN (ADN marcador) que se amplifica mediante PCR tras el inmunoensayo. La cuantificación del producto de PCR obtenido por ICP-MS, monitorizando el fósforo presente en el mismo, permite la determinación de la concentración de la proteína reconocida en el inmunoensayo. La metodología desarrollada se aplicó a la determinación de HER2 en suero humano y en el sobrenadante del cultivo de células humanas de cáncer de mama (MDA-MB-231).
3. Desarrollo de una estrategia analítica que permitió estudiar los niveles de la proteína HER2, a nivel de célula individual, en células tumorales humanas. Este objetivo se llevó a cabo mediante el reconocimiento específico de HER2 en las células tumorales en estudio con anticuerpos marcados con un isótopo metálico (^{175}Lu), y el posterior análisis de estas células de forma individual mediante ICP-MS (*single-cell-ICP-MS*) monitorizando la señal del isótopo ^{175}Lu . Esta metodología se aplicó al análisis de líneas celulares de cáncer de mama con distinto nivel de la proteína HER2 (SKBR-3, MDA-MB-231, BT-474 y MCF-7). Además, se estudió la selectividad de la metodología desarrollada utilizando para el reconocimiento dos anticuerpos diferentes, uno para HER2 (marcado con ^{175}Lu) y otro para el receptor de transferrina humana tipo 1 (marcado con ^{142}Nd), dentro de la misma población celular. Finalmente, se evaluó el potencial de la metodología propuesta para

discriminar células positivas para HER2 dentro de una población mixta de células con diferentes niveles de la proteína.

C.-Experimental

En el presente apartado se hace una descripción general de los equipos y materiales utilizados para la realización de la presente Tesis Doctoral, así como de los reactivos y disoluciones empleados. Además, se describen las diferentes líneas celulares utilizadas, y las características que llevaron a su elección. Por último, se exponen y detallan los procedimientos experimentales más generales llevados a cabo. El resto de los procedimientos experimentales se detallan en el apartado correspondiente de Resultados y Discusión.

C.1.- Instrumentación

C.1.1.-Equipos de ICP-MS

Se utilizaron dos equipos de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS): un ICP-MS con un analizador de masas de doble enfoque (modelo Thermo Element II), y otro ICP-MS con un analizador de masas de triple cuadrupolo (modelo Thermo iCAP-TQ). En ambos equipos es posible la eliminación de las interferencias espectrales causadas por iones atómicos y poliatómicos con los mismos valores de m/z que el ion del elemento de interés (analito). Por ejemplo, en el caso del fósforo, elemento monoisotópico (^{31}P) afectado por numerosas interferencias poliatómicas: $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$, $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$ y $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ [304], que fue el elemento mayoritariamente medido mediante ICP-MS en esta Tesis, especialmente en los dos primeros capítulos.

- **ICP-MS de doble enfoque, modelo Thermo Element II** (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania). Este equipo está provisto de un nebulizador concéntrico convencional insertado en una cámara de nebulización de doble paso, tipo Scott de Pyrex, sin refrigeración, y una antorcha de cuarzo tipo Fassel, con un canal central de 1 mm de diámetro interno. Los conos de la interfase de extracción, *sampler* y *skimmer*, son de níquel y presentan unos orificios centrales de 1 mm y 0,5 mm de diámetro, respectivamente [305]. El analizador de masas es de doble enfoque y el detector es un multiplicador de iones secundarios (SEM, *Secondary Electron Multiplier*), que funciona en modo analógico o digital dependiendo de la intensidad de la señal.

C.- Experimental

En un analizador de masas de doble enfoque, la separación de los iones tiene lugar gracias al empleo de dos campos, uno magnético perpendicular a la trayectoria de los iones (sector magnético), que los separa en función de su relación m/z , y otro electrostático (sector electrostático), que los separa en función de su energía cinética [261]. En el equipo Thermo Element II, en concreto, el sector magnético se sitúa antes que el sector electrostático (geometría Nier-Johnson inversa) (ver Figura 29), de manera que los iones procedentes de la interfase de extracción son enfocados al sector magnético del analizador de masas a través de rendija de entrada de apertura variable. De esta forma, manteniendo fijo el voltaje y variando el campo magnético, los iones siguen trayectorias diferentes y se separan según su relación m/z . Una rendija de salida, situada tras el sector electrostático, donde se aplica un potencial de corriente continua que permite diferenciar entre aquellos iones que presentan la misma m/z pero distinta energía cinética, selecciona los iones de m/z específica que pasan al detector.

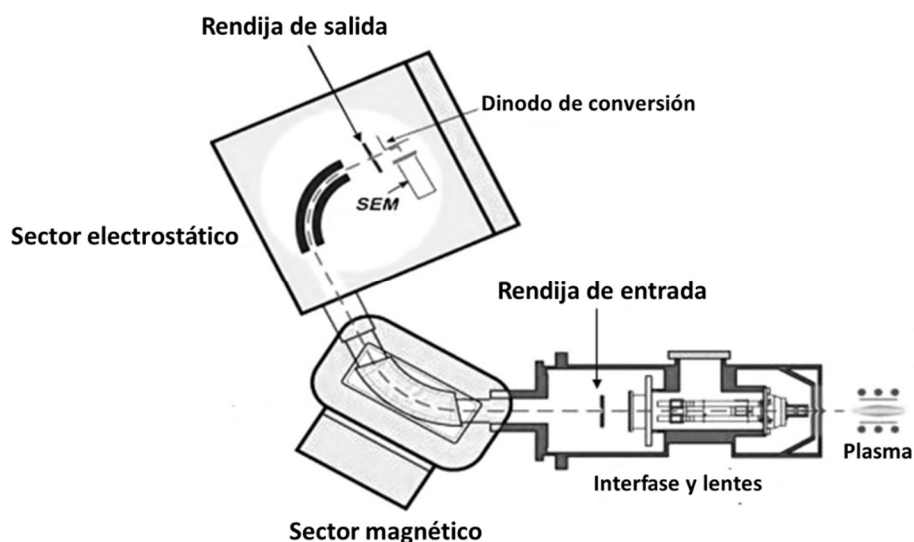


Figura 29.- Esquema de un equipo de ICP-MS Thermo Element II. Modificada de Jakubowski et al. [306].

El poder de resolución (R) de este equipo; es decir, su capacidad para separar iones con relación m/z muy similar, se puede cambiar controlando la apertura de las rendijas de entrada y salida. Así, se puede trabajar en tres tipos de resolución: baja ($R=300$), media ($R=4000$) y alta ($R=10000$). Es importante destacar que una mayor

resolución se consigue con una menor apertura de las rendijas, por lo que va acompañada de una disminución en la sensibilidad. El modo de resolución media resulta suficiente para minimizar las interferencias poliatómicas que interfieren en la medida del ^{31}P sin comprometer la sensibilidad del equipo.

- **ICP-MS de triple cuadrupolo, modelo Thermo iCAP-TQ** (Thermo Fisher Scientific). Este equipo dispone de un nebulizador de vidrio concéntrico MicroMist, de ESI Elemental Service & Instruments GmbH (Maguncia, Alemania), y una cámara de nebulización de cuarzo de geometría ciclónica, refrigerada por efecto Peltier (ESI Elemental Service & Instruments GmbH) [307]. La antorcha es de cuarzo y el *sampler* y el *skimmer* son de níquel, con orificios de entrada y de salida de 1,1 y 0,5 mm, respectivamente [307]. El analizador de masas es de triple cuadrupolo y el detector es también de tipo SEM [307]. Para las medidas de células individuales (*single cell*-ICP-MS) se utilizó el sistema de introducción de muestras *Single Cell Sample Introduction System* (SC-SIS) de Glass Expansion (Melbourne, Australia), formado por un nebulizador de alta eficiencia y una cámara de nebulización de consumo total, con un flujo envolvente adicional de argón para evitar la deposición de células en las paredes de la cámara. Las suspensiones de células se introducen en el nebulizador con una bomba de jeringa de microflujos SP101i (Florida, Estados Unidos), empleando una jeringuilla Hamilton de 1 mL (Nevada, Estados Unidos) a un flujo de $10\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

El analizador de masas de triple cuadrupolo consta de dos cuadrupolos (Q1 y Q3), separados por una celda de reacción/colisión (CRC, *collision/reaction cell*, Q2), que se puede presurizar con distintos gases con el fin de convertir una interferencia poliatómica en otra especie no interferente, o el propio analito en un ion que no esté afectado por interferencias [261]. El analizador se puede utilizar en modo de cuadrupolo simple o de triple cuadrupolo. En el primer caso, Q1 se utiliza simplemente para guiar todos los iones hacia la CRC, presurizada o no con un gas, y Q3 se utiliza para seleccionar la m/z que llega al detector. En el segundo caso, tanto Q1 como Q3 actúan como filtros de masas y pueden fijarse para seleccionar la misma m/z , si los iones interferentes reaccionan con el gas de la celda (*on-mass approach*), o para seleccionar m/z diferentes, si son los iones del analito los que reaccionan con el gas de la celda (*mass-shift approach*). En este último modo, sólo el analito y sus interferencias

C.- Experimental

entran en la celda, donde el analito reacciona con el gas formando un nuevo ion producto cuya m/z se selecciona en el Q3. Las interferencias de este ion producto se eliminan previamente en el Q1. Con este modo se puede medir el $^{31}\text{P}^+$, utilizando O_2 como gas de reacción en la CRC, como se muestra en la Figura 30, de forma que se generan iones $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ con una relación m/z de 47. De esta manera se filtra en Q1 la m/z 31, correspondiente al ion $^{31}\text{P}^+$, y se filtra en Q3 la m/z 47, correspondiente al ion $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$.

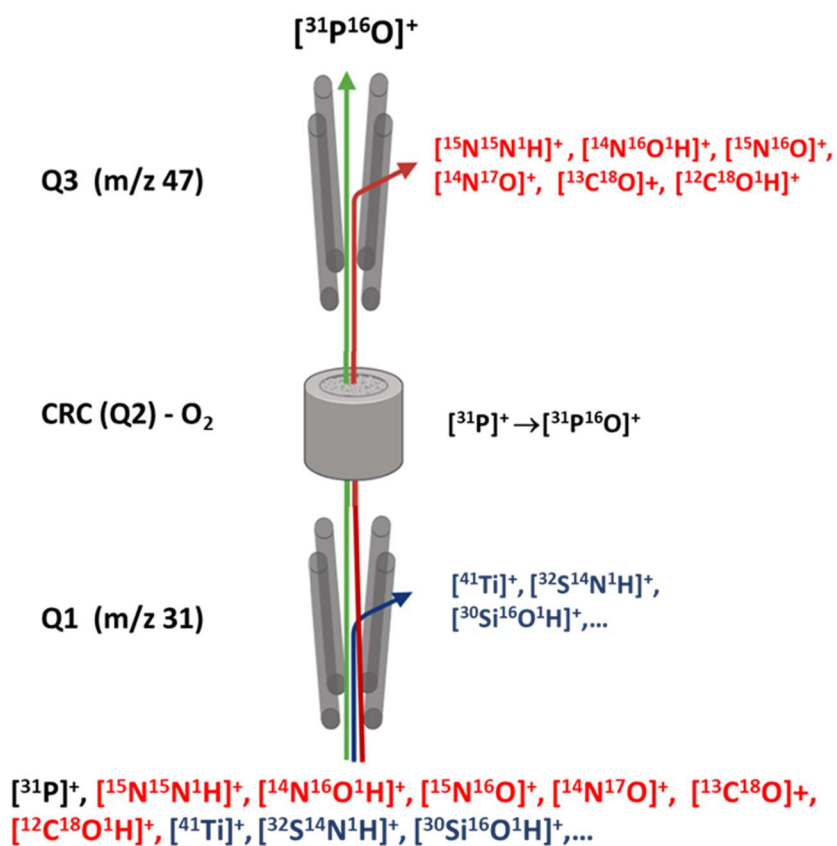


Figura 30.- Esquema de la medida de ^{31}P mediante ICP-MS con un analizador de masas de triple cuadrupolo, utilizando oxígeno como gas de reacción.

C.1.2.-Equipos de HPLC

Se utilizaron los siguientes equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*).

- **Equipo de HPLC** compuesto por dos bombas de doble pistón, modelo Shimadzu LC-20AD (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón), y una válvula de inyección modelo Rheodyne 3125 (Rheodyne, Cotati, CA, EE.UU.), con bucles de inyección de polietere tercetona (PEEK) de 20 y 100 μ L de capacidad.
- **Equipo de HPLC-UV-VIS, modelo Agilent 1100 series convencional** (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), formado por una bomba cuaternaria de doble pistón, un desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostatación de las columnas cromatográficas y un detector de diodos (DAD, *Diode-Array Detector*) UV-VIS, con lámparas de deuterio y wolframio con un rango de longitudes de onda de 190 a 950 nm.
- **Equipo de HPLC-UV-VIS, modelo Agilent 1260 series convencional** (Agilent Technologies), compuesto por una bomba binaria, un desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostatación de las columnas de cromatografía y un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable (VWD, *Variable Wavelength Detector*), con un rango de longitudes de onda de 190 a 640 nm.

El acoplamiento de estos equipos cromatográficos con los espectrómetros de ICP-MS como sistemas de detección se realizó de forma directa, mediante un tubo de PEEK que une la salida de la columna cromatográfica, o la salida del detector UV-VI, con la entrada del nebulizador del ICP-MS. El tubo tiene una longitud y un diámetro interno lo más pequeño posible para evitar volúmenes muertos y, por tanto, el ensanchamiento de los picos cromatográficos.

C.1.3.- Sistema de GE-ICP-MS

El sistema de electroforesis en gel (GE, *Gel Electrophoresis*) acoplado en línea a la detección mediante ICP-MS (GE-ICP-MS), consta de un dispositivo de electroforesis

C.- Experimental

en gel cilíndrico, modelo Mini Prep Cell, de Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, EE.UU.), que opera en vertical y de forma continua. Este modo de operación permite la recogida inmediata de los analitos tras su separación, sin necesidad de pasos adicionales de extracción y eliminación del gel, así como su transporte hacia un sistema de detección en continuo, en este caso, un ICP-MS. En la Figura 31 se muestra una foto general del sistema Mini Prep Cell, con sus distintas partes. Como se puede observar, está formado por dos cámaras acrílicas, una superior y otra inferior, que se llenan con el tampón de electroforesis; una zona de elución sobre la que se apoya el tubo de vidrio que contiene el gel en el que se produce la separación; y dos electrodos de platino situados en la cámara superior que, al conectarse a una fuente de alimentación Power Pac (Bio-Rad, Laboratories), generan una diferencia de potencial entre las dos cámaras del sistema y, por consiguiente, un campo eléctrico que permite la separación de los analitos.

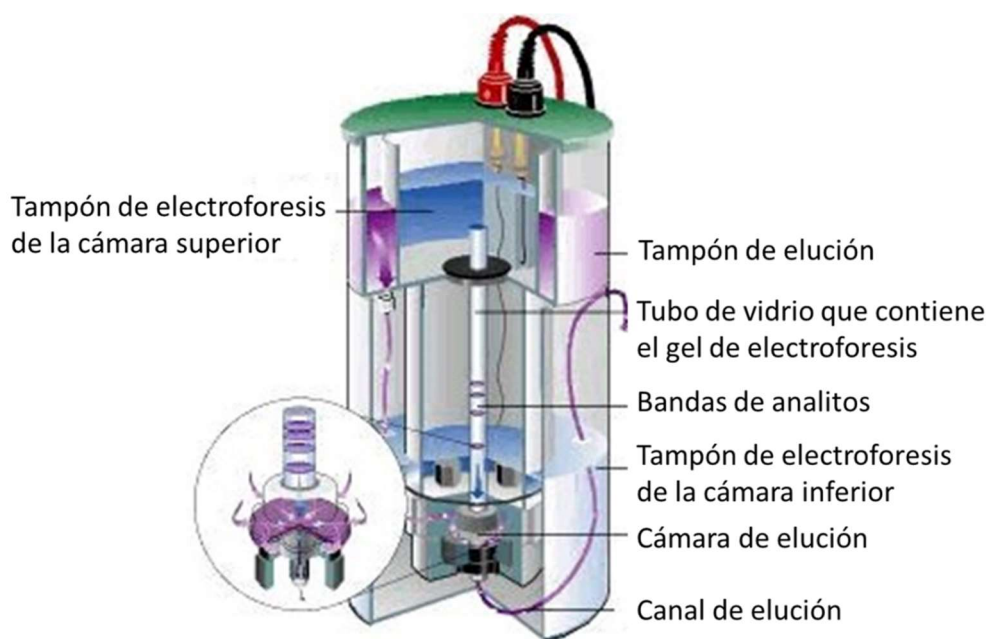


Figura 31.- Sistema de electroforesis en gel (GE) MiniPrep de Bio-Rad, con detalle de la cámara de elución. Foto modificada de Bio-Rad.

La cámara superior se divide a su vez en dos compartimentos (ver Figura 31), uno exterior, en el que se sitúa el tampón de elución, y otro interior, dónde se sitúa el tampón de electroforesis, cuyo volumen debe de ser suficiente (unos 100 mL) para

cubrir por completo el tubo que contiene el gel. En la cámara inferior se debe añadir tampón de electroforesis en un volumen de unos 400 mL (hasta cubrir el electrodo inferior).

El gel de separación está embebido en un tubo de vidrio de 130 mm de longitud, 2,2 mm de diámetro interno y 9 mm de diámetro externo, que se coloca sobre la zona de elución gracias a una junta de goma, y se integra con el resto de los componentes de dicha zona gracias al ajuste con tres tornillos. La cámara de elución, que se muestra en la Figura 32, está formada por dos discos de metacrilato, uno fijo que contiene los tornillos, y otro móvil, sobre el que se colocan las membranas de elución y de diálisis, y al que se fijan los tornillos del disco superior. El disco inferior se conecta con el compartimento exterior de la cámara superior a través de un tubo de goma de 5mm de diámetro (tubo de tampón de elución), de forma que el tampón de elución se transporta por este tubo desde el compartimento superior a la salida del tubo que contiene el gel de separación.

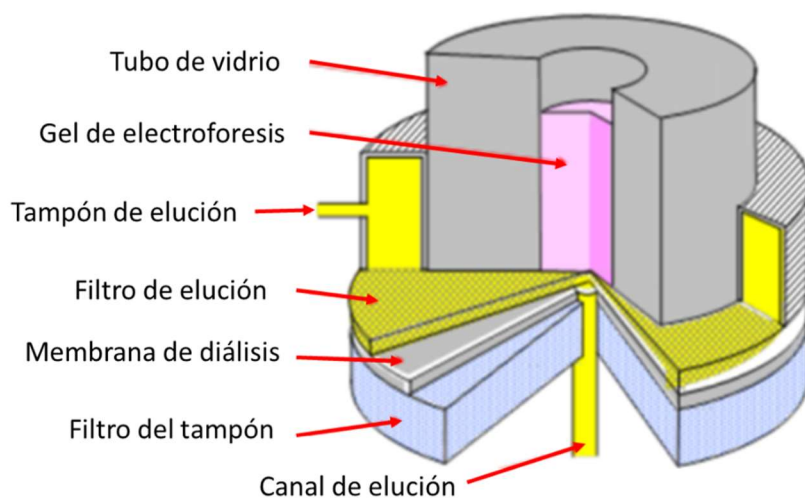


Figura 32.- Zona de elución del sistema GE-MiniPrep de Bio-rad.

En la zona de elución (Figura 32), el tampón de elución entra en contacto con los analitos separados procedentes del gel de separación y los arrastra hacia el sistema de detección, en este caso, el ICP-MS. Así, tras salir del gel, los analitos son transportados por el tampón de elución y obligados a atravesar el filtro de elución (Figura 32). Una membrana de diálisis situada a continuación impide que los analitos

C.- Experimental

migren hacia la cámara inferior, pero permite el paso de los iones del tampón para mantener así el flujo de corriente eléctrica. Una vez pasan el filtro de elución, Los analitos son transportados al sistema de detección (ICP-MS), a través de un tubo de 1 mm de diámetro interno (canal de elución).

La muestra en la que se quieren separar analitos mediante la electroforesis se coloca manualmente en la parte superior del gel (ver Figura 31), utilizando una jeringa Sterican (Braun, VetVare, España) acoplada a una micropipeta.

Para la detección se utilizó el equipo de ICP-MS de doble enfoque (Thermo Element II), que se acopla al sistema de GE MiniPrep a través de un tubo de goma inerte, que conecta el tubo del nebulizador del ICP-MS con el canal de elución del sistema de GE. Los analitos eluidos se impulsan a través de dicho tubo con la ayuda de una bomba peristáltica que trabaja a un flujo de $700 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

C.1.4.- Instrumentación complementaria

- **Espectrofotómetro Nanodrop 2000c**, de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.) utilizado para la cuantificación y determinación de la pureza de muestras de ADN, ARN y proteínas. Este espectrofotómetro mide en un rango de longitudes de onda de 220 a 750 nm, y utiliza una membrana como sistema de depósito de la muestra, que queda retenida en la membrana por tensión superficial, lo que evita el uso de las cubetas convencionales. En un ensayo típico, un volumen de muestra de entre 0,5 y 2 μL de se deposita sobre la membrana, que es la parte final de una fibra óptica por donde llega la radiación de la fuente. Un segundo cable de fibra óptica entra en contacto con la muestra, que actúa como puente uniendo los extremos de las dos fibras. Esta segunda fibra transporta la radiación transmitida por la muestra hacia el detector. Como fuente de radiación se utiliza una lámpara pulsada de Xenon y como detector un *array* CCD (*charge-coupled device*) linear. La información es recogida y procesada por el software del equipo.

- **Termociclador, modelo Sure Cycler 880**, de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EE.UU.). Permite el control automatizado de la temperatura de las distintas etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Incluye la posibilidad de realizar gradientes de temperatura, para estudiar el funcionamiento óptimo de los cebadores.
- **Equipo de PCR a tiempo real 900HT Fast Real-Time PCR System**, de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.). Permite el control automatizado de la temperatura, así como la determinación a tiempo real de la fluorescencia emitida por sondas de ADN fluorescentes. Se utiliza para la realización de reacciones en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativas. Disponible en los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.
- **Citómetro de flujo, modelo Cytoflex S**, de Beckman Coulter (California, EE.UU.). Permite la cuantificación del número de células presentes en una disolución, gracias a la dispersión de un haz de luz precedente de un láser. Disponible en los SCTs de la Universidad de Oviedo.
- **Fluorímetro Qubit 2.0**, de Thermo-Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.). Permite la cuantificación del ADN presente en una disolución, mediante la medida de la fluorescencia generada por un agente intercalante fluorescente. Disponible en los SCTs de la Universidad de Oviedo
- **Equipo de visualización de electroforesis Gene Flash**, de Syngene (Scientific Digital Imaging, Reino Unido). Permite la visualización de geles de electroforesis teñidos con agentes intercalantes fluorescentes, mediante el empleo de luz UV en una cámara oscura.
- **Sistema de electroforesis en gel horizontal Sub-Cell GT**, de Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.). Permite la separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.
- **Fuente de alimentación modelo ST304**, de APELEX (Lisses, Francia) y **modelo Power Pac Basic Power Supply**, de Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.).

C.- Experimental

- **Lector de microplacas Varioskan Flash**, de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.), y **lector de microplacas Bio-Tek ELx800**, de Winoski (Vermont, EE.UU.). Permiten la medida de absorbancia en placas de 96 pocillos.
- **Válvula de seis vías Rheodyne, modelo 9725** (Cotati, California, EE.UU.), equipada con un bucle de 20 μ L para los análisis por inyección de flujo (FIA, Flow Injection Analysis).
- **Balanza analítica, modelo XB 220 A**, de Precisa (Dietikon, Suiza).
- **Agitador vortex, modelo zx3**, de VELP Scientifica (Usmate, Italia).
- **Autoclave, modelo Autester-P**, de J.P. Selecta (Barcelona, España). Permite la esterilización de material de plástico de laboratorio.
- **Estufa modelo 200**, de J.P. Selecta (Barcelona, España).
- **Baño de ultrasonidos, modelo Ultrasons 3000514**, de J. P. Selecta (Barcelona, España).
- **Centrífugas, modelo Heraeus y modelo Sorvall**, de Biofuge Stratos (Hanau, Alemania)
- **Microcentrífuga Eppendorf®, modelo MiniSpin Plus®**, de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).
- **Termobloque, modelo Thermomixer C**, de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Permite la incubación de muestras, en tubos *eppendorf* de distinto volumen, a diferentes temperaturas, con o sin agitación.
- **Destilador de ácidos, modelo DST-1000**, de Savillex (Paris, Francia) para destilación lenta de ácidos “*sub-boiling*”.
- **Sistemas generadores de agua ultrapura, modelo PURELAB flex 3**, de ELGA VEOLIA (Lane End, Reino Unido) y **modelo Advantage A10**, de Millipore Co (Bedford, MA, EE.UU.), acoplado a un equipo ELIX 3.
- **Placa calefactora, modelo RCT basic**, de IKA® (Staufen, Alemania), con agitador magnético y con sonda digital acoplada para el control de la temperatura, **modelo ETS-D4 fuzzy** de IKA.
- **Baño de agua termostatzado con control digital, modelo Digiterm 100**, de J.P. Selecta (Barcelona, España).

- **pH-metros, modelo micro-pH2000**, de Crison Instruments S.A. (Barcelona, España), y **modelo Sension+ pH3**, de Hach (Loveland, Colorado, EE.UU.).
- **Concentrador centrífugo equipado con una bomba de vacío, modelo Concentrator 5301**, de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

C.2.- Reactivos y disoluciones

A continuación, se enumeran los materiales y reactivos utilizados, así como las disoluciones preparadas a partir de ellos. Los reactivos utilizados de forma general fueron los siguientes:

- **Agua ultrapura** ($> 18 \text{ M}\Omega$) obtenida con los sistemas mencionados en el apartado anterior. Se utilizó para la preparación de todas las disoluciones y el lavado de todo el material.
- **Ácido nítrico de alta pureza**, obtenido a partir de ácido nítrico concentrado al 65 % (p/v), de calidad pro-análisis (Merck, Darmstadt, Alemania), mediante destilación lenta por debajo del punto de ebullición.
- **Reactivos de grado analítico** para la preparación de las fases móviles utilizadas en las diferentes separaciones cromatográficas: acetato amónico (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.), hidróxido sódico (Sigma-Aldrich, San Luis, EE.UU.).
- **Disolución tampón de fosfato salino (PBS) pH 7,4** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Disolución tampón de Tris salino (TBS) pH 7** preparada a partir de Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride solution de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).
- **Gases: Ar y O₂ (99,999% de pureza)**, suministrados por Air Liquide (Madrid, España).

Para el cultivo de las distintas células, así como su recolección, se utilizaron los siguientes medios, reactivos y fungible plástico:

C.- Experimental

- **Medio RPMI 1640** (Roswell Park Memorial Institute Medium) con L- glutamina y 25 mM de HEPES de Gibco (Thermo Fisher Scientific), y **medio DMEM®** (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Labclinics (Barcelona, España).
- **Plasmocin profiláctico** de InvivoGen (San Diego, EE.UU.). Solución antibiótica y antimicoplásmica.
- **Suero fetal bovino** de Gibco (Thermo Fisher Scientific).
- **Tripsina-EDTA 10x** de LabClinics (Barcelona, España).
- **Insulina** de páncreas bovino 10mg·mL⁻¹ en HEPES pH 8.2, de Invitrogen (Waltham, EE.UU.)
- **Disolución tampón de fosfato salino 10x** de Gibco (Thermo Fisher Scientific).
- **Solución de disociación no enzimática** (Corning™ CellStripper Dissociation Reagent) de Corning (Corning, EE.UU.). Permite separar las células del recipiente en el que se cultivan de forma no enzimática.
- **Pipetas serológicas de 5 mL** de Corning (Corning, EE.UU.).
- **Botellas de T-25, T-75 y placas de 6 pocillos** de Labclinics (Barcelona, España).
- **Tubos falcon estériles de 15 y 50 mL** de Corning (Corning, EE.UU.).
- **Viales criogénicos de 2mL** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).

Para la extracción de ADN y ARN, las distintas reacciones de PCR llevadas a cabo, la purificación de los productos de PCR y las distintas electroforesis realizadas, se utilizaron los siguientes reactivos y kits comerciales:

- **Kit de extracción de ADN PureLink™ Genomic DNA MiniKit**, de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.).
- **Kit de extracción de ARN E.Z.N.A.® Total RNA Kit I**, de Omega Bio-tek (Norcross, EE.UU.).
- **Kit de síntesis de ADN complementario First Strand cDNA Synthesis Kit**, de Thermo-Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).

- **Kit de purificación de producto de PCR Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit** de GE Healthcare (Chicago, EE.UU.).
- **Kits de PCR: BIOTAQ DNA Polymerase de Bioline** (ahora Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, EE.UU.), **My Taq TM HS Mix** de Bioline, y **SYBR™ Green PCR Master Mix** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Kit de digestion de ADN, DNase I digestion set**, Omega Bio-Tek (Norcross, EE.UU.).
- **Kit de síntesis de ADN complementario, First Strand cDNA Synthesis Kit** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Agua libre de nucleasas DEPC-Treated Water** de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.).
- **Sondas TaqMan® Hs00977266_g1, s00180269_m1, Hs01012158_m1 y Hs01060665_g1** de Applied Biosystems (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).
- **Desoxirribonucleótidos trifosfato (dTTP, dCTP, dATP, dGTP)** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Dimetil sulfóxido (DMSO)** para biología molecular $\leq 99,9\%$ de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).
- **Agarosa Metaphor®** de Lonza (Basilea, Suiza) y **agarosa SeaKem® LE** de Bio-Rad (Hercules, California, EE.UU.).
- **Estándares de ADN: GeneRuler 1 kb Plus** de Thermo Fisher Scientific y **ZR 50pb DNA Marker** $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de Zymo Research (Irvine, EE.UU.).
- **Cebadores de PCR** de IDT Technologies (Coralville, EE.UU.).
- **Bromuro de etidio** de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).
- **Tampón de carga 6x** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Etanol** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), libre de nucleasa**, de Invitrogen (Carlsbad, EE.UU.).

C.- Experimental

- **Tampón de electroforesis para el sistema GE-ICP-MS:** Acetato de amonio 50 mmol·L⁻¹, pH 8.0.
- **Tampón de elución para el sistema GE-ICP-MS:** Acetato de amonio 50 mmol·L⁻¹, pH 8.0.
- **Gel de recubrimiento del sistema GE-ICP-MS:** agarosa al 1%, en tampón de electroforesis.
- **Gel de relleno del sistema GE-ICP-MS:** agarosa al 2,5%, en tampón de electroforesis.

Para los inmunoensayos, tanto ELISA comerciales como ensayos de inmuno-PCR, y para el marcaje de las células con anticuerpos para la medida por SC-ICP-MS, se utilizaron los siguientes reactivos, kits comerciales y anticuerpos:

- **Kit de ELISA para la determinación de HER2 en suero, sangre y cultivos celulares, ErbB2(HER2) Human ELISA kit** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Kit de ELISA para la determinación de TfR1 en suero, sangre y cultivos celulares, Human Transferrin Receptor ELISA kit** de Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- **Anticuerpo contra HER2, Human ErbB2/Her2 (Research Grade Trastuzumab Biosimilar) Antibody MAB9589** de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.).
- **Anticuerpo contra TfR1, Human TfR (Transferrin R) Antibody MAB2474** de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.).
- **ADN de espermatozoides de salmón** de Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE.UU.).
- **Formaldehído 4%** en solución acuosa tamponada de VWR (Radnor, EE.UU.).
- **Albúmina de suero bovino**, obtenida por fraccionamiento por choque térmico, pH7 ≥98% de Sigma-Aldrich (San Luis, EE.UU.).
- **Filtros de 3 y 50 kDa**, Amicon® Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters (Merck, Darmstadt, Alemania).

C.3. - Líneas celulares

Para los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral se emplearon las siguientes líneas celulares, todas ellas derivadas de tumores humanos:

- **Línea celular A2780** (Nº ECACC: 93112519): línea celular sensible al cisplatino derivada de un carcinoma de ovario de un paciente no tratado [308].
- **Línea celular A2780cis** (Nº ECACC: 93112517): línea celular resistente al cisplatino, desarrollada a partir de la línea A2780 por exposición continuada de las células a concentraciones crecientes de cisplatino [309].
- **Línea celular OVCAR-3** (ATCC® HTB-161™): línea epitelial derivada de un adenocarcinoma de ovario. Posee más de 2 copias del gen *CCNE1* [310].
- **Línea celular MDA-MB-231** (ATCC® HTB-26™): línea epitelial derivada de una muestra de derrame pleural de una paciente con un adenocarcinoma de mama. Las células de esta línea celular son HER2 negativas; es decir, presentan una expresión constitutiva normal de la proteína HER2 [311].
- **Línea celular MCF-7** (ATCC® HTB-22™): línea epitelial derivada de una muestra de derrame pleural de una paciente con adenocarcinoma de mama. Son también células HER2 negativas [312].
- **Línea celular SK-BR-3** (ATCC® HTB-30™): línea celular derivada de una muestra de derrame pleural de una paciente con adenocarcinoma de mama. Las células de esta línea celular son HER2 positivas; es decir, presentan sobreexpresión de la proteína HER2 [313].
- **Línea celular BT-474** (ATCC® HTB-20™): línea celular epitelial derivada de un carcinoma ductal de mama. Son también células HER2 positivas [314].

La línea celular A2780 fue una donación del Dr. J.M. Pérez Freije (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo), y se autenticó en la Unidad de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de los SCTs de la Universidad de Oviedo mediante el Kit AmpFLSTR® Identifier®Plus-PCR Amplification Kit (Thermo

C.- Experimental

Scientific). Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 fueron proporcionadas por el Dr. Santiago Cal (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo). La línea celular SK-BR-3 fue una donación del Dr. Xosé Antón Suárez Puente (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo).

Las líneas celulares A2780cis, OVCAR-3 y BT-474 se adquirieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECACC) a través de Sigma-Aldrich, de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EE.UU.) y de Elabscience (Houston, EE.UU.) a través de Quimigen S.L., respectivamente.

El cultivo de las líneas A2780, A2780cis y SK-BR-3 se llevó a cabo en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Con el fin de mantener la resistencia al cisplatino, la línea A2780cis se cultivó con 1 μ M de cisplatino cada tres pases. Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células OVCAR-3 y BT-474 se cultivaron en medio RPMI, suplementado con 20% de suero fetal bovino y con 0.01 mg.mg⁻¹ de insulina bovina. Todos los medios se suplementaron además con 5 μ g.mL⁻¹ de Plasmocin para prevenir contaminación con bacterias y/o micoplasma. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C y una atmósfera controlada de 5% CO₂, y se utilizaron hasta un máximo de 35 pases. Todas las células se cultivaron en botellas T25 para su mantenimiento y en botellas de T75 cuando la cantidad de células requeridas era grande.

C.4.- Procedimientos experimentales

C.4.1. Extracción de ADN de células procedentes de cultivos celulares

La extracción y purificación del ADN genómico a partir de células en cultivo se realizó con el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, que se basa en el empleo de mini-columnas de sílice.

Las células en cultivo se recogieron por tripsinización (se recogen aproximadamente 5·10⁶ células de una botella T25) y se resuspendieron en 200 μ L de tampón de fosfato salino, tras un paso de centrifugación. A continuación, las células se

trataron con 20 μL de proteinasa K ($20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 20 μL de ARNasa durante 2 minutos, a temperatura ambiente, para obtener el ADN genómico libre de restos de ARN. Seguidamente, se añadieron 200 μL de tampón de lisis y se incubaron a 55°C durante 10 minutos con la ayuda de un termobloque. Tras el lisado de las células, se realizó la precipitación del ADN genómico al añadir 200 μL de etanol al 96% y mezclar suavemente por inversión. El producto resultante se pasó por una columna de sílice, suministrada por el kit comercial, y se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 1 minuto. El ADN genómico precipitado, que queda retenido en la columna, se lavó una vez con cada uno de los dos tampones de lavado suministrados por el kit, centrifugando tras cada lavado a $10.000 \times g$. Para el paso final de elución se añadieron 100 μL de agua MilliQ estéril, se esperó 1 minuto, y se centrifugó la columna a $13.000 \times g$ durante 1 minuto.

La concentración y la pureza del ADN extraído se determinaron utilizando o bien un espectrofotómetro Nanodrop 2000c, o bien el ensayo Qubit dsDNA Assay, midiendo los resultados en un fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). La concentración utilizando un Nanodrop 2000c se determina midiendo la absorbancia a 260 nm y asumiendo que una unidad de absorbancia equivale a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ADN de cadena doble. Para determinar la pureza de la muestra de ADN se miden las absorbancias a 260nm y a 280nm, considerando una pureza adecuada cuando la relación entre ellas (A_{260}/A_{280}) tiene un valor entre 1,7 y 1,9. La determinación de la concentración mediante el ensayo Qubit dsDNA Assay se realiza mediante la medida de la fluorescencia, tras añadir un compuesto intercalante, utilizando un fluorímetro Qubit 2.0.

C.4.2.- Extracción de ARN de células procedentes de cultivos celulares y síntesis de ADN complementario

La extracción y purificación del ARN total a partir de células procedentes de cultivos celulares se realizó utilizando el kit comercial E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I, de Omega Bio-tek, siguiendo las instrucciones del fabricante. Al igual que en el kit de

C.- Experimental

extracción de ADN, se emplearon columnas de sílice para retener el ARN total presente en la muestra celular y eliminar los restos celulares.

Las células se recogieron por tripsinización y centrifugación, y el precipitado resultante se resuspendió en 350 μL de tampón de lisis TRK, suministrado por el kit. Tras homogeneizar la muestra, se añadió un volumen de etanol al 70% y se transfirió la mezcla a una columna HiBind®RNA Mini. Para asegurar la eliminación completa del ADN presente en la muestra, y que no interfiriera en las siguientes PCR, se añadieron a la columna 75 μL de una mezcla de digestión de ADNasa I (DNase I digestion set, Omega Bio-Tek), preparada mezclando 1,5 μL de ADNasa libre de ARNasas (20 Kunitz/ μL) con 73.5 μL de E.Z.N.A.® DNase I Digestion Buffer. Tras realizar varios lavados, se eluyó el ARN utilizando 50 μL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). El ARN total extraído se almacenó a -80°C .

Para asegurarse de que la integridad del ARN extraído era óptima se utilizó el kit comercial Agilent 2100 Bioanalyzer RNA Nano kit, de Agilent Technologies. Este kit se basa en una electroforesis capilar que permite determinar el valor RIN (*RNA Integrity Number*) al analizar el perfil del 18S rARN y 28S rARN en un electroferograma (si el ARN está degradado el perfil electroforético correspondiente a ambos ARN ribosomales cambia, llegando incluso a desaparecer con valores RIN menores de 2) [315]. Los valores RIN que se obtuvieron para todas las muestras estuvieron siempre entre 9,5 y 9,7, considerados idóneos. Este proceso se llevó a cabo en los SCTs de la Universidad de Oviedo.

Para determinar la concentración del ARN extraído se utilizó de nuevo la ratio de absorbancias A260/ A280, determinadas utilizando el Nanodrop 2000c.

La síntesis de ADN complementario (ADN con secuencia complementaria a la secuencia de los distintos ARN mensajeros presentes en la muestra), a partir de este ARN total, se realizó utilizando el kit comercial First Strand cDNA Synthesis Kit, de Thermo Fisher Scientific, en una reacción de transcripción inversa utilizando 5 μg de ARN, 4 μL de tampón de reacción 5x, 1mM de dNTPs, 5 mM de cebador oligo-dT, 1 U· μL^{-1} de inhibidor de ARNasa (Ribolock RNase Inhibitor) y 10 U· μL^{-1} de transcriptasa reversa. La reacción se incubó a 42°C durante un hora, y a 70°C durante 5 minutos. El

ADN complementario se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se utilizó en el análisis de expresión génica.

C.4.3. Purificación del producto de PCR

La purificación de los productos de PCR puede hacerse de forma directa, o tras correr la muestra en un gel de agarosa. En ambos casos, el kit utilizado fue Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de GE Healthcare, y el protocolo de purificación es muy similar.

El producto de PCR se mezcla con 500 μL de tampón de captura suministrado por el kit. Se mezcla con vortex brevemente y se pasa el contenido a una columna GFX. Se centrifuga durante 30 segundos a 16.000 x g. Se lava dos veces el contenido retenido en la columna utilizando 500 μL de tampón de lavado y centrifugando durante 30 segundos a 16.000 x g. Tras cambiar la columna de tubo el contenido se eluye añadiendo tampón de elución y, tras un minuto de incubación, centrifugando durante 1 minuto a 16.000 x g.

C.4.4. Electroforesis en gel

Salvo que se indique lo contrario, y a excepción de las realizadas utilizando el sistema Mini Prep Cell de Bio-Rad, las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 2%, utilizando tampón Tris-borato-EDTA (pH 8,2) 1x. Para la visualización del ADN en la electroforesis se utilizó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto en el gel como en el tampón de la cubeta. Se utilizaron siempre 5 μL de marcador de tamaños 1 kb Plus DNA Ladder como referencia. Todas las muestras se cargaron en el gel junto con el volumen adecuado de tampón de carga 6x. El voltaje utilizado para las electroforesis fue de entre 100 y de 150 V y la visualización de los geles se realizó en el sistema Gene Flash de Syngene.

C.4.5. Protocolo de ELISA para la determinación de HER2

El ensayo se realizó utilizando el kit comercial ErbB2(HER2) Human ELISA kit, de Thermo Fisher Scientific, añadiendo por pocillo, en primer lugar, 100 μ L del estándar de la proteína HER2 suministrada por el kit comercial, con una concentración de entre 8,19 y 2.000 pg/mL, o de la muestra a determinar. Tras una incubación con agitación de 2,5 horas, se lavó la placa 4 veces con el tampón de lavado. A continuación, y por pocillo, se añadieron: (i) 100 μ L del anticuerpo de detección biotinilado, se incubó durante una hora y se realizaron 4 lavados; (ii) 100 μ L de la disolución de estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano, se incubó durante 45 minutos con agitación y se realizaron 4 lavados; (iii) 100 μ L de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), sustrato de la peroxidasa, y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. La reacción catalizada por la peroxidasa transforma el TMB en una diimida de color azul (3,3',5,5'-tetrametilbencidina diimina) [316]. Por último, se paró la reacción añadiendo 50 μ L de la solución de parada (ácido sulfúrico), suministrada por el kit (la placa pasa de azul a amarillo en presencia del ácido), y, tras esperar unos minutos, se midió la absorbancia a 450 nm y 550 nm, utilizando el lector de microplacas Varioskan Flash, de Thermo Fisher Scientific.

D.-Resultados y discusión

D.1.- PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS: nueva estrategia analítica para la determinación de cambios en el número de copias y en la expresión génica de varios genes de forma simultánea

D.1.1.- Introducción

Las variaciones del número de copias de un gen (CNVs) son alteraciones, ya sea en forma de aumento (duplicación o amplificación génica) o disminución (delección), en el número de copias normales (dos copias) de dicho gen en el genoma celular. Las CNVs están relacionadas con multitud de desórdenes genéticos y numerosas enfermedades (Alzheimer, autismo, esquizofrenia, etc.) [317]. Además, las CNVs de ciertos oncogenes y genes supresores de tumores constituyen, en muchos casos, una de las causas principales del desarrollo inicial de procesos tumorales, e incluso puede determinar características muy relevantes del tumor, como su grado de malignidad o la forma en que se puede abordar su tratamiento [318–320].

Por otro lado, las CNVs de un determinado gen están relacionadas con cambios en la expresión de dicho gen [64]; es decir, con los niveles de su ARN mensajero (ARNm). Generalmente, el aumento en el número de copias da lugar a una mayor expresión del gen o los genes a los que afecta, mientras que una delección implica una disminución en dicha expresión [321]. No obstante, la mayoría de cambios en la expresión génica no se deben a CNVs, si no a otros parámetros que regulan este proceso. Por lo tanto, el estudio, tanto de las CNVs de ciertos genes, como de los cambios en su expresión génica, puede ser un biomarcador muy relevante para el diagnóstico, pronóstico y elección del tratamiento de ciertos tumores [322].

Como ya se ha comentado en la Introducción General, la determinación de CNVs de un gen o genes específicos se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas, cada una de ellas con sus propias ventajas e inconvenientes. De todas ellas, la más utilizada es la PCR cuantitativa, o a tiempo real (qPCR), por su elevada sensibilidad, bajo coste de los consumibles y formato abierto (no depende de un único

suministrador). La qPCR es también la técnica más usada para el análisis de la expresión génica pero, en este caso, tras un paso previo de transcripción reversa (RT, *Reverse Transcription*), para la transformación del ARNm en su ADN complementario (ADNc), por lo que la técnica se denomina RT-qPCR.

El principio de la qPCR es el mismo que el de la PCR convencional, sólo que la forma de detectar los productos de la reacción de amplificación (amplicones) es diferente. En la PCR convencional los amplicones se analizan al final de la reacción mediante electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio; mientras que en la qPCR el producto de la amplificación se monitoriza conforme transcurre la reacción empleando sondas o agentes intercalantes fluorescentes. Para la amplificación de múltiples secuencias de ADN de forma simultánea se requiere de sondas con distinto marcaje fluorescente, lo que incrementa considerablemente el precio del análisis y limita la aplicabilidad de la técnica a la disposición de sondas fluorescentes diferentes. Para solventar este problema, se han desarrollado técnicas alternativas, basadas en la PCR, con una mayor capacidad multiplex, como la técnica de MLPA, que ha demostrado su capacidad para la determinación simultánea de forma relativa de CNVs de hasta 50 secuencias de ADN diferentes [157,158]. Sin embargo, debido al alto coste en tiempo y dinero que conlleva la generación de las sondas específicas, la mayoría de las aplicaciones de MLPA están restringidas a los genes para los que existen sondas comerciales [102].

Por tanto, el objetivo de este primer capítulo de la Tesis fue el desarrollo de una nueva estrategia analítica para la determinación, tanto de CNVs como de variaciones en la expresión génica, de varios genes de forma simultánea. Esta estrategia combina las ventajas de la PCR convencional (elevada tasa de amplificación) con la cuantificación de los productos de reacción (amplicones) de una forma exacta y precisa, mediante electroforesis en gel (GE) acoplada a la detección por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), como ya se ha demostrado previamente en el caso de un único gen [323].

Para cumplir este objetivo se llevó a cabo, en primer lugar, el diseño de los cebadores necesarios para realizar la amplificación simultánea de los genes seleccionados para su estudio mediante PCR múltiple, así como la optimización de las

condiciones de trabajo de dicha PCR. Con las condiciones optimizadas se realizó un calibrado con distintas cantidades de ADN inicial, para comprobar la respuesta lineal de la amplificación. Además, se optimizó la separación y detección de fragmentos de ADN de distintos tamaños mediante GE-ICP-MS, monitorizando el fósforo presente en dichos fragmentos. Finalmente, se efectuó la cuantificación de los productos de PCR múltiple por GE-ICP-MS, tanto en el caso de la determinación de CNVs como de la expresión génica.

Los resultados de la determinación múltiple de CNVs fueron validados mediante el análisis de la línea celular OVCAR-3, que posee un número mayor de copias de uno de los genes estudiados. Los resultados obtenidos fueron confirmados por qPCR en el caso de la determinación de CNVs, y por RT-qPCR en el caso del estudio de variaciones en la expresión génica.

D.1.2.- Diseño de cebadores para la amplificación simultánea de varios genes mediante PCR múltiple

Para la determinación de CNVs se escogieron cuatro genes para su estudio: dos genes, *HER2* y *CCNE1*, que están amplificados en cáncer de mama y ovario [324–326], respectivamente; un tercer gen, *GSTM1*, que está ausente, por delección, en aproximadamente el 50% de la población caucásica [327]; y un cuarto gen, *ACTB*, utilizado normalmente como control endógeno en estudios de expresión génica [328]. En el caso del análisis de la expresión génica, los genes seleccionados fueron: *BAX*, *CTR1*, *ERCC1*, relacionados con la resistencia celular al cisplatino, un fármaco antitumoral comúnmente utilizado en quimioterapia; y, de nuevo, el gen *ACTB*, utilizado como control endógeno invariable. De acuerdo con la literatura, la resistencia al cisplatino está asociada en ciertos casos a sobreexpresión del gen *ERCC1* [329], y a la disminución de la expresión de los genes *CTR1* [330] y *BAX* [331].

Una vez seleccionados los genes de interés, es necesario llevar a cabo el diseño de las parejas de oligonucleótidos que actúan de cebadores (F, *Forward* y R, *Reverse*, *primers*) para la amplificación simultánea, mediante PCR múltiple, de los fragmentos del ADN correspondientes a dichos genes. Para ello, se debe prestar especial atención

D.- Resultados y discusión

a longitud de los cebadores (en torno a 20 pares de bases), su contenido de citosina-guanina (entre el 40 y el 60%), su temperatura de fusión (idealmente todas las parejas la misma, con menos de 0,5°C de diferencia entre ellas). Las secuencias de los genes en estudio se obtuvieron de la base de datos *Ensemble Genome Browser* y, a partir de ellas, se diseñaron los cebadores utilizando el software online *Primer 3 Input* [332]. El diseño se realizó de tal forma que la secuencia de los cebadores no coincidiera con posiciones del genoma con polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para evitar posibles problemas en la hibridación entre los cebadores y el ADN molde. Además, los cebadores se diseñaron de manera que el amplicón que generan fuera de al menos 100 pares de bases, y con una diferencia de tamaños entre los distintos amplicones a generar de al menos 70 pares de bases, con el fin de conseguir una buena separación mediante GE-ICP-MS.

En el caso del estudio de la expresión génica, además de tener en cuenta todas estas condiciones, los cebadores se diseñaron también de modo que hibridaran con diferentes exones del gen en estudio, para prevenir la amplificación de ADN genómico.

Una vez diseñados los cebadores se comprobó *in silico* que no existía hibridación cruzada, ni formación de dímeros de cebadores, entre las distintas parejas de cebadores a utilizar en una misma reacción de PCR múltiple. Para ello, se utilizó el software online *Oligo Analyzer*, de *Integrated DNA Technologies* [333], comprobando que la energía libre de Gibbs entre las posibles parejas de cebadores formadas fuese mayor de $-9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los cebadores diseñados para la amplificación por PCR múltiple, así como el tamaño esperado (pares de bases, pb) del producto de la PCR.

Tabla 2 - Parejas de cebadores seleccionados para la amplificación mediante PCR múltiple de los diferentes genes de interés, para la determinación tanto de CNVs como de variaciones en la expresión génica. Se muestra la secuencia de los cebadores y el tamaño esperado del producto de PCR amplificado.

Determinación de CNVs			
Gen de interés	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Tamaño esperado del producto de PCR
<i>ACTB</i>	ACTB-F	5'-TGGTCATCTTTCCCACCAGG-3'	110 pb
	ACTB-R	5'-AGGAAGGAGGCTGCTTGTC-3'	
<i>HER2</i>	HER-F	5'-AGAAGGTTCTCTCTCCAGG-3'	187 pb
	HER-R	5'-CCTCAAATCCAGCTCTGCAG-3'	
<i>CCNE1</i>	CCNE-F	5'-	266 pb
	CCNE-R	CCACTGACTATTGAAGAAAGGGT-3'	
<i>GSTM1</i>	GSTM-F	5'-GTTTGCCTGCCAATTCTCC-3'	348 pb
	GSTM-R	5'-TTGTAAACACCAGGAAGCGC-3'	
Análisis de la expresión génica			
Gen de interés	Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Tamaño esperado del producto de PCR
<i>ACTB</i>	ACB-F	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3'	111 pb
	ACB-R	5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'	
<i>BAX</i>	BAX-F	5'-GAGCTGCAGAGGATGATTGC-3'	182 pb
	BAX-R	5'-GTTCTGATCAGTTCCGGCAC-3'	
<i>CTR1</i>	CTR-F	5'-CAACCACTTCAGCCTCACAC-3'	250 pb
	CTR-R	5'-ACAGGCATGGAATTGTAGCG-3'	
<i>ERCC1</i>	ERC-F	5'-TTGTGATACCCCTCGACGAG-3'	321 pb
	ERC-R	5'-CGGGAATTACGTGCGCAAAT-3'	

D.1.3.- Optimización de la amplificación simultánea de varios genes mediante PCR múltiple

Después de comprobar mediante reacciones de PCR individuales que los cebadores escogidos para la amplificación de los genes elegidos funcionaban adecuadamente, se procedió, utilizando dichos cebadores (ver Tabla 2), a establecer las condiciones de trabajo más adecuadas para llevar a cabo la PCR múltiple. Para ello, se optimizaron los parámetros más importantes que afectan a la especificidad y eficiencia de la PCR, como son: cantidad de ADN inicial, número de ciclos, temperaturas de hibridación y elongación, tiempos de hibridación y elongación y concentraciones de los cebadores. Los estudios de optimización se llevaron a cabo utilizando un termociclador modelo Sure Cyclor 8800 de Agilent Technologies. Todo el proceso de optimización se realizó comprobando los resultados de las reacciones de PCR múltiple mediante electroforesis convencional en gel de agarosa, como se describe en el Apartado C.4.4., visualizando los resultados con tinción de bromuro de etidio y un equipo Gene Flash de Syngene. Se repitió cada amplificación al menos 3 veces.

En el caso de la determinación de CNVs de los genes *CCNE1*, *GSTM1* y *HER2*, el molde utilizado en las reacciones de PCR múltiple fue ADN genómico, obtenido de la línea celular A2780, cultivada como se indica en el Apartado C.3.. Para su extracción y purificación se utilizó el kit comercial PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, como se describe en el Apartado C.4.1..

Las condiciones de PCR múltiple seleccionadas para la amplificación de fragmentos de los genes *ACTB*, *CCNE1*, *GSTM1* y *HER2* se muestran en la Tabla 3. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40 µL y se utilizó el Kit comercial de PCR MyTaq™ HS Mix, que consiste en una solución tampón de pH adecuado que ya contiene la enzima DNA polimerasa, los dNTPs y el MgCl₂.

Tabla 3- Condiciones de trabajo seleccionadas para la amplificación por PCR múltiple de fragmentos de los genes *ACTB*, *CCNE1*, *GSTM1* y *HER2* utilizando como molde ADN genómico de células en cultivo.

Mezcla de reacción			
Reactivo		Volumen o concentración	
Kit de PCR MyTaq™ HS Mix		20 µL	
Tampón My taq HS Mix buffer contiene:			
Cebadores		3,75 nM de GSTM-F y GSTM-R 350 nM de CCNE-F y CCNE-R 175 nM de HER-F y HER-R 375 nM de ACTB-F y ACTB-R	
Dimetil sulfóxido DMSO		3,75% (v/v)	
ADN genómico		Entre 0,5 y 50 ng	
Agua ultrapura		Hasta 40 µL	
Programa de amplificación			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	
Desnaturalización	95	1 min	35
Hibridación	60	1 min	
Elongación	72	1 min	
Elongación final	72	10 min	

D.- Resultados y discusión

En el caso del análisis de expresión génica de los genes *ACTB*, *BAX*, *ERCC1* y *CTR1*, el molde para las reacciones de PCR múltiple fue ADN complementario (ADNc), obtenido mediante transcripción reversa a partir del ARN extraído de las células A2780, utilizando el protocolo descrito en el Apartado C.4.2.. A partir de este ARN total se llevó a cabo la síntesis del ADNc siguiendo el procedimiento del Apartado C.4.2.

En la Tabla 4 se recogen las condiciones de trabajo seleccionadas para la amplificación mediante PCR múltiple con transcripción inversa (RT-PCR) de fragmentos de los genes *ACTB*, *BAX*, *ERCC1* y *CTR1*.

Tabla 4.- Condiciones de trabajo seleccionadas para la amplificación por RT-PCR múltiple de fragmentos de los genes *ACTB*, *BAX*, *ERCC1* y *CTR1* utilizando como molde ADN complementario de células en cultivo.

Mezcla de reacción			
Reactivo		Volumen o concentración	
Tampón BIOTAQ buffer 10x, pH 8,0		4 µL	
Cebadores		0,2 µM de ACB-F y ACB-R 0,2 µM de BAX-F y BAX-R 0,25 µM de CTR-F y CTR-R 0,125 µM de ERC-F y ERC-R	
dNTPs		0,2 mM	
MgCl ₂		1,5 mM	
BIOTAQ™ DNA polimerasa		2,5 U	
ADN complementario		Entre 0,5 y 50 ng	
Agua ultrapura		Hasta 40 µL	
Programa de amplificación			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos

Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	45 s	35
Hibridación	60	45 s	
Elongación	72	2 min	
Elongación final	72	10 min	

D.1.4.- Preparación de los geles de agarosa para la separación de los productos de la PCR múltiple

Para la separación de los fragmentos de ADN producidos en las reacciones de PCR múltiple, y su cuantificación por ICP-MS monitorizando el fósforo presente en ellos, se utilizó el sistema de electroforesis en gel cilíndrico, descrito en el Apartado C.1.3, acoplado al ICP-MS. En este sistema la separación electroforética tiene lugar en un gel de agarosa preparado en el interior de un tubo de vidrio de 130 mm de longitud, 2,2 mm de diámetro interno y 9 mm de diámetro externo (ver Figura 31).

Antes de la preparación del gel de agarosa, el tubo de vidrio se lavó, primero con una disolución de HNO₃ al 10% a 95°C durante 30 minutos y, a continuación, con agua ultrapura, de nuevo a 95°C durante 30 minutos. Por último, el tubo se secó durante toda la noche en una estufa a 60°C, para evitar la presencia de humedad en las paredes. En este tubo seco se preparó el gel de agarosa en dos pasos: primero recubriendo su pared interior con una fina capa de agarosa al 1% (gel de recubrimiento), y, después, rellenando el tubo con agarosa al 2 (gel de separación). Para generar el gel de recubrimiento, el tubo de vidrio se sumergió, durante 3 minutos y en posición vertical, en un vial de 12 mL que contenía una solución líquida de agarosa SeaKem® LE al 1% (p/v) en el tampón de electroforesis (acetato de amonio 50 mmol·L⁻¹, pH 8,0); pasado ese tiempo, se dejó secar en una estufa a 70°C, durante una hora y media. Este gel de recubrimiento permite que el gel de separación se fije bien a la

pared del tubo de vidrio y, además, impide la formación de pasillos vacíos por los que pueda circular la muestra sin pasar por los poros del gel de separación.

Para la obtención del gel de separación se preparó una solución de agarosa SeaKem® LE al 2% (p/v) en el tampón de electroforesis y, tras disolver la agarosa calentando a 80°C, se dispusieron 5 mL de dicha solución en un vial de 12 mL. Se introdujo el tubo de vidrio en el vial y, tapando su extremo superior con el dedo, se retiró, ajustando la longitud del gel de agarosa a la longitud deseada. Antes de retirar el dedo, se dejó solidificar el gel, para que no se produjera la pérdida de agarosa líquida. Una vez polimerizada la agarosa, se retiraron los restos de la parte exterior del tubo, y se cortó la parte inferior para que quedara ajustada al tubo de vidrio.

Antes de colocar el tubo con el gel en la celda de electroforesis (ver Figura 31), se necesitó también ajustar la longitud de la jeringa con la que se introduce la muestra, para que quede de la medida adecuada, de tal forma que la muestra se pueda introducir lo más próxima al gel como sea posible, pero sin producirle daños.

D.1.5.- Montaje de la celda de electroforesis y establecimiento de las condiciones de medida del ICP-MS

Para realizar las medidas de GE-ICP-MS, una vez preparado el gel de agarosa, es necesario realizar el montaje de la celda de electroforesis colocando en su interior el tubo de vidrio que contiene el gel (ver Figura 31). Para ello, en primer lugar, se llenó la parte inferior de la celda con el tampón de electroforesis hasta un tercio de su volumen (aproximadamente 400 mL). A continuación, se colocaron las membranas de la zona de elución (ver Figura 32), atendiendo especialmente a la colocación de la membrana de diálisis. Se ensamblaron el resto de las piezas que componen esta zona de elución, y se fijó sobre ella el tubo del gel, mediante el disco de metacrilato de la cámara superior, que contiene tres tornillos para su correcto ajuste. Una vez encajado el extremo inferior del tubo, su parte superior se acopló al compartimento del tampón de elución, a través de un agujero situado en su centro. Este tampón tiene la misma composición y pH que el tampón de electroforesis (acetato de amonio 50 mmol·L⁻¹, pH

8,0). Con la cámara de elución montada, y el gel de electroforesis bien encajado en la celda electroforética, se rellenó la cámara superior de la celda con el tampón de electroforesis. Por último, se eliminaron las burbujas de aire presentes en las conexiones del sistema, con la ayuda de una jeringa conectada al tubo de elución de los analitos, así como las burbujas presentes en el tubo del gel (en la parte vacía del tubo situada encima del gel de separación), con la ayuda de la aguja de inyección de la muestra.

El acoplamiento del sistema de electroforesis al ICP-MS se realizó, como ya se comentó, mediante el empleo de una bomba peristáltica que impulsa a los analitos separados durante la electroforesis, a un flujo de $700 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, a través de un tubo de goma inerte que conecta el canal de elución de la cámara de electroforesis con la entrada del nebulizador del ICP-MS.

La utilización de ICP-MS para la determinación de ácidos nucleicos ofrece la ventaja de ser una técnica de detección independiente de la especie, por lo que la señal de fósforo no depende de la forma química de la especie ionizada en el plasma. De este modo, se puede realizar la cuantificación de cualquier compuesto que contenga fósforo (como el ADN), utilizando patrones inorgánicos (como por ejemplo el PO_4^{3-}). Sin embargo, la detección de fósforo está limitada por la pobre eficiencia de ionización del elemento (potencial de ionización de 10,5 eV) y la gran cantidad de interferencias poliatómicas (por ejemplo: $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ y $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$) que tiene su único isótopo (^{31}P). Estas interferencias se pueden eliminar, como ya se ha comentado, utilizando un ICP-MS de alta resolución o doble enfoque trabajando a media resolución ($R=4000$). Por lo tanto, para el acoplamiento GE-ICP-MS se utilizó un equipo de ICP-MS de doble enfoque (Thermo Element II).

Antes de realizar las medidas con el sistema acoplado GE-ICP-MS se realizó una optimización general diaria, mediante nebulización convencional, de los distintos parámetros instrumentales que afectan a la señal analítica del fósforo en el ICP-MS: potencia de radiofrecuencias (RF), posición de la antorcha, flujos de gas, formación de óxidos, eliminación de interferencias y la calibración de masas a baja, media y alta resolución. Para ello, se empleó una disolución de 1 ng mL^{-1} de Li ($m/z = 7$), In ($m/z = 89$) y U ($m/z = 238$) en HNO_3 al 2%, para cubrir todo el rango de masas. A continuación,

D.- Resultados y discusión

se utilizaron disoluciones de fósforo de $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en HNO_3 al 2% para comprobar la sensibilidad del equipo para el analito a detectar. En la Tabla 5 se recogen las condiciones de medida finalmente seleccionadas como más adecuadas para la medida del $^{31}\text{P}^+$.

Tabla 5.- Parámetros instrumentales utilizados para la medida de fósforo mediante ICP-MS de doble enfoque.

Equipo	Thermo Element II
Potencia de radiofrecuencia	1350 W
Flujo de gas refrigerante	15,50 L·min ⁻¹
Flujo de gas portador	0,90 L·min ⁻¹
Flujo de gas auxiliar	0,90 L·min ⁻¹
Conos (<i>sampler</i> y <i>skimmer</i>)	Niquel
Nebulizador	Meinhard
Cámara de nebulización	Tipo Scott
Isótopos medidos	$^{31}\text{P}^+$
Dwell time	100 ms
Resolución	Media (4000)

D.1.6.- Optimización de la separación de fragmentos de ADN mediante GE-ICP-MS

Con las condiciones de PCR múltiple seleccionadas para la amplificación de los genes *ACTB*, *HER2*, *CCNE1* y *GSTM1* (Tabla 3), se obtienen cuatro fragmentos de ADN (amplicones) con los siguientes tamaños teóricos: 110 pb para *ACTB*, 187 pb para *HER2*, 266 pb para *CCNE1* y 348 pb para *GSTM1*. En el caso de la amplificación mediante RT-PCR múltiple de los genes *ACTB*, *BAX*, *CTR1* y *ERCC1* con las condiciones

de la Tabla 4, los amplicones obtenidos tienen los siguientes tamaños teóricos: 111 pb para *ACTB*, 182 pb para *BAX*, 250 pb para *CTR1* y 321 pb para *ERCC1*. Por lo tanto, con el fin de poder realizar la determinación de estos amplicones mediante GE-ICP-MS se procedió a optimizar su separación electroforética, utilizando fragmentos de ADN de tamaño similar. Para ello, se utilizó una disolución comercial que contiene una mezcla de 10 fragmentos de ADN de doble cadena que van desde las 50 pb hasta las 500 pb, con intervalos de 50 pb (ZR 50 bp DNA Marker). Utilizando esta disolución de ADN (escalera de ADN de 50 pb), y partiendo de condiciones previamente optimizadas por otros miembros de nuestro grupo de investigación con el mismo sistema de electroforesis [323,334], se realizó la optimización de la concentración y la longitud del gel de agarosa, así como el potencial aplicado durante la electroforesis. La detección se llevó a cabo mediante ICP-MS en las condiciones de trabajo de la Tabla 5. En todos los casos, se utilizó como tampón de electroforesis una disolución de acetato de amonio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 8,0 y un volumen de inyección de $8 \mu\text{L}$: $4 \mu\text{L}$ de muestra, $2 \mu\text{L}$ de una disolución de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PO_4^{3-} , que se utiliza como patrón interno, y $2 \mu\text{L}$ de sacarosa al 40% (p/v) para aumentar la densidad de la disolución y evitar la difusión de la muestra en el gel.

Como resultado de estos estudios de optimización, se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo como las más adecuadas para la separación de los fragmentos de la escalera de ADN de 50 pb: un gel con una concentración de 2% de agarosa y 26 mm de longitud, y un potencial de 200 V. En la Figura 33 se muestra el electroferograma obtenido con estas condiciones de trabajo.

Como se puede ver en la Figura 33, se consigue una buena separación de los diferentes fragmentos de ADN analizados, que difieren entre sí en 50 pares de bases. Así, la resolución entre dos picos adyacentes; es decir, la diferencia de tiempos de migración dividida por la anchura media de los picos en su base, osciló entre 0,95 y 1,2. Los fragmentos de ADN también están bien separados del pico del fosfato inorgánico (PO_4^{3-}), el pico número 1 en el electroferograma de la Figura 33, agregado a la escalera de ADN como patrón interno (PI) para corregir posibles variaciones en los tiempos de migración y áreas de pico.

D.- Resultados y discusión

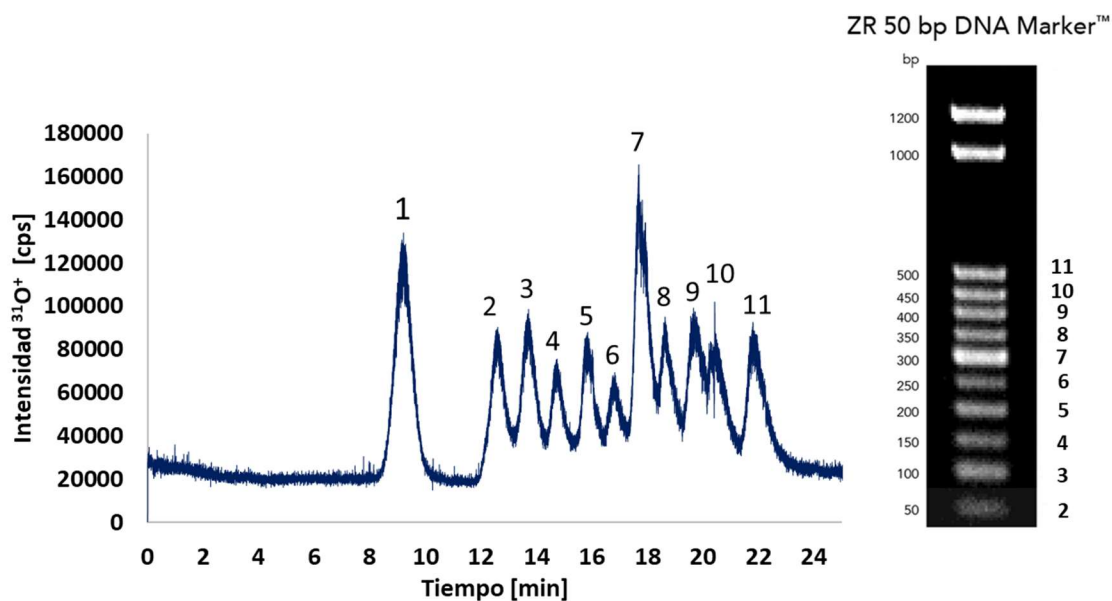


Figura 33.- Electroferograma obtenido mediante GE-ICP-MS para la separación de los fragmentos de una escalera comercial de ADN de 50 pb. Identificación de los picos: 1, Patrón interno de fosfato; 2, 50 pb; 3, 100 pb; 4, 150 pb; 5, 200 pb; 6, 250 pb; 7, 300 pb; 8, 350 pb; 9, 400 pb; 10, 450 pb; 11, 500 pb. En la parte derecha se muestra la fotografía de la separación mediante electroforesis convencional aportada por la casa comercial.

Además, es posible establecer una correlación entre el tiempo de migración de cada fragmento y su tamaño (en número de pares de bases). En la Figura 34 se puede ver como existe una relación lineal entre los tiempos de migración corregidos (diferencia entre el tiempo de migración del fragmento y el tiempo de migración del PI) y el número de pares de bases de cada fragmento con un buen coeficiente de correlación ($R^2= 0,998$).

Una vez optimizada la separación de los fragmentos de ADN de la escalera de 50 pb, se estudió si las condiciones de separación seleccionadas eran adecuadas para la separación de los amplicones generados en la PCR múltiple de fragmentos de los genes *ACTB*, *HER2*, *CCNE1* y *GSTM1*. Para ello, una muestra de 50 ng de ADN genómico, extraído de células A2780, se amplificó mediante PCR múltiple utilizando las condiciones de la Tabla 3. El producto obtenido de la reacción se purificó utilizando el kit comercial PCR Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare y se analizó mediante GE-ICP-MS con las condiciones optimizadas para la escalera de ADN. El electroferograma obtenido se muestra en la Figura 35, en la que también se

puede ver la separación obtenida mediante electroforesis convencional con detección con bromuro de etidio.

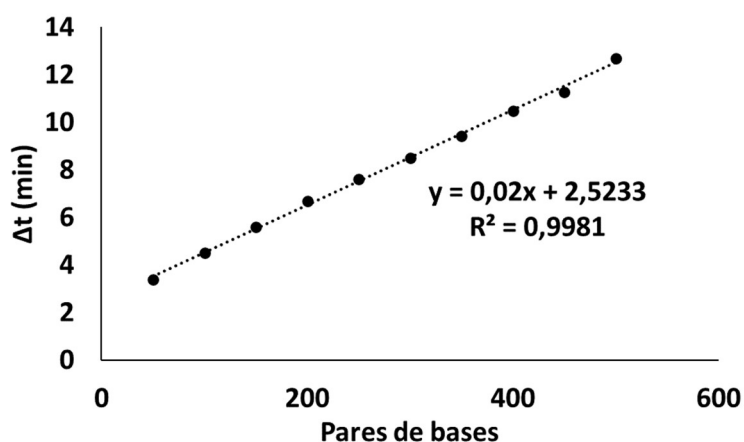


Figura 34.- Relación entre los tiempos de migración corregidos (diferencia entre el tiempo de migración del analito y el tiempo de migración del PI) y el número de pares de bases de los fragmentos de la escalera comercial de ADN de 50 pb. Se muestra la ecuación de la recta obtenida y su coeficiente de correlación.

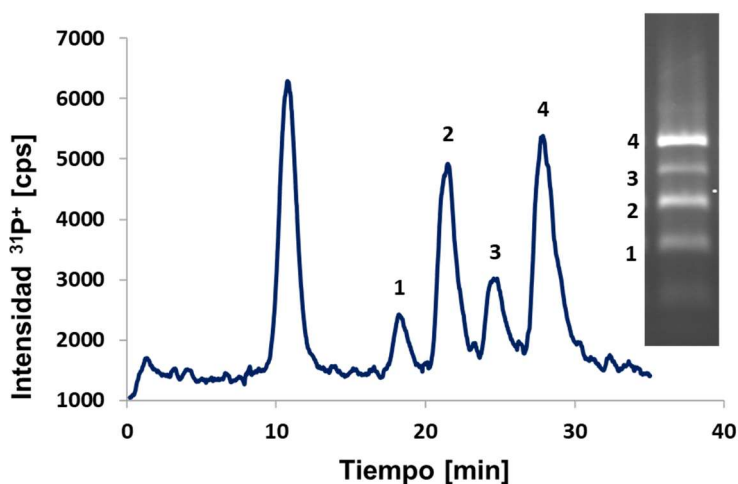


Figura 35.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS para la separación de los amplicones generados tras un proceso de PCR múltiple. Los diferentes picos se corresponden con: PI, patrón interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1. Se muestra también la imagen obtenida en el análisis mediante electroforesis convencional en gel de agarosa.

Como se puede observar, existe una buena separación entre los cuatro amplicones en estudio. También se observa que el pico correspondiente al PO_4^{3-} está perfectamente separado de los picos de los amplicones. Por tanto, se seleccionaron las

D.- Resultados y discusión

condiciones de trabajo de GE-ICP-MS que se recogen en la Tabla 6 como las más adecuadas para todos los estudios posteriores.

Tabla 6.- Condiciones de trabajo de la técnica de GE-ICP-MS.

GE-ICP-MS	
Tampón de electroforesis	50 mmol·L ⁻¹ de acetato de amonio (pH 8,0)
Flujo	0,7 mL·min ⁻¹
Gel de recubrimiento	1% de agarosa
Gel de relleno	2% de agarosa
Tamaño del gel	26 mm
Volumen inyectado	8 µL
Detección	³¹ P ⁺ mediante ICP-MS (condiciones en la Tabla 5)

Además, utilizando la recta de calibrado presentada en la Figura 34, se estimó el tamaño real de los amplicones obtenidos en la PCR múltiple. Los tamaños teóricos de los amplicones para los genes amplificados son: *ACTB* (110 pb), *HER2* (187 pb), *CCNE1* (266 pb) y *GSTM1* (348 pb). Los resultados obtenidos, expresados como la media ± desviación estándar (n= 6), fueron de: 108 ± 19 pb para *ACTB*, 197 ± 11 pb para *HER2*, 290 ± 14 pb para *CCNE1* y 380 ± 16 pb para *GSTM1*, que están en buena concordancia con los tamaños teóricos esperados.

D.1.7.- Determinación de cambios en el número de copias de varios genes de forma simultánea

D.1.7.1.-Evaluación de las características analíticas de la metodología desarrollada

El electroferograma de la Figura 35 pone de manifiesto que la intensidad de la señal (área de pico) obtenida para los cuatro amplicones, separados mediante GE, es diferente para cada uno de ellos, aunque las diferencias observadas son comparables a las obtenidas mediante electroforesis convencional con bromuro de etidio (imagen de la derecha en la Figura 35). Estas diferencias pueden deberse no solamente a los diferentes tamaños de los amplicones, sino también a la diferente eficiencia de amplificación obtenida para cada uno de ellos. Teniendo en cuenta que uno de los parámetros que afecta a la eficiencia de la PCR es la cantidad inicial del ADN molde, se procedió a estudiar su efecto sobre el área de pico de los amplicones. Para ello, diferentes cantidades de ADN inicial (entre 2 y 50 ng) se utilizaron en la PCR múltiple, con las condiciones de la Tabla 3, y los amplicones obtenidos se analizaron mediante GE-ICP-MS en las condiciones recogidas en la Tabla 6. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 36, donde se representa la señal correspondiente al área del pico de cada amplicón, dividida por el área del pico del fosfato (PI), frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADN para cada uno de los genes amplificados.

En la Figura 36 se puede ver que existe una relación lineal ($R^2 > 0,93$) entre la relación de áreas de pico (área del amplicón/área del PI) y el logaritmo de la cantidad de ADN de partida para todos los genes amplificados: *ACTB*, *HER2*, *CCNE1* y *GSTM*. Si comparamos las distintas secuencias, se puede ver como la mayor eficiencia de amplificación (pendiente de la recta) correspondió al gen *GSTM1*, seguido de *HER2* y *CCNE1*. La eficiencia de amplificación del gen *ACTB* fue muy baja (pendiente de la recta= 0,1).

D.- Resultados y discusión

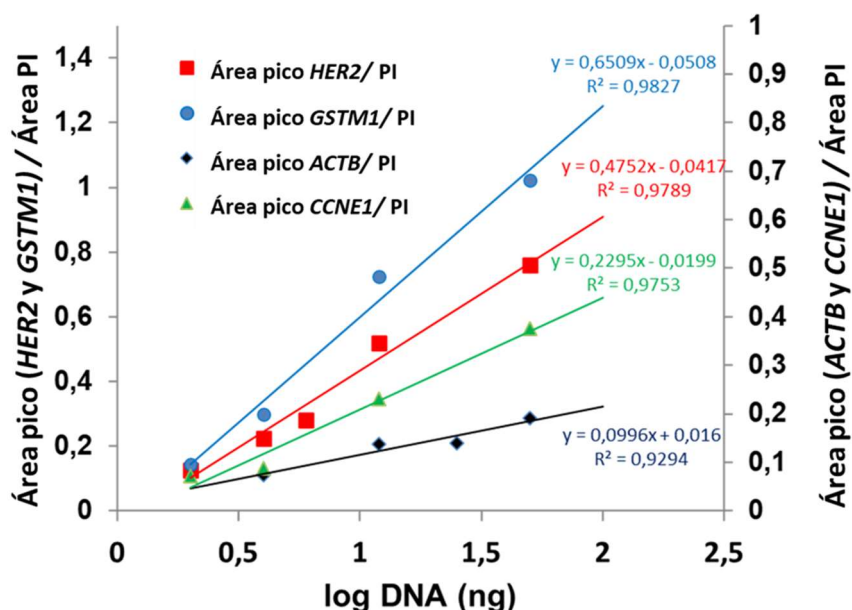


Figura 36.- Variación de la relación de áreas de pico (área del amplicón/área del PI) con la cantidad de ADN inicial (2-50 ng) para los cuatro amplicones de la PCR múltiple. Se muestran las ecuaciones de las rectas obtenidas y su coeficiente de correlación.

Normalmente los protocolos de PCR constan de ciclos de 3 etapas (desnaturalización, hibridación y elongación). Sin embargo, las etapas de hibridación y elongación pueden ser combinadas en una sola (PCR de dos etapas) [335]. Mediante esta combinación se consigue reducir el tiempo de PCR, además de aumentar normalmente el rendimiento de amplificación [335]. Por lo tanto, para tratar de mejorar las eficiencias de amplificación, así como mejorar la sensibilidad (disminuir la cantidad de ADN inicial utilizada), se adaptó el protocolo de PCR con las condiciones que se muestran en la Tabla 3 a un protocolo de ciclos de dos etapas, que consiste en: una etapa inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 45 s a 95 °C (desnaturalización) y 2:30 min a 62,5 °C (hibridación más elongación), y una etapa final de elongación de 10 min a 72 °C. En la Figura 37 se puede ver un electroferograma obtenido con este protocolo de ciclos de dos etapas de PCR múltiple.

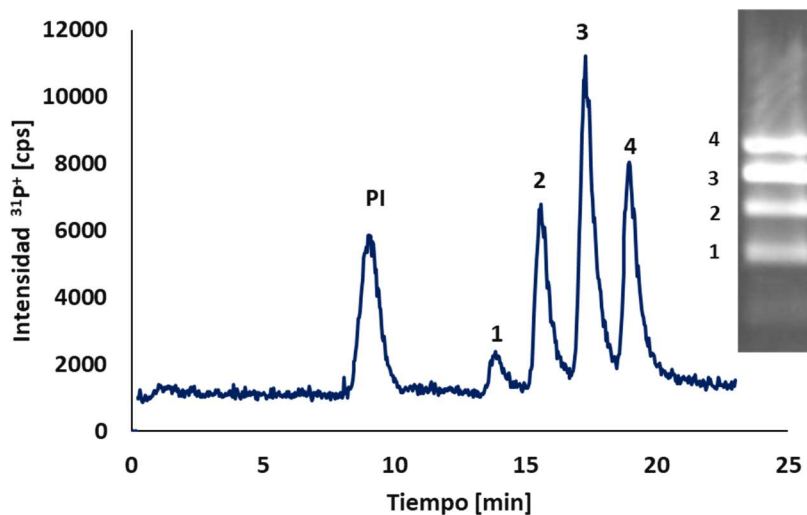


Figura 37.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS para la separación de los amplicones generados tras un proceso de PCR múltiple (protocolo de ciclos de dos etapas). Los diferentes picos se corresponden con: PI, patron interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1. Se muestra también la imagen obtenida en el análisis mediante electroforesis convencional en gel de agarosa.

Si se comparan las intensidades de los picos de los amplicones de la Figura 37 (procedimiento de PCR múltiple de ciclos de dos etapas) con los de la Figura 35 (procedimiento de PCR múltiple de ciclos de tres etapas), se puede ver que con la PCR de dos etapas se consigue aumentar la amplificación para todos los genes en estudio. Por lo tanto, se seleccionó el procedimiento de PCR múltiple de ciclos de dos etapas como el más adecuado para todos los estudios posteriores, y se procedió a establecer de nuevo el rango de cantidades de ADN inicial en el que existe una relación lineal entre la señal obtenida mediante GE-ICP-MS y el logaritmo de dicha cantidad (rectas de calibrado) para cada uno de los genes en estudio. El rango estudiado fue de 0,5 hasta 40 ng de ADN.

Para corregir las diferencias entre las señales de ICP-MS obtenidas para los cuatro amplicones, debidas a sus diferentes tamaños, (contenido en fósforo), el área de pico de cada uno de ellos se multiplicó por un factor correspondiente a la relación entre el tamaño de amplicón más grande (*GSTM1*, 348 pb) y el tamaño del correspondiente amplicón. Así, este factor de corrección tiene un valor de 3,16 para *ACTB* (348 pb/110 pb); 1,86 para *HER2* (348 pb/187 pb); 1,31 para *CCNE1* (348 pb/266 pb); y 1,0 para *GSTM1* (348 pb/348 pb). Los resultados obtenidos se muestran en la

D.- Resultados y discusión

Figura 38, donde se representa la señal correspondiente al área del pico del amplicón (corregida por su tamaño), dividida entre el área del pico del fosfato (PI), frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADN para cada uno de los genes amplificados.

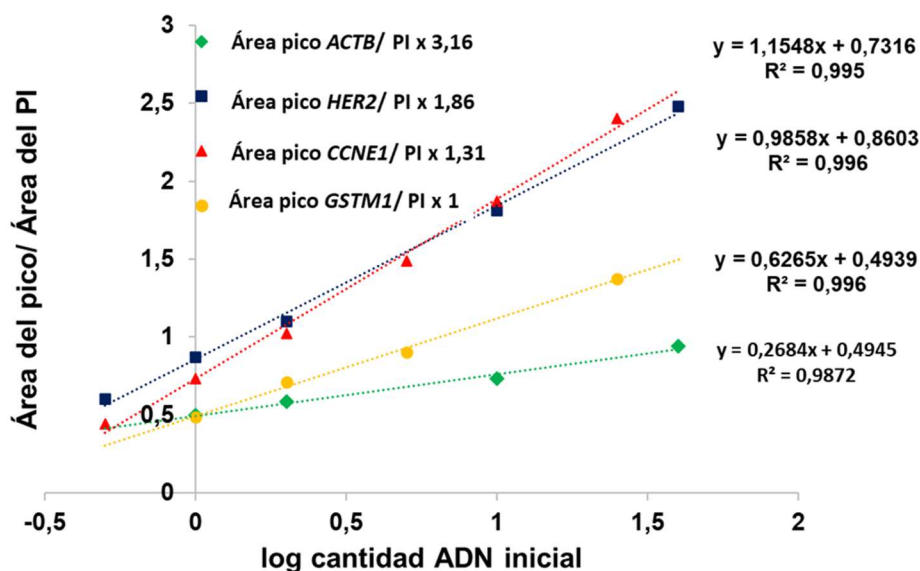


Figura 38.- Rectas de calibrado obtenidas mediante GE-ICP-MS para los 4 amplicones de la PCR múltiple (protocolo de dos pasos) utilizando distintas cantidades de ADN genómico molde (0,5-40 ng). Las áreas de pico se corrigieron para tener en cuenta el efecto del diferente tamaño de los amplicones. Se muestran las ecuaciones de las rectas y sus coeficientes de correlación.

Como se puede observar, las rectas de calibrado obtenidas presentaron en todos los casos un $R^2 \geq 0,987$. Por tanto, la metodología desarrollada es lineal en el rango de 0,5 a 40 ng de ADN inicial. Además, también se puede ver en la Figura 38 que, tras la corrección de los amplicones por tamaño, el gen *ACTB* sigue mostrando muy baja eficiencia de amplificación, pero la eficiencia de amplificación del *HER2* y del gen *CCNE1* son muy parecidas (pendientes de las rectas de calibrado de $1,15 \pm 0,04$ y $0,99 \pm 0,03$, respectivamente). La eficiencia de amplificación del gen *GSTM1* es aproximadamente la mitad de la de estos dos genes (pendiente de la recta de calibrado de $0,63 \pm 0,02$). En todos los casos, las eficiencias de amplificación fueron mayores que las obtenidas con la PCR de 3 etapas.

Una vez establecido el rango lineal de la metodología propuesta, se evaluaron otras características analíticas como son la precisión en términos de repetibilidad de

los tiempos de migración y las áreas de pico de los amplicones, así como el límite de detección. En el caso de la repetibilidad, se analizó una muestra de ADN genómico (extraído de las células A2780) de 5 ng seis veces el mismo día. Como resultado de estos análisis se obtuvo una repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa en tanto por ciento (%RSD, *Relative Stándar Deviation*) para el tiempo de migración corregido (tiempo de migración del amplicón/ tiempo de migración del PI) inferior al 4% para todos los amplicones; mientras, para la repetibilidad de las áreas de pico corregidas (área de pico del amplicón/área de pico del PI) se obtuvieron valores entre el 1% y el 6%, dependiendo del amplicón. En cuanto al límite de detección, calculado como la cantidad de ADN necesaria para producir una señal igual a 3 veces el ruido de fondo del electroferograma, el valor obtenido varía entre 0,2 ng de ADN (el ADN de unas 50 células) para el gen *CCNE1* y 0,5 ng (el ADN de unas 100 células) para los genes *GSTM1* y *HER2*.

D.1.7.2.- Aplicación de la metodología desarrollada

Por último, se investigó la aplicabilidad de la metodología propuesta de PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS para la determinación de CNVs, mediante el análisis del ADN genómico procedente de la línea celular de cáncer de ovario, OVCAR-3, que presenta un aumento del número de copias del gen *CCNE1* [336]. Para ello, se realizaron tres reacciones de PCR múltiple independientes, partiendo en todas ellas de 5 ng de ADN genómico. El procedimiento de PCR múltiple utilizado fue el de dos etapas (35 ciclos de 45 s a 95 °C y 2:30 min a 62,5 °C), y el resto de condiciones de reacción las presentadas en la Tabla 3. Los amplicones obtenidos se analizaron mediante GE-ICP-MS utilizando las condiciones de trabajo especificadas en la Tabla 6. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos para el análisis de 5 ng de ADN genómico de la línea celular de cáncer de ovario A2780, que tiene un número normal de copias del gen *CCNE1*. En la Figura 39 se presentan los electroferogramas obtenidos para las dos líneas celulares analizadas.

D.- Resultados y discusión

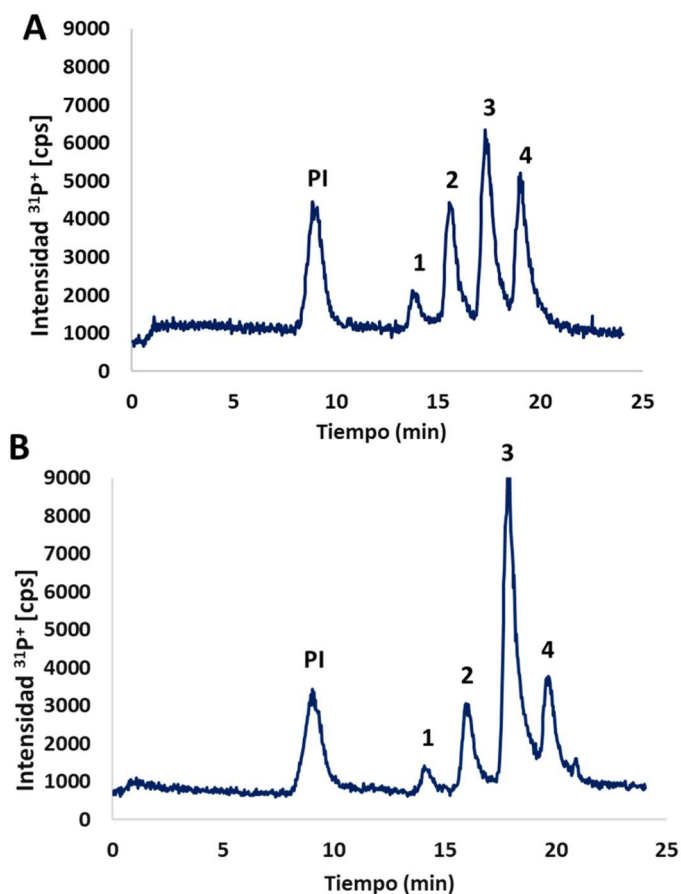


Figura 39.- Electroferogramas obtenidos por GE-ICP-MS de los productos de reacciones de PCR múltiple utilizando 5 ng de ADN genómico de células: (A) A2780 y (B) OVCAR-3. Los diferentes picos se corresponden con: PI, estándar interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, HER2; 3, CCNE1; 4, GSTM1.

Como se puede observar en la Figura 39B, la altura del pico correspondiente al producto de la amplificación del fragmento del gen *CCNE1* en las células OVCAR-3 es mucho mayor que la del resto de los picos correspondientes a la amplificación de fragmentos de los genes *ACTB*, *HER2* y *GSTM1*. Además, también es mayor que la altura del pico correspondiente al amplicón del gen *CCNE1* en las células A2780 (Figura 39A). Por tanto, cualitativamente, parece que la metodología propuesta permite distinguir variaciones en el número de copias de un gen. Desde el punto de vista cuantitativo, utilizando las curvas de calibrado de la Figura 38, se pueden determinar el número de copias de los tres genes en estudio en las células analizadas, OVCAR-3 y A2780. Los resultados obtenidos revelaron un aumento en el número de copias de $2,64 \pm 0,41$ (media \pm SD, $n = 3$) del gen *CCNE1* en las células OVCAR-3 comparadas con las células A2780. Teniendo en cuenta que el número normal de copias de un gen en

una célula es 2, este aumento implica que el número de copias del gen *CCNE1* en la línea celular OVCAR-3, determinado por la metodología propuesta, es de 6. Puesto que está descrito en algunos trabajos que gen *CCNE1* está presente en alrededor de seis copias en el genoma de las células OVCAR-3 [336,337], en comparación con las dos copias presentes en las células A2780, que carecen de amplificación del gen *CCNE1* [336,337], estos resultados demuestran la utilidad de la metodología desarrollada para la determinación de CNVs.

Además, como ya se ha comentado, la eficiencia de amplificación mediante PCR múltiple de los genes *HER2* y *CCNE1* son muy parecidas, ya que las pendientes de las correspondientes rectas de calibrado (Figura 38) tienen valores de $1,15 \pm 0,04$ y $0,99 \pm 0,03$ para *HER2* y *CCNE1*, respectivamente. Por esta razón, estos genes se pueden utilizar como control de referencia uno de otro para calcular sus respectivos números de copias, sin necesidad de utilizar una recta de calibrado, en un planteamiento similar a lo que se hace normalmente en la determinación por qPCR [101]. De esta manera, si se compara la amplificación del gen *CCNE1* con la del gen *HER2*, en la línea celular OVCAR-3, el cociente entre las áreas de los picos de los amplicones de ambos genes, corregidas teniendo en cuenta el tamaño del amplicón, es de $2,63 \pm 0,24$ (media \pm SD, $n= 3$) muy próximo al obtenido utilizando las rectas de calibrado ($2,64 \pm 0,41$). Teniendo en cuenta que las células OVCAR-3 no tienen amplificación del gen *HER2*; es decir, presentan 2 copias, y que la amplificación de *CCNE1* es de 2,63 veces la de *HER2*, el número de copias del gen *CCNE1* en la línea celular OVCAR-3 se estima en 6, lo que concuerda con el valor obtenido utilizando las rectas de calibración, y el encontrado en la bibliografía [336].

De forma análoga, los cocientes entre las áreas de los picos de los amplicones correspondientes a los genes *GSTM1* y *CCNE1*, y entre las de los genes *GSTM1* y *HER2*, en la línea A2780, fueron de $0,57 \pm 0,07$ (media \pm SD, $n= 3$) y $0,58 \pm 0,09$, (media \pm SD, $n= 3$), respectivamente; y el cociente entre las áreas de los picos de los amplicones de los genes *GSTM1* y *HER2* en las células OVCAR-3, fue de $0,57 \pm 0,05$ (media \pm SD, $n= 3$). Teniendo en cuenta que hay dos copias tanto del gen *CCNE1* como del gen *HER2* en el genoma de las células A2780, y también dos copias del gen *HER2* en las células OVCAR-3, estos resultados parecen indicar que estas líneas celulares son heterocigóticas para

el gen *GSTM1*; es decir, que el número de copias de este gen en ellas es de 1. En este caso no existen datos en la bibliografía que corroboren este resultado. Sin embargo, se sabe que el 50% de la población Caucásica es homocigota para el alelo nulo del gen *GSTM1* [327,338], por lo que es esperable que el 40% de esta población sea heterocigótica para dicho alelo nulo; es decir, tenga una única copia del gen *GSTM1* en su genoma. No sería raro, por tanto, que ambas líneas celulares fuesen heterocigotas para *GSTM1*, como parecen indicar los resultados obtenidos. Como ya se ha comentado, la ausencia de *GSTM1* genera deficiencias en la respuesta a agentes genotóxicos. Esta deficiencia en copias del gen *GSTM1* no ha sido estudiada debido a que es prácticamente imposible distinguir entre individuos con una o dos copias del gen. Parece claro que la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral puede identificar individuos heterocigotos, permitiendo el análisis de la influencia del número de copias del gen *GSTM1* en la respuesta a la exposición de ciertos agentes genotóxicos, como los utilizados en quimioterapia del cáncer, por ejemplo.

Considerando todos los resultados que se acaban de describir, parece claro que la metodología de PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS desarrollada es adecuada para la determinación cuantitativa de CNVs. La cuantificación puede llevarse a cabo utilizando una curva de calibrado, o utilizando simplemente un gen de referencia con un número de copias conocido, y con una eficiencia de amplificación adecuada.

Por último, para evaluar la exactitud de la determinación de CNVs por el método propuesto, se compararon estos resultados con los obtenidos mediante una metodología ya establecida, como es la qPCR. Para ello, se realizaron ensayos de qPCR, de reacción única, para cada uno de los genes en estudio (*HER2*, *CCNE1* y *GSTM1*, usando de nuevo *ACTB* como control) utilizando 50 ng de ADN genómico de las células OVCAR-3 y A2780.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo de forma individual para cada uno de los genes (*ACTB*, *HER2*, *CCNE1* y *GSTM1*) en placas de 96 pocillos, utilizando el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y los mismos cebadores que en el proceso de PCR múltiple (Tabla 2). La mezcla de reacción se compone de: 10 μ L del Kit de PCR Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 μ L de cada

cebador (concentración final de 0,25 μM), 2 μL de ADN molde (25 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y agua ultrapura hasta un volumen final de 20 μL . El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 10 min at 95°C (desnaturalización inicial) y 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturalización) y 60 s a 60°C (hibridación más elongación).

En primer lugar, se evaluó la eficiencia de amplificación de cada uno de los genes analizados. Para ello, se trazaron las rectas de calibrado para cada uno de ellos utilizando cinco disoluciones patrón de ADN en el rango de 5 pg a 50 ng. En todos los casos, se obtuvo una buena linealidad en todo el rango ensayado, con buenos coeficientes de correlación ($R^2 > 0,99$), y eficiencias de amplificación muy similares para todos los genes, entre 0,90 y 1,10. A continuación, se utilizó el software SDS 2.3 y RQ Manager de Applied Biosystems para establecer el valor del ciclo umbral (C_t , *Cycle Threshold*) para cada reacción. Con este ciclo umbral se calculó el número de copias como un valor relativo, comparando el ciclo umbral para cada gen en la línea celular OVCAR-3 (muestra) con respecto al ciclo umbral para ese gen en la línea A2780 (calibrador o muestra control), ambos comparados a su vez con el ciclo umbral del gen de referencia (*ACTB*), en cada línea celular. Este tipo de método de cuantificación relativo se conoce como $\Delta\Delta C_t$ [339], donde $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ del gen de interés en la muestra}) - (\Delta C_t \text{ del gen de interés en el calibrador})$, siendo $\Delta C_t = (C_t \text{ del gen de interés}) - (C_t \text{ del gen de referencia})$. Se realizó un triplicado técnico por experimento, y tres experimentos independientes para cada gen en cada línea celular. Los resultados obtenidos mostraron un incremento del número de copias del gen *CCNE1* de $2,88 \pm 0,75$ (media \pm SD, $n=3$) en la línea celular OVCAR-3 (muestra), con respecto a la línea celular A2780 (control). Este resultado está en concordancia con el resultado obtenido mediante la metodología desarrollada en este trabajo, de $2,64 \pm 0,41$ (media \pm SD, $n=3$), ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos, en un test t de Student de dos colas ($p=0,65$).

Por lo tanto, a la vista de los resultados, parece evidente que la metodología de PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS desarrollada para la determinación de CNVs permite obtener resultados cuantitativos tan fiables como los de la qPCR, pero con la ventaja de permitir el análisis de CNVs de varias secuencias de forma simultánea en una única reacción. La determinación por qPCR podría hacerse de forma múltiple,

pero sería necesario utilizar sondas fluorescentes específicas, mucho más caras que el SYBR Green, estando el ensayo restringido al número de fluoróforos que el equipo puede determinar de forma simultánea. Además, la utilización de sondas fluorescentes puede generar sus propios inconvenientes, como la inhibición del proceso de PCR o la unión preferencial a secuencias concretas, entre otros [149]. Por último, pese a que en este trabajo se realizó el ensayo para cuatro genes, es teóricamente posible ampliar el número de genes estudiados, permitiendo determinar CNVs de forma simultánea en un número de genes mayor que el que se pueda analizar mediante qPCR.

D.1.8.- Determinación de cambios en la expresión génica de varios genes de forma simultánea

Como ya se ha comentado, los genes escogidos para el análisis de la expresión génica mediante la metodología de RT-PCR múltiple, en combinación con GE-ICP-MS, fueron: *BAX*, *CTR1* y *ERCC1*, que están implicados en la resistencia de las células tumorales al cisplatino, y el gen *ACTB*, que se seleccionó como gen endógeno de referencia (gen cuya expresión permanece constante). La metodología desarrollada se aplicó al análisis de cambios en la expresión de estos genes entre las líneas celulares A2780 y A2780cis, sensible y resistente, respectivamente, a la acción del cisplatino [340].

Para ello, en primer lugar, fue necesario estudiar si las condiciones de GE-ICP-MS establecidas como las más adecuadas para la separación de los fragmentos de ADN de 50 pb hasta 500 pb (Tabla 6), y utilizadas para el análisis de CNVs, eran adecuadas para separar los amplicones obtenidos mediante RT-PCR múltiple de los fragmentos de los genes de interés: *ACTB* (111 pb), *BAX* (182 pb), *CTR1* (250 pb) y *ERCC1* (321 pb). Por tanto, se analizaron, utilizando las condiciones de GE-ICP-MS de la Tabla 6, los productos procedentes de la RT-PCR múltiple. Las condiciones de la RT-PCR múltiple utilizadas se recogen en la Tabla 4. En la Figura 40 se muestra el electroferograma obtenido para una cantidad de ADN complementario (ADNc) equivalente a 18,8 ng de ARN procedente de células A2780. Como se puede ver existe una buena separación de

los cuatro amplicones correspondientes a los genes en estudio que, además, están bien separados del pico del PI.

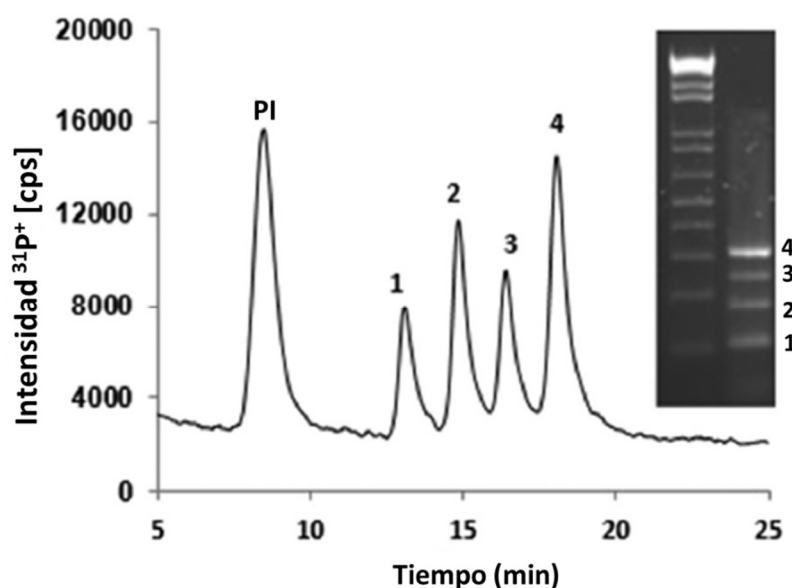


Figura 40.- Electroferograma obtenido por GE-ICP-MS del producto de una reacción de RT-PCR múltiple utilizando 18,8 ng de ARN de células A2780. Los diferentes picos se corresponden con: PI, estándar interno de PO_4^{3-} ; 1, ACTB; 2, BAX; 3, CTR1; 4, ERCC1. Se muestra también la imagen de esta muestra obtenida en la electroforesis convencional de un gel de agarosa con detección con bromuro de etidio.

A continuación, con las condiciones de trabajo optimizadas (Tablas 4 y 6), se analizaron distintas cantidades iniciales de ADN complementario (equivalentes a entre 0,5 y 50 ng de ARN) con el fin de obtener una recta de calibrado (área de pico del amplicón/área de pico del PI vs el logaritmo de la cantidad de ADNc), necesaria para evaluar el intervalo en el que existe una relación lineal entre la cantidad inicial de ARN y el producto de RT-PCR múltiple, para cada uno de los genes amplificados. Una vez establecido el intervalo lineal (desde 0,5 hasta 50 ng de ARN), se escogió una cantidad de 18,8 ng de ARN, que permitía detectar diferencias entre los distintos amplicones obtenidos. Esta cantidad de ARN inicial, extraído de las líneas celulares A2780 y A2780cis, se utilizó para estudiar variaciones de la expresión génica mediante la metodología desarrollada. Se realizaron tres experimentos independientes para cada línea celular, y los resultados se presentaron como la media del *fold-change* para cada gen; es decir, cuantas veces se expresa más el gen en estudio, normalizado con un gen

D.- Resultados y discusión

de referencia (*ACTB*), en la muestra de células resistentes (A2780cis) con respecto a una muestra control de células sensibles (A2780). Se utilizaron los intervalos de confianza (IC), calculados como la media \pm 1,96 Error estándar (SE, *Standard Error*), para determinar si los *fold-change* obtenidos eran estadísticamente diferentes de 1.

Para calcular estos *fold-change*, el área del pico en los electroferogramas obtenidos mediante GE-ICP-MS de cada uno de amplicones de los genes de interés en las células A2780cis se comparó con el área del pico del gen de referencia (*ACTB*) en dicha muestra, y el valor así obtenido se comparó con el valor correspondiente en la muestra control (células A2780). Los resultados obtenidos, expresados como media \pm SE (n=3), se muestran en la Figura 41.

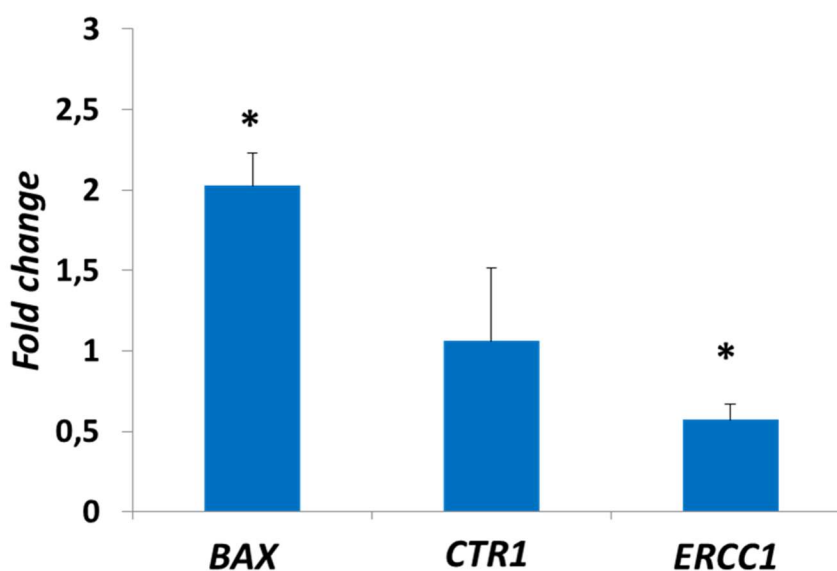


Figura 41.- Expresión diferencial, *fold-change*, de los genes *BAX*, *CTR1* y *ERCC1* con respecto al gen *ACTB*, en la línea celular A2780cis en comparación con la línea celular A2780 obtenidos mediante RT-PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS. El asterisco indica que los resultados obtenidos son estadísticamente diferentes de 1.

Como se puede ver, existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes *BAX* y *ERCC1* entre las líneas celulares A2780cis y A2780. El gen *BAX* se expresa 2,03 veces más en la línea celular A2780cis que en la A2780, *fold-change* $2,03 \pm 0,23$ (IC 1,57-2,49), al contrario de lo descrito en la bibliografía para otras líneas celulares resistentes al cisplatino [331]; por el contrario, el gen *ERCC1* se expresa menos en la línea celular A2780cis que en la A2780, *fold-change* $0,57 \pm 0,10$ (IC 0,39-0,80), en discrepancia también con los datos bibliográficos para otras líneas

celulares resistentes al fármaco [329]. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en las líneas celulares resistentes utilizadas en dichos trabajos, en la línea celular A2780cis la resistencia se debe fundamentalmente a una menor entrada del fármaco en las células [340,341], lo que podría explicar las diferencias en expresión de los genes entre distintos tipos de líneas celulares resistentes al cisplatino. Por último, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen *CTR1* entre las líneas celulares A2780cis y A2780, *fold-change* $1,06 \pm 0,45$ (IC 0,04-2,08), aunque en la bibliografía se ha descrito una menor expresión de este gen en células resistentes [330].

Para comprobar si las diferencias de nuestros resultados con los resultados publicados eran debidas al tipo de líneas celulares analizadas, se determinó la diferente expresión génica de los genes en estudio entre las células A2780cis y A2780, utilizando una técnica ya establecida para el análisis de la expresión génica, la RT-qPCR. En este caso, el análisis se realizó mediante reacciones individuales para cada uno de los genes (*CTR1*, *BAX*, *ERCC1*), utilizando también el gen *ACTB* como gen de referencia. Se utilizaron sondas de hibridación *TaqMan*[®], de Applied Biosystems, para detectar la amplificación por PCR a través de la emisión de fluorescencia. Las sondas utilizadas fueron las siguientes: Hs00977266_g1 para *CTR1*, Hs00180269_m1 para *BAX*, Hs01012158_m1 para *ERCC1* y Hs01060665_g1 para *ACTB*. Las reacciones de qPCR individuales se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La mezcla de reacción estaba compuesta por: 5 μ L del Kit de PCR TaqMan Universal Mastermix II (Applied Biosystems), 0,5 μ L de la sonda, 4 μ L de una dilución 1:8 del ADNc y agua ultrapura hasta un volumen final de 10 μ L. El programa de amplificación fue el siguiente: 2 min a 50 °C y 10 min a 95°C (desnaturalización inicial), y 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturalización) y 60 s a 60°C (hibridación más elongación).

A continuación, se utilizó el software SDS 2.3 y RQ Manager de Applied Biosystems para establecer el valor del ciclo umbral (Ct, *Cycle Threshold*) para cada reacción. Con este ciclo umbral se calcularon los valores del *fold-change* para cada gen de interés; es decir, cuantas veces más se expresa el gen en estudio, normalizado con un gen de referencia (*ACTB*), en la muestra de células resistentes (A2780cis)

D.- Resultados y discusión

comparada con una muestra calibrador, o control, de células sensibles (A2780). Para ello, se calculan los valores de $\Delta\Delta Ct$ [342], como: $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ del gen de interés en la muestra}) - (\Delta Ct \text{ del gen de interés en el calibrador})$, siendo $\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de interés}) - (Ct \text{ del gen de referencia})$ y, a partir de estos valores, el valor del *fold-change*, como: $fold-change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Se realizó un triplicado técnico por experimento y tres experimentos independientes, obteniendo valores promedio de *fold-change* para cada uno de los genes, y se utilizaron los intervalos de confianza (IC), calculados como la media \pm 1,96 SE para determinar si los valores de *fold-change* obtenidos eran estadísticamente diferentes de 1. Los resultados obtenidos, expresados como media \pm SE (n=3), se presentan en la Figura 42.

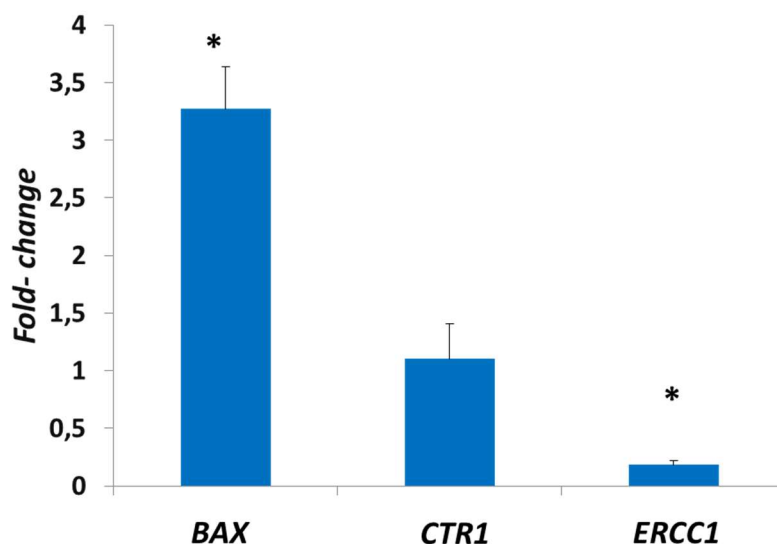


Figura 42.- Expresión diferencial, *fold-change*, de los genes BAX, CTR1 y ERCC1 en la línea celular A2780cis en comparación con la línea celular A2780 obtenidos mediante RT-qPCR. El asterisco indica que los resultados obtenidos son estadísticamente diferentes de 1. Se utilizó el gen ACTB como control de expresión.

En la figura se puede ver como el gen BAX se expresa 3,27 veces más en la línea celular A2780cis que en la A2780, *fold-change* 3,27 \pm 0,36 (IC 2,56-3,98). El gen ERCC1, en cambio, se expresa menos en la línea celular A2780cis que en la A2780, *fold-change* 0,18 \pm 0,04 (IC 0,11-0,26). Por último, la expresión del gen CTR1 no mostró variación entre ambas líneas celulares, *fold-change* 1,10 \pm 0,3 (IC 0,50-1,71). Estos resultados son equivalentes a los obtenidos mediante la metodología de RT-PCR múltiple en

combinación con GE-ICP-MS, desarrollada en este trabajo (Figura 41), en cuanto a la variación de la expresión de estos genes en la línea celular A2780cis con respecto a la A2780: aumento de la expresión del gen *BAX*, disminución de la expresión de *ERCC1*, y expresión similar del gen *CTR1* en ambas líneas.

Por tanto, a pesar de las diferencias encontradas con la bibliografía, la nueva metodología desarrollada para la determinación de variaciones en la expresión génica de varios genes de forma simultánea puede ser tan fiable como la RT-qPCR individual para cada uno de los genes. Sin embargo, las sondas Taqman utilizadas para el análisis mediante RT-qPCR son caras y limitan la aplicabilidad de la metodología a la determinación simultánea de varios genes al número de sondas disponibles con distintos fluoróforos. Además, el procesamiento de los datos está supeditado a softwares de análisis que difieren en ocasiones en su rendimiento. A diferencia de la metodología de RT-qPCR, la metodología desarrollada de RT-PCR con detección por GE-ICP-MS desarrollada no necesita marcaje fluorescente, por lo que permite un análisis múltiple sin tantas limitaciones. Además, el análisis de los datos es más directo e independiente de softwares de análisis.

D.2.- Desarrollo de una metodología de inmuno-PCR con detección mediante ICP-MS para la determinación altamente sensible de HER2 en fluidos biológicos

D.2.1.-Introducción

Como ya se ha expuesto en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación exacta y sensible de biomarcadores tumorales específicos, que pueden estar en concentraciones muy bajas y en matrices complejas, es de gran interés actualmente [343]. Esto adquiere especial importancia si los biomarcadores tienen relevancia para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Esta proteína de membrana es un biomarcador utilizado de forma rutinaria en la práctica clínica, tanto para el diagnóstico como para el pronóstico del cáncer de mama, debido a que ciertos tumores, que presentan niveles elevados de HER2 (denominados HER2 positivos), se caracterizan por tener un comportamiento biológico muy agresivo y un mal pronóstico [184].

La proteína HER2 puede estar sujeta a procesos de rotura proteolítica, lo que da lugar a la aparición, en sangre, de su dominio extracelular (ECD, *Extracellular Domain*) en forma libre [171,172]. Se ha demostrado que los niveles séricos elevados del ECD de HER2 (por encima del valor clínico de corte de $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, considerado como no patológico [214,344]) se correlacionan con un aumento de los niveles de HER2 en el tejido tumoral, especialmente en el caso del cáncer de mama metastásico [194]. Por tanto, la información de la concentración del ECD de HER2 en suero podría servir como biomarcador [194]. En este sentido, existe un gran interés en demostrar la utilidad clínica de la determinación de HER2 en suero como biomarcador de agresividad tumoral y predictivo para el seguimiento de las terapias anti-HER2 en cáncer de mama [173,345,346], pudiendo evitar así biopsias invasivas y limitar el análisis a biopsias líquidas.

La determinación del ECD de HER2 en suero, y otros fluidos biológicos, se lleva a cabo mediante ensayos ELISA [214]. Sin embargo, estos ensayos pueden presentar limitaciones de sensibilidad si la proteína a determinar está presente en concentraciones muy bajas [214]. Una forma de incrementar la sensibilidad de los ensayos ELISA es utilizar moléculas marcadoras, unidas a los anticuerpos de detección, que se puedan determinar con alta sensibilidad [217]. En este sentido, el marcaje de anticuerpos con fragmentos de ADN que pueden ser amplificados, posteriormente, mediante PCR, ha dado lugar a la técnica conocida como inmuno-PCR (IPCR) [219,347] que, como ya se ha comentado, combina la especificidad de los inmunoensayos con el poder de amplificación exponencial de la PCR. La cuantificación de los productos de PCR, normalmente mediante qPCR, lleva a un aumento en la sensibilidad cuando se compara con un ELISA equivalente [348], y ha permitido la aplicación de la técnica a la determinación de numerosos antígenos proteicos, incluidos biomarcadores tumorales [235,349]. Sin embargo, como ya se ha indicado anteriormente, la qPCR no está libre de limitaciones, y los resultados obtenidos pueden no ser reproducibles debido a la presencia de contaminantes en la muestra que inhiben parcialmente la Taq polimerasa, y/o el apareamiento de los cebadores [154]. Además, para la determinación de múltiples fragmentos de ADN simultáneamente se necesitan sondas fluorescentes sin superposición espectral, lo que limita la aplicabilidad de la técnica [145].

Por tanto, el objetivo de este segundo capítulo de la Tesis Doctoral fue investigar el potencial analítico de una nueva estrategia de IPCR que combina la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, con la capacidad de amplificación de la PCR convencional, y con una técnica de cuantificación alternativa a la qPCR basada en el empleo del ICP-MS. Esta técnica permite, como se ha demostrado en el capítulo anterior, la determinación, sin necesidad de ningún tipo de marcaje, de los productos (amplicones) obtenidos mediante PCR simple, o múltiple, monitorizando el fósforo presente en dichos productos.

Para cumplir este objetivo, se desarrolló una metodología de IPCR, en combinación con ICP-MS, para la determinación de concentraciones biológicamente relevantes del ECD de HER2 en suero y en el sobrenadante de células tumorales en

cultivo. Para ello, en primer lugar, se diseñó un inmunoensayo tipo sándwich utilizando un anticuerpo de captura, inmovilizado en una placa, y un anticuerpo de detección biotinilado, al que se une, de forma secuencial un fragmento de ADN biotinilado (marcador) mediante el empleo de estreptavidina. Posteriormente, el fragmento de ADN marcador se amplifica mediante PCR convencional y el producto obtenido se cuantifica mediante ICP-MS. Por último, se establecieron las características analíticas de la metodología desarrollada y se compararon con las obtenidas mediante un ensayo ELISA convencional usando los mismos anticuerpos de detección y captura; y se evaluó su aplicabilidad mediante el análisis de muestras de suero humano y del sobrenadante de células tumorales en cultivo.

D.2.2.- Optimización de la síntesis y la amplificación del fragmento de ADN marcador biotinilado

Para realizar los ensayos de IPCR se necesita un fragmento de ADN marcador, ya sea un fragmento de doble cadena o un oligonucleótido de cadena sencilla, para que actúe como molde en la PCR que se realiza tras el inmunoensayo. En este trabajo se utilizó como marcador un fragmento de ADN de doble cadena con un grupo biotina en su extremo 5', lo que permite su unión de forma secuencial, mediante estreptavidina, a un anticuerpo de detección también biotinilado.

La síntesis del ADN marcador biotinilado se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 123 pb del plásmido pUC19, una molécula de ADN circular de doble cadena con 2686 pb (Sigma-Aldrich). En la Figura 43 se muestra la secuencia del plásmido y del fragmento de 123 pb del ADN marcador biotinilado amplificado (en azul). Se incluye también (en verde) la parte de este ADN marcador que se amplificará posteriormente en el proceso de inmuno-PCR.

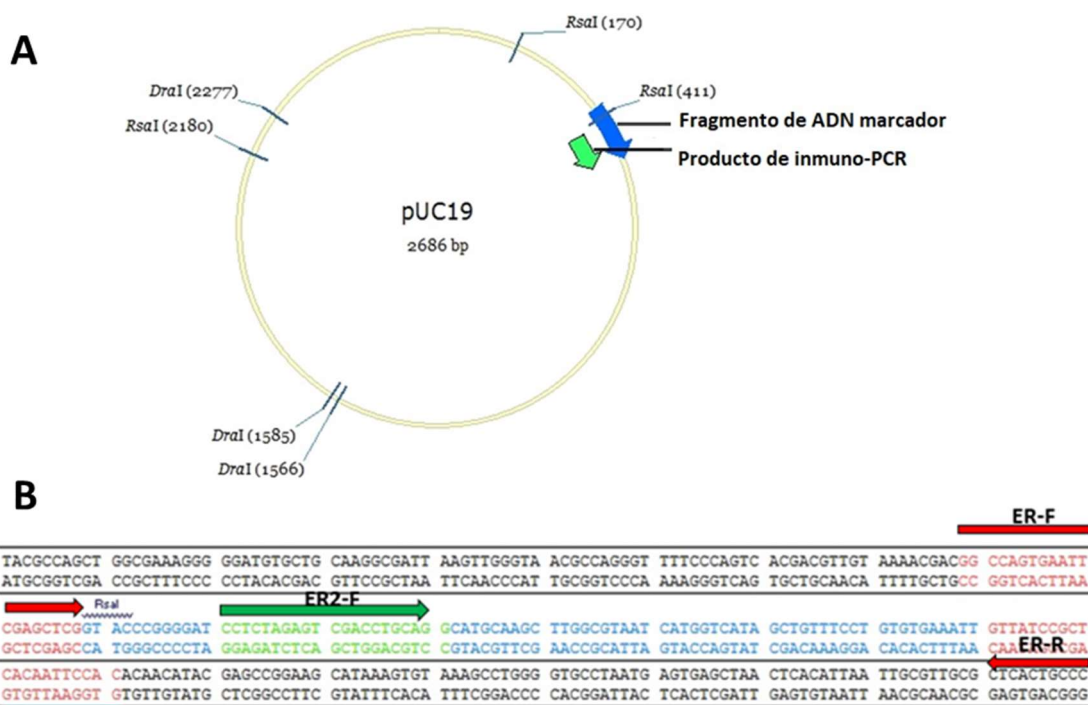


Figura 43.- A. Plásmido pUC19, donde se muestra en color azul el fragmento de ADN amplificado que se utiliza como ADN marcador y en color verde la parte de este fragmento de ADN que se amplificará en el ensayo de inmuno-PCR. B. Parte de la secuencia de plásmido pUC19, donde se muestran la secuencia del ADN marcador (rojo, azul y verde), la de los cebadores utilizados para su amplificación (rojo) y la de la parte de dicho ADN marcador que se amplificará en el ensayo de inmuno-PCR (verde y azul).

El diseño experimental, y el de los cebadores, para la obtención del ADN marcador de 123 pb, se llevó a cabo utilizando los programas *Primer3 Input* y *Vector NTI* [332,350]. Se utilizó un cebador directo (F, *forward*) biotinilado en 5', con secuencia 5' biotina-GGCCAGTGAATTCGAGCTCG 3' (cebador ER-F en la Figura 43), y un cebador inverso (R, *Reverse*) de secuencia 5' GTGGAATTGTGAGCGGATAAC 3' (cebador ER-R en la Figura 43). La PCR se realizó en el equipo Sure Cyler 8800 (Agilent Technologies) en las siguientes condiciones: 1 μ L del plásmido pUC19 (18,25 μ g· μ L⁻¹), 4 μ L del tampón de PCR (pH 8,0) 10x; 0,2 mM de los dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 150 nM de cada cebador; 2,5 U de la enzima BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) y agua ultrapura hasta un volumen final de 40 μ L. El programa de amplificación fue el siguiente: 5 min a 50°C (desnaturalización inicial), seguido de 40 ciclos de 45 s a 95 °C (desnaturalización), 45 s a 60 °C (hibridación) y 30 s a 72 °C (elongación), y finalmente 10 min a 72 °C (elongación final).

D.- Resultados y discusión

El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis convencional, en gel de agarosa al 2%, y detección con bromuro de etidio, en las condiciones del apartado C.4.4. para comprobar que tenía el tamaño deseado. Para ello, se comparó la posición de las bandas obtenidas con las del marcador de tamaño, una escalera de ADN que contiene fragmentos de 100 pb hasta 12000 pb (1kb Plus DNA ladder, Invitrogen). Los geles se visualizaron con el equipo Gene Flash de Syngene. El electroferograma obtenido se muestra en la Figura 44, donde se puede observar que el producto de la amplificación fue un fragmento de ADN de alrededor de 120 pb, por lo que parece haberse amplificado el fragmento deseado. Además, no se detectaron bandas adicionales, producidas por amplificación inespecífica, por lo que el producto fue adecuado para utilizarlo como marcador en el ensayo de IPCR. Para ello, el producto de PCR obtenido se purificó utilizando el kit comercial Illustra GFX PCR DNA and gel band purification Kit y se determinó su concentración mediante espectroscopía de fluorescencia, utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay, que emplea un agente intercalante fluorescente para generar fluorescencia proporcional a la concentración de ADN, y el fluorímetro Qubit 2.0 para medir la fluorescencia generada.

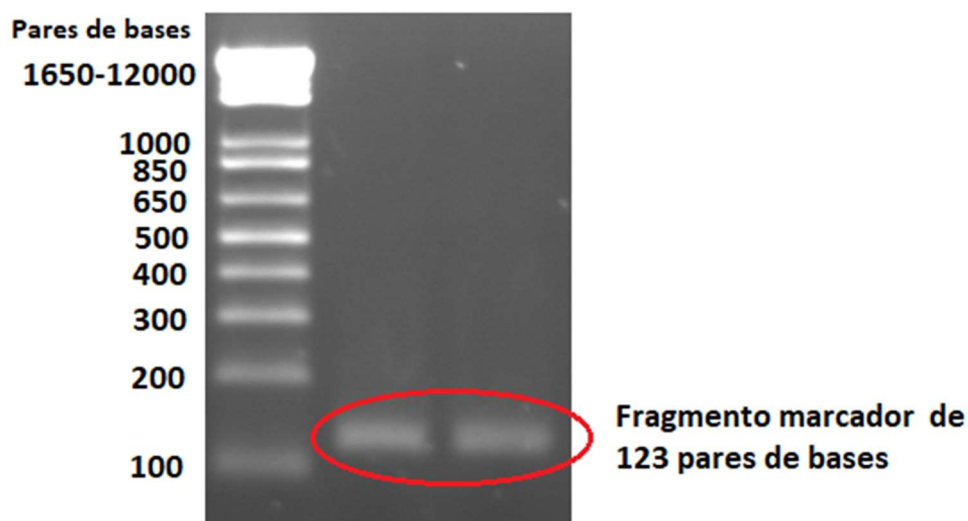


Figura 44.- Electroferograma del producto de PCR obtenido (derecha de la imagen) y del marcador de tamaño (izquierda de la imagen). Se muestra el producto de dos reacciones independientes para comprobar que el producto obtenido es siempre el mismo.

Una vez sintetizado el fragmento de 123 pb de ADN marcador biotinilado, se procedió a optimizar su amplificación mediante PCR. Para ello, se seleccionó una pareja de cebadores que permitan amplificar una parte del ADN marcador que tenga un tamaño adecuado, en concreto 91 pb, para que se amplifique de manera eficiente mediante PCR. Los cebadores seleccionados: 5'CCTCTAGAGTCGACCTGCAGG3', cebador directo, y 5'GTGGAATTGTGAGCGGATAAC3', cebador inverso. Utilizando estos cebadores se estudiaron los parámetros más importantes que afectan a la especificidad y eficiencia de la PCR, como son: la concentración de los cebadores, el número de ciclos, y las temperaturas y los tiempos de desnaturalización, hibridación y elongación. Todo este proceso de optimización se realizó comprobando los resultados de cada PCR mediante electroforesis convencional en gel de agarosa al 2%, como se describe en el apartado C.4.4. En la Tabla 7 se recogen las condiciones de PCR finalmente seleccionadas para la amplificación de un fragmento de 91 pb del ADN marcador. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 40 μL y se utilizó una alícuota de 10 μL de una disolución del ADN marcador de 0,835 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$.

Tabla 7.- Condiciones de la PCR para la amplificación de un fragmento de 91 pb utilizando como molde el ADN marcador biotinilado.

Mezcla de reacción	
Reactivos	Volumen o concentración
ADN marcador biotinilado (molde)	10 μL de una disolución de (0,835 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$)
Tampón de PCR (pH 8,0) 10x	4 μL
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Cebador directo: 5'CCTCTAGAGTCGACCTGCAGG 3'	100 nM
Cebador inverso: 5' GTGGAATTGTGAGCGGATAAC3'	100 nM
Enzima polimerasa (BIOTAQ™ DNA polymerase)	2,5 U
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 40 μL

D.- Resultados y discusión

Programa de amplificación			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	
Desnaturalización	95	45 s	35
Hibridación	60	45 s	
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	10 min	

En la Figura 45 se muestra el electroferograma obtenido del producto de la PCR realizada con las condiciones de la Tabla 7. Se puede ver que dicho producto tiene un tamaño ligeramente inferior a 100 pb, lo que encaja con el tamaño esperado 91 pb. Además, utilizando estas condiciones, la concentración del producto obtenido (amplicón) se espera que sea proporcional a la cantidad de ADN inicial utilizada como molde para la PCR [323], al igual que ocurrió en el capítulo anterior de esta Tesis Doctoral.



Figura 45.- Electroferograma del producto de PCR obtenido en la amplificación del fragmento de 91 pb utilizando el ADN marcador como molde (derecha de la imagen) y del marcador de tamaño, escala de ADN (izquierda de la imagen).

D.2.3.- Optimización del protocolo del inmunoensayo para la determinación de HER2

El esquema del ensayo de inmuno-PCR diseñado se representa en la Figura 46. El ensayo se realizó utilizando los reactivos del kit comercial ErbB2 (HER2) Human ELISA Kit, de Thermo Fisher Scientific, que es un ensayo ELISA tipo sándwich en placa, diseñado para detectar y cuantificar el nivel de HER2 humano en suero, plasma o medio de cultivos celulares. El estándar del kit es una proteína HER2 recombinante liofilizada, que se reconstituye con el diluyente suministrado con el kit. El kit se utilizó de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante, pero introduciendo una serie de modificaciones para adaptarlo a un ensayo de IPCR. En primer lugar, fue necesario realizar un tratamiento de la placa de 96 pocillos, en la que está inmovilizado el anticuerpo de captura de HER2, para evitar interacciones secundarias inespecíficas. Para este fin, se ensayaron diferentes reactivos: albúmina de suero bovino, ADN de timo de ternera y ADN de espermatozoos de salmón. Los mejores resultados se obtuvieron con el ADN de espermatozoos de salmón, en términos de eliminación de señales después de realizar el ensayo de IPCR en los controles negativos (blancos del ensayo).

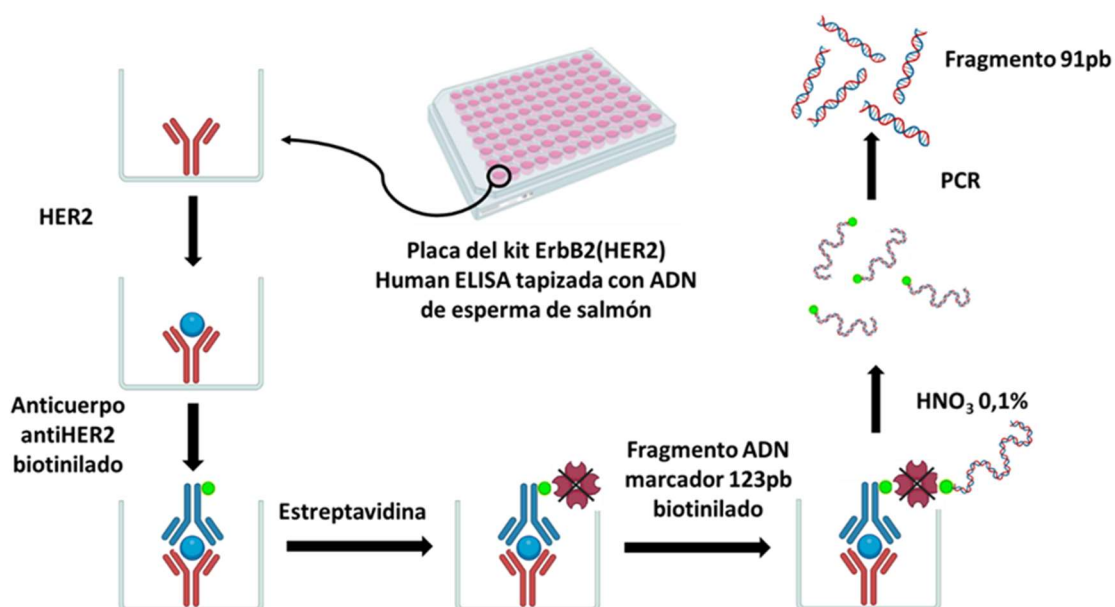


Figura 46.- Esquema del procedimiento experimental del ensayo de inmuno-PCR secuencial tipo sándwich llevado a cabo. El producto final es un fragmento de ADN de cadena doble de 91 pb.

D.- Resultados y discusión

Una vez bloqueada la placa con el ADN de esperma de salmón, se realizó el ensayo de IPCR mediante la adición secuencial de la disolución patrón de HER2, el anticuerpo de detección biotinilado, la estreptavidina y, finalmente, el ADN marcador biotinilado, como se muestra en el esquema de la Figura 46. El procedimiento experimental fue el siguiente: la placa se trató con 200 μL por pocillo de una disolución de 1 g L^{-1} de ADN de esperma de salmón en PBS, y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente y 48 h a 4°C. A continuación, se lavó dos veces con tampón de lavado, y se adicionaron 100 μL por pocillo de la disolución patrón de HER2 suministrada por el kit comercial, con la concentración adecuada. Tras una incubación de 2,5 h a temperatura ambiente y con agitación, se descartó el sobrenadante y se lavó la placa 4 veces con el tampón de lavado. Después del lavado, se añadieron 100 μL del anticuerpo de detección biotinilado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 4 lavados y se añadieron 100 μL por pocillo de la disolución de estreptavidina, se incubó durante 45 min con agitación y tras lavar de nuevo 4 veces, se añadieron a cada pocillo 100 μL de una solución de 0,835 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ del ADN marcador biotinilado, de 123 pb. Se incubó la mezcla durante una hora con agitación y se realizaron 7 lavados con el tampón de lavado. Por último, se añadieron en cada pocillo 25 μL de ácido nítrico al 0,1% para romper la unión estreptavidina-biotina y dejar libre el ADN marcador, y, tras 1 min de incubación, se recogió todo el contenido del pocillo (sobrenadante). Una alícuota de este sobrenadante se utilizó para la amplificación mediante PCR.

Un ensayo de inmuno-PCR se basa en que la cantidad de producto formado en la PCR (amplicón) es proporcional a la concentración del antígeno (HER2) reconocido por el anticuerpo de captura. Por lo tanto, una vez establecido el protocolo más adecuado para llevar a cabo el inmunoensayo, es necesario optimizar la cantidad de ADN marcador procedente de dicho inmunoensayo que se tiene que amplificar mediante PCR, con el fin de asegurar que el producto obtenido sea proporcional a la concentración de HER2 en la muestra. Para ello, se realizó el inmunoensayo utilizando distintas concentraciones de HER2 (en el rango de 8,19 hasta 2000 pg/mL). Para cada una de estas concentraciones se recogió el sobrenadante después del tratamiento con ácido nítrico, y se amplificaron mediante PCR distintas alícuotas del mismo, con las

condiciones de la Tabla 7. El producto obtenido se analizó mediante electroforesis convencional en gel de agarosa al 2% (ver apartado C.4.4.) En la Figura 47 se muestran los electroferogramas obtenidos para las distintas alicuotas del sobrenadante (disolución del ADN marcador procedente del inmunoensayo) analizadas: 4 μL (Figura 47A), 7 μL (Figura 47B) y 10 μL (Figura 47C). Además de las muestras con distinta concentración de estándar de HER2, se realizaron controles negativos tanto del inmunoensayo como de la PCR, con todos los componentes de la muestra menos la proteína HER2 y el ADN marcador, respectivamente.

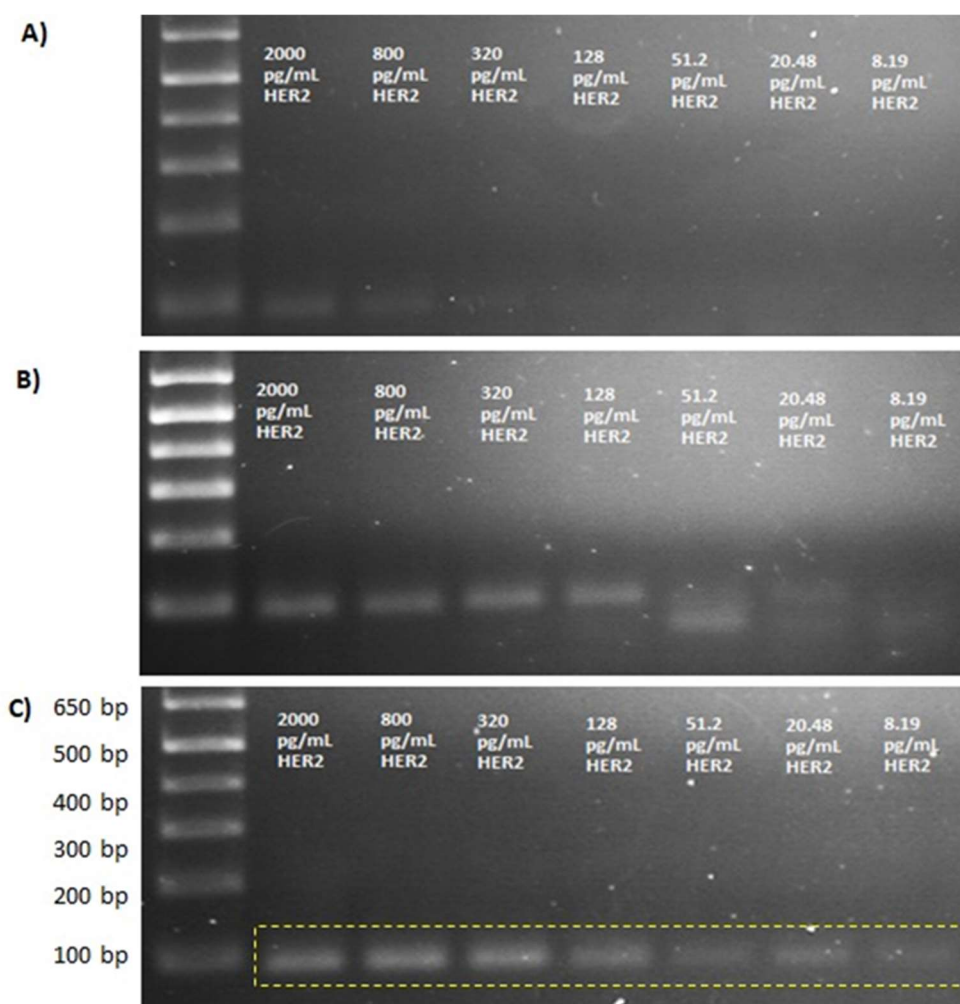


Figura 47.- Electroforesis en gel de los productos de las PCR correspondientes a diferentes concentraciones iniciales de HER2 (entre 8,19 y 2000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), y realizadas con distintas alicuotas de la disolución del ADN marcador procedente del inmunoensayo: A) 4 μL B) 7 μL y C) 10 μL .

Como se puede ver, las bandas del amplicón apenas son detectables en las dos concentraciones más altas cuando se utilizan 4 μL del sobrenadante procedente del inmunoensayo para la PCR (Figura 47A), lo que indica que la concentración del ADN

marcador en dicho sobrenadante es muy pequeña para las concentraciones de HER2 ensayadas. Usando 7 μL (Figura 47B), es posible visualizar la banda del amplicón en la mitad de las concentraciones de HER2. Sin embargo, las bandas del amplicón sólo se pueden visualizar para todas las concentraciones de HER2 ensayadas cuando se utilizan para la PCR 10 μL (Figura 47C) de la solución del ADN marcador procedente del inmunoensayo. En este caso, todas concentraciones muestran una sola banda que corresponde a un fragmento de ADN de aproximadamente 91 pb (tamaño del amplicón esperado) cuya intensidad va aumentando a medida que aumenta la concentración de HER2. Por lo tanto, se seleccionó un volumen de 10 μL para todos los estudios posteriores.

D.2.4.- Cuantificación de los productos de inmuno-PCR mediante ICP-MS

Una vez establecidas las condiciones de trabajo del inmunoensayo para la detección de HER2 y de la posterior amplificación por PCR del ADN marcador, el último paso en el desarrollo de la metodología fue la cuantificación del producto de PCR mediante ICP-MS. Dado que solo se observa una banda de electroforesis después de la amplificación (ver Figura 47), lo que significa que solo está presente una molécula que contenga fósforo en la disolución, la concentración del amplicón puede ser determinada directamente mediante ICP-MS, monitorizando la señal de fósforo mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*).

Para ello, los productos de la PCR fueron purificados utilizando el kit Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit, lavando tres veces con tampón de lavado y eluyendo en un volumen final de 80 μL de agua ultrapura. A continuación, cada uno de los productos de PCR purificados se cuantificaron mediante ICP-MS monitorizando el fósforo con un ICP-MS de triple cuadrupolo (Thermo iCAP-TQ, Thermo Fisher Scientific). Todas las medidas se realizaron en modo triple cuadrupolo (*mass-shift approach*), utilizando oxígeno como gas de reacción en la celda, a un flujo de 0,28 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, para formar los iones $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, con una relación m/z de 47. De esta manera se eliminan las interferencias poliatómicas que afectan a la medida del $^{31}\text{P}^+$, como se

describe en la Figura 30 del apartado C.1.1. El resto de las condiciones de trabajo utilizadas para las medidas se recogen en la Tabla 8. La optimización de estas condiciones se realizó diariamente utilizando una disolución multielemental de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ${}^7\text{Li}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{115}\text{In}$ y ${}^{238}\text{U}$.

Tabla 8.- *Parámetros instrumentales utilizados para la medida de fósforo mediante ICP-MS de triple cuadrupolo.*

Parámetro	
Equipo	Thermo iCAP-TQ
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	$14,00 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flujo de gas portador	$1,0071 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$
Flujo de gas auxiliar	$0,80 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$
Modo de medida	Triple cuadrupolo
Flujo del gas de reacción	$0,28 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de O_2
Nebulizador	MicroMist™
Cámara de nebulización	Ciclónica
Temperatura de la cámara de nebulización	$2,7 \text{ }^\circ\text{C}$
Q1 bias	0,00 V
Qcelda bias	-6,38 V
Q3 bias	-12,00 V
Masa Q1	31 u
Masa Q3	47 u

D.- Resultados y discusión

La introducción de las muestras en el ICP-MS se realizó mediante un sistema FIA utilizando como transportador HNO_3 al 0,1%, a un flujo de $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La muestra se inyectó en el sistema mediante una válvula Rheodyne (modelo 9725), con un bucle de inyección de PEEK de $20 \mu\text{L}$. Con este sistema, y utilizando las condiciones de trabajo de la Tabla 8, se determinó el contenido de fósforo en la muestra procedente de la realización del ensayo de inmuno-PCR para distintas concentraciones de HER2 ($8,19\text{-}2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para ello, se utilizó una recta de calibrado obtenida con disoluciones patrón de PO_4^{3-} medidas con el mismo sistema FIA.

Una vez determinada, mediante ICP-MS, la concentración de fósforo en el producto de PCR (proporcional a la concentración del amplicón), es posible trazar una curva de calibrado representando dicha concentración frente al logaritmo de la concentración de HER2. La Figura 48 muestra la curva de calibrado promedio obtenida para el análisis de los productos de la PCR procedentes de cuatro ensayos de inmuno-PCR independientes.

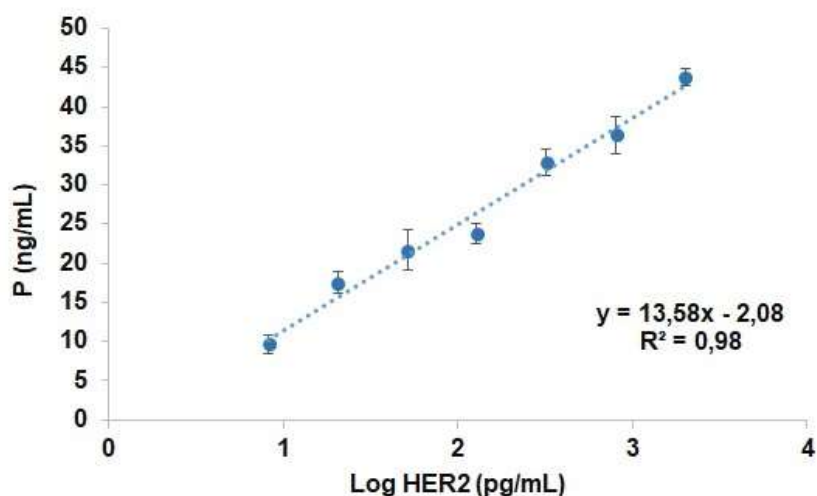


Figura 48.- Curva de calibrado obtenida representando la concentración de P en el amplicón frente al logaritmo de la concentración de HER2. La curva es el promedio de cuatro experimentos independientes realizados en cuatro días diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar entre días de las medidas ($n = 4$). Se muestra también la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación.

Como se puede observar, los datos obtenidos se pueden ajustar a una línea recta (ecuación de la recta, concentración de P del amplicón vs log concentración de

HER2, $y=13,58x-2,08$; $R^2=0,98$). Por lo tanto, la metodología desarrollada de inmunoprecipitación (IPCR) en combinación con ICP-MS permite la determinación de la concentración de HER2 en todo el rango de concentraciones ensayadas, desde 8,19 hasta 2000 pg/mL.

Además de presentar un rango dinámico lineal muy grande (dos órdenes de magnitud), la metodología de IPCR-ICP-MS desarrollada presenta un límite de detección, calculado como $3S_a/b$ (S_a = desviación estándar de la ordenada en el origen y b = pendiente de la recta de calibrado), de 2,5 pg mL⁻¹, que es menor que los límites de detección reportados para las metodologías ELISA comerciales [351], y un límite de cuantificación, calculado como $10S_a/b$, de 8,3 pg·mL⁻¹. En cuanto a la precisión, evaluada como reproducibilidad entre días, y expresada como la desviación estándar relativa, en tanto por ciento (% RSD, *Relative Standard Deviation*), de cuatro ensayos independientes realizados en cuatro días diferentes para una concentración de HER2 de 20 pg mL⁻¹, fue de un 8%. Estos resultados sugieren que la metodología desarrollada tiene una buena precisión, teniendo en cuenta las variaciones encontradas normalmente para ensayos de PCR independientes [352].

Un aspecto importante de la metodología de IPCR-ICP-MS desarrollada es que la pendiente de la curva de calibrado de la Figura 48 permite establecer un factor de correlación entre la concentración de P del amplicón y la concentración inicial de antígeno (escala logarítmica). Este factor tiene un valor de $13,6 \pm 0,6$ (media \pm SD, $n=4$) y se mantiene prácticamente constante entre días (SD entre días = 0,6, $n=4$). Por lo tanto, se puede utilizar para transformar directamente la concentración de P del amplicón, procedente de la PCR (obtenida fácilmente mediante FIA-ICP-MS), en concentración de HER2. Dado que la respuesta del ICP-MS es independiente de la especie, no es necesario realizar una calibración con disoluciones patrón de HER2 para cada análisis. Por tanto, la combinación del IPCR con ICP-MS presenta las ventajas de la selectividad de los inmunoensayos con la elevada sensibilidad de la cuantificación por ICP-MS del producto de la PCR.

D.2.5.- Aplicación de la metodología desarrollada al análisis de fluidos biológicos

Una vez establecidas las principales características analíticas de la metodología de IPCR-ICP-MS desarrollada, se evaluó su aplicabilidad a la determinación de HER2 en dos tipos de fluidos biológicos. Uno de ellos fue el sobrenadante de cultivos celulares de la línea celular MDA-MB-231, recogido tras 4 días de cultivo en las condiciones descritas en el apartado C.3. Esta línea celular procede de un adenocarcinoma epitelial de mama HER negativo. La metodología también se aplicó al análisis de muestras de suero humano procedentes del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, obtenidas, de acuerdo con las directrices éticas de la institución, de donantes de sangre sanos. Por tanto, la concentración de HER2 esperada en ambos tipos de muestra era muy baja.

Los resultados obtenidos de la concentración de HER2 en el análisis por triplicado tanto del sobrenadante de los cultivos celulares como de las muestras de suero fueron, de acuerdo con lo esperado, muy bajas, con valores de $24,2 \pm 1,4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (media \pm SD, n = 3) y $11,7 \pm 1,6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (media \pm SD, n = 3), respectivamente. Estos valores están muy por debajo del valor clínico de corte de $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [214]. La metodología desarrollada puede proporcionar, por tanto, una medida muy fiable de concentraciones de HER2 clínicamente relevantes en muestras biológicas, ya que permite la dilución de muestra, de forma previa al análisis si es necesario, obteniendo igualmente valores de HER2 dentro del intervalo de medida, pero disminuyendo la influencia que la matriz biológica pueda tener en dicha medida.

Finalmente, con el fin de evaluar la exactitud de la metodología de IPCR-ICP-MS propuesta, se llevaron a cabo ensayos de recuperación en estos dos tipos de muestras, sobrenadante de cultivo celular y suero. Para ello, alícuotas de las muestras se fortificaron con cantidades adecuadas de la disolución patrón de HER2 y, a continuación, se diluyeron (1:4 el sobrenadante del cultivo celular y 1:2 el suero) con el tampón del ensayo, para obtener concentraciones teóricas finales de: 15, 100 y 600 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la proteína añadida. Estas muestras diluidas fortificadas se analizaron por triplicado mediante la metodología propuesta. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9.- Recuperaciones obtenidas en el análisis de muestras de sobrenadante de cultivos celulares y suero humano fortificadas con distintas cantidades de HER2.

Muestra	Concentración de HER2 esperada (pg·mL ⁻¹)	^a Concentración de HER2 obtenida (pg·mL ⁻¹)	Recuperaciones (%)
Sobrenadante de cultivos celulares	21,0	19,2 ± 3,2	92
	106,0	81 ± 23	76
	606,0	451 ± 123	74
Suero humano	20,9	19,7 ± 2,4	94
	105,9	88 ± 28	83
	605,9	503 ± 188	83

^aMedia ± SD, n= 3

Como puede verse, el porcentaje de recuperación promedio de HER2 en el sobrenadante de cultivos celulares oscila entre 74% y 92%, y en el suero entre 83% y 94%. Estos valores confirman que la metodología desarrollada es adecuada para la determinación ultrasensible de HER2 en fluidos biológicos (las recuperaciones obtenidas para un nivel de concentración tan bajo como 20 pg·mL⁻¹ son superiores al 90%) en un amplio rango dinámico.

D.2.6.- Comparación de la metodología de inmuno-PCR-ICP-MS con un inmunoensayo ELISA comercial

Por último, la estrategia de inmuno-PCR-ICP-MS desarrollada se comparó con un ensayo ELISA espectrofotométrico convencional, utilizando el kit comercial ErbB2 (HER2) Human ELISA Kit de Thermo Fisher Scientific, que es el mismo que se utilizó en el ensayo de inmuno-PCR desarrollado. Por lo tanto, todos los reactivos, anticuerpos y estándar de HER2 son iguales en ambos ensayos. Sin embargo, para la detección en el ELISA se utiliza estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), que se une al anticuerpo de detección biotinilado. De esta manera, al añadir el

D.- Resultados y discusión

sustrato del enzima (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) se forma un producto coloreado, cuya absorbancia se mide a 450 nm. El ensayo ELISA se realizó según las recomendaciones del fabricante, tal y como se describe en el apartado C.4.6.

En la Tabla 10 se muestran, con fines comparativos, las características analíticas de las dos metodologías, IPCR-ICP-MS frente a ELISA. La comparación del límite de detección refleja el de la metodología desarrollada de IPCR-ICP-MS es 7 veces menor que el ensayo ELISA. Además, es de esperar que este límite de detección se pueda mejorar utilizando un volumen mayor del sobrenadante del inmunoensayo (sólo se utilizó una alícuota de 10 μL) para la amplificación por PCR. En cuanto a la reproducibilidad entre días, para un nivel de concentración de HER2 de 20 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, el valor %RSD de la metodología de IPCR-ICP-MS (8%) es ligeramente mejor que el del ELISA (13%). Por último, los valores del porcentaje de recuperación, calculado para una concentración de HER2 añadida a la muestra de 100 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtenidos con el ensayo ELISA (113% para el suero y 91% para el sobrenadante de cultivos celulares) son mayores que los obtenidos con la metodología de IPCR-ICP-MS (83% para el suero y 76% para el sobrenadante de cultivos celulares). Esta diferencia podría deberse a posibles pérdidas producidas durante el proceso de limpieza, con minicolumnas de exclusión por tamaños, de los productos de PCR antes de su determinación mediante ICP-MS. En trabajos previos se han descrito pérdidas de hasta un 50%, dependiendo del tamaño del amplicón, durante dicho proceso de limpieza [353].

Tabla 10.- Características analíticas comparadas de las metodologías de IPCR-ICP-MS vs ELISA convencional para la determinación de HER2 en suero y en el sobrenadante de cultivos celulares.

Parámetro	IPCR-ICP-MS	ELISA
^a Límite de detección ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2,5	17
^b Límite de cuantificación ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	8,3	56
^c Reproducibilidad entre días (%RSD, n=3)	8%	13%
	Suero	
	83 \pm 27	113 \pm 28

^d Recuperación (%)	Sobrenadante de cultivos celulares	76 ± 22	91 ± 19
-------------------------------	------------------------------------	---------	---------

^aLímite de detección calculado como: $3S_0/b$ (S_0 : desviación estándar de la ordenada en el origen, b : pendiente de la recta de calibrado)

^bLímite de cuantificación calculado como: $10 S_0/b$

^cDesviación estándar relativa de tres ensayos independientes realizados en tres días distintos para la concentración de $20 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

^dLos valores son la media ± desviación estándar ($n=3$) para una concentración adicionada de 100 pg mL^{-1} .

En los diagramas de barras de la Figura 49 se muestran, de forma comparativa, los resultados obtenidos mediante las dos metodologías, IPCR-ICP-MS y ELISA, en los ensayos de recuperación realizados en los dos tipos de muestras analizadas (suero y sobrenadante de cultivos celulares), y para todos los niveles de concentración de HER2 adicionados a las muestras (15 , 100 y $600 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$), como se describió anteriormente. Para comprobar si los resultados de la concentración de HER2 encontrados en las muestras fortificadas tras su análisis mediante las dos metodologías en estudio eran estadísticamente iguales se utilizó un test de t de Student de dos colas a un nivel de confianza de 95%.

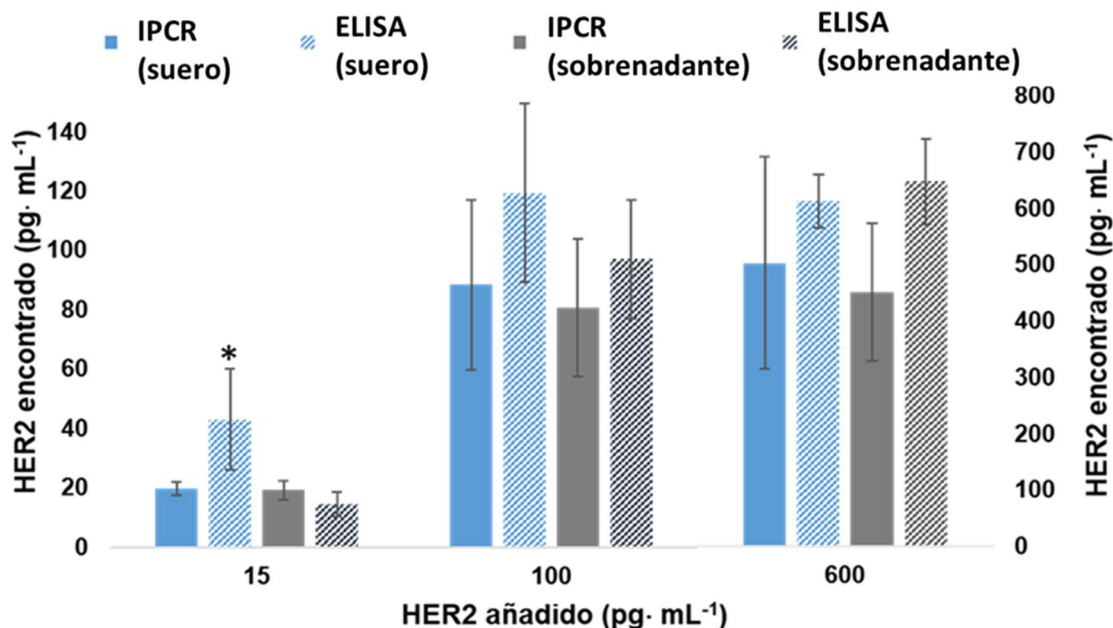


Figura 49.- Comparación de los resultados obtenidos mediante IPCR-ICP-MS y ELISA para la determinación de HER2 en muestras de suero (azul) y de sobrenadante de cultivos celulares (gris) fortificadas con tres niveles de concentración de HER2 (15 , 100 y $600 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$). El eje vertical izquierdo corresponde a la concentración de HER2 encontrada para las adiciones teóricas de 15 y $100 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, y el

D.- Resultados y discusión

*vertical derecho para la de 600 pg·mL⁻¹. Se representan las medias de 3 experimentos independientes, junto con sus respectivas desviaciones estándar (barras de error). * Significativamente mayor que el resultado de IPCR-ICP-MS ($p < 0,05$ en un test t de Student).*

Como se puede ver, se encontró una buena concordancia entre los resultados obtenidos en el análisis de las muestras fortificadas del sobrenadante de cultivos celulares mediante las metodologías de IPCR-ICP-MS y ELISA. Las diferencias encontradas (los valores que se obtienen por IPCR-ICP-MS son siempre menores que los que se obtienen por ELISA), que pueden ser atribuidas a un mayor tratamiento de la muestra y a las pérdidas durante la limpieza del producto de PCR, no son estadísticamente significativas al nivel de confianza del 95% ($p > 0,05$). Las concentraciones de HER2 obtenidas por la metodología propuesta y por ELISA en las muestras de suero fortificadas con 100 y 600 pg·mL⁻¹ de HER2 tampoco son significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre sí. Sin embargo, en el caso de la muestra de suero fortificada con una concentración de 15 pg·mL⁻¹ el resultado obtenido por el método de IPCR-ICP-MS ($19,7 \pm 2,4$ pg·mL⁻¹) es más exacto que el obtenido por ELISA (43 ± 17 pg·mL⁻¹), que es demasiado alto (el suero contenía 20,9 pg·mL⁻¹) y variable. Esto puede ser debido al hecho de que la concentración de HER2 en la muestra de suero sin fortificar con HER2 está muy cerca del límite de detección del ensayo ELISA (17 pg·mL⁻¹, ver Tabla 10). En cualquier caso, los resultados obtenidos muestran las excelentes características analíticas de la metodología de IPCR-ICP-MS desarrollada.

D.3.- Puesta a punto de una estrategia analítica basada en el empleo de anticuerpos marcados con metales y detección por *single cell*-ICP-MS para el estudio de los niveles de HER2 en células individuales de cáncer de mama

D.3.1.- Introducción

Las células que constituyen un tejido, especialmente en el caso de células tumorales, están sujetas a una alta heterogeneidad [236,246], como ya se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Tesis. Es por ello que los resultados que aportan las metodologías convencionales de análisis global de un conjunto de células, ya sea a nivel de genoma, metaboloma, transcriptoma o proteoma, son sólo una aproximación general y, en ocasiones, poco representativa de lo que está pasando en el tejido tumoral en cuestión [238]. Como contrapartida a las metodologías de análisis global, en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias de análisis de células individuales, que proporcionan resultados para cada célula del tejido en estudio, permitiendo obtener una información mucho más representativa, y que refleja de forma más veraz la heterogeneidad celular del tejido analizado [354–356].

En este sentido, hoy en día existe un interés creciente en la determinación de los niveles de HER2 en células individuales, en particular en células tumorales circulantes (CTCs, *Circulating Tumor Cells*) de pacientes con cáncer de mama [357–361], dada la importancia clínica ya comentada de esta proteína como biomarcador en este tipo de cáncer. Las CTCs son una cantidad muy pequeña de células tumorales que se diseminan a través de la sangre del paciente, después de desprenderse del tumor primario, que contribuyen a los procesos de metástasis [362]. La detección e identificación de CTCs se basa en su captura y aislamiento a partir de una muestra de sangre, y el reconocimiento posterior de biomoléculas marcadoras específicas de células tumorales, presentes en la superficie celular, utilizando anticuerpos adecuados marcados con fluoróforos [362–364].

Una de las ventajas principales del análisis de CTCs es que permite obtener información clínicamente relevante del proceso tumoral, sin necesidad de procedimientos invasivos (biopsia del tejido canceroso), ya que el análisis se realiza mediante biopsias líquidas en muestras de sangre [365]. Sin embargo, todavía son escasos los estudios clínicos que permiten definir y validar la relevancia del análisis de CTCs y su traslación a la práctica clínica, tanto para el diagnóstico, como el pronóstico y la evaluación de la respuesta de los tumores ante diferentes terapias. Esta escasez se debe a los desafíos instrumentales asociados con el análisis de células individuales, y a la extremadamente alta sensibilidad requerida para obtener datos concluyentes en muestras de pacientes. En este sentido, la técnica de ICP-MS ha demostrado tener unas excelentes características analíticas para la determinación de elementos metálicos y no-metálicos a nivel de células individuales [257,266,366]. Además, el empleo de un equipo de ICP-MS con un analizador de masas de tiempo de vuelo (ICP-TOF-MS), junto con el uso de anticuerpos marcados con isótopos metálicos para el reconocimiento de antígenos (proteínas), ha dado lugar al desarrollo reciente de una técnica denominada citometría de masas, ya comentada, que permite la detección y cuantificación de decenas de proteínas biomarcadoras en una sola célula, de manera simultánea y con una elevada sensibilidad [254]. En esta técnica se utilizan anticuerpos que contienen isótopos metálicos como marcadores (en lugar de fluoróforos utilizados en citometría de flujo convencional), que se unen a la proteína de interés tanto en la superficie como dentro de la célula. A continuación, las células se introducen individualmente en el equipo de ICP-TOF-MS. Las capacidades de medida de este tipo de analizador de masas permiten la detección, casi simultánea, de diferentes isótopos (y elementos) dentro de la señal transitoria (evento) correspondiente a la ionización de una sola célula en el plasma.

En este tercer y último capítulo de esta Tesis, el objetivo fue desarrollar una estrategia analítica basada en el reconocimiento específico de proteínas con anticuerpos marcados con isótopos metálicos, en combinación con la detección mediante *single cell*-ICP-MS (SC-ICP-MS), para estudiar los niveles de HER2 en suspensiones de poblaciones celulares complejas y su potencial como biomarcador de pronóstico y predictivo en cáncer de mama. Para cumplir este objetivo, se utilizó un

anticuerpo específico anti-HER2, que se marcó con el quelante polimérico comercial MAXPAR, formando complejos con el isótopo ^{175}Lu . Una vez marcado, el anticuerpo se incubó con las células de interés para que pueda reconocer y unirse a la proteína HER2 presente en la superficie celular. Tras el reconocimiento, las células en suspensión se introducen en el ICP-MS, equipado con un sistema de introducción de muestras que permite su análisis a nivel de célula individual mediante la medida del ^{175}Lu . La optimización del procedimiento de reconocimiento y medida mediante SC-ICP-MS se realizó en varias líneas celulares de cáncer de mama con diferentes niveles de la proteína HER2 (MDA-MB-231, SKBR-3 y BT-474). Además, se estudió la selectividad de la metodología desarrollada utilizando, para el reconocimiento, dos anticuerpos diferentes marcados con isótopos metálicos, uno para HER2 (que contiene ^{175}Lu) y otro para el receptor de transferrina 1 (que contiene ^{142}Nd), dentro de la misma población celular. Finalmente, se evaluó el potencial de la metodología propuesta para discriminar células HER2 positivas dentro de una población mixta de células con diferentes niveles de la proteína.

D.3.2.- Marcaje del anticuerpo con lutecio y caracterización del anticuerpo marcado

Para el reconocimiento de la proteína HER2 se utilizó el anticuerpo monoclonal MAB9589, de R&D Systems, capaz de reconocer el dominio extracelular de la proteína HER2 humana [367]. Este anticuerpo se marcó con el isótopo metálico $^{175}\text{Lu}^{3+}$ formando complejo con el reactivo MAXPAR® (ver Figura 27B) que, como ya se comentó en la Introducción General, tiene una estructura polimérica con muchos grupos DTPA, quelantes de iones lantánidos, y un grupo reactivo maleimida para su unión a los grupos tiol del anticuerpo. Para el marcaje se utilizó el kit comercial MAXPAR® X8 Antibody Labeling Kit, de Fluidigm. El procedimiento, que se muestra de forma esquemática en la Figura 50, consiste en la reducción parcial de algunos puentes disulfuro del anticuerpo para generar grupos tiol libres capaces de formar enlaces covalentes con el grupo maleimida del reactivo MAXPAR que, previamente, se había hecho reaccionar con el $^{175}\text{Lu}^{3+}$ para formar los correspondientes complejos con los

D.- Resultados y discusión

grupos DTPA. La reducción del anticuerpo, la reacción del reactivo MAXPAR con el $^{175}\text{Lu}^{3+}$ y la purificación de los productos de ambas reacciones se hicieron de forma simultánea, siguiendo las instrucciones del fabricante.

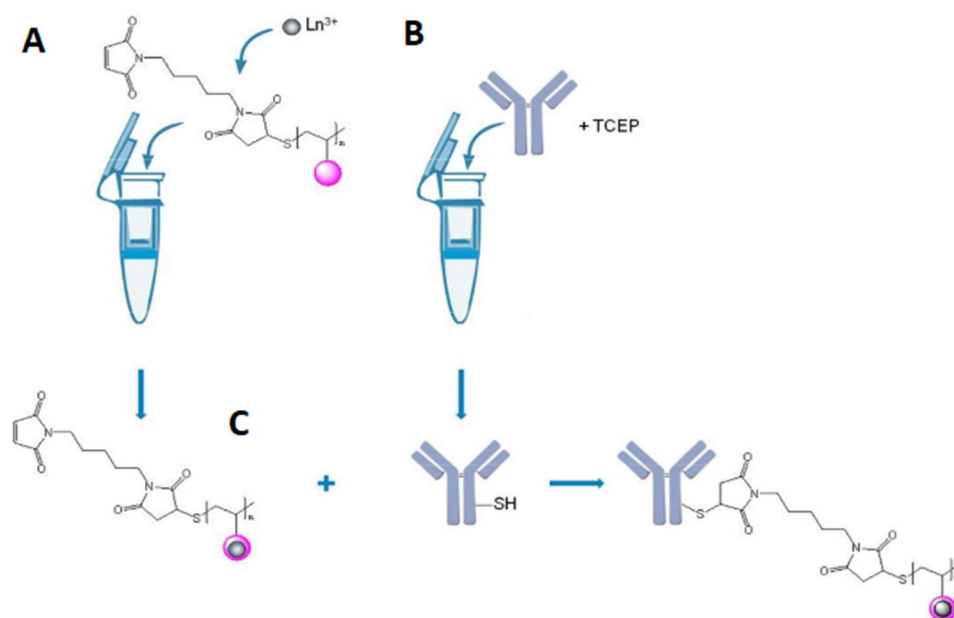


Figura 50.- Esquema de la reacción de marcaje del anticuerpo con el reactivo MAXPAR formando complejos con iones de un lantánido (Ln^{3+}). A: formación del complejo de Ln^{3+} con los grupos DTPA (bola rosa) del MAXPAR; B: reducción parcial del anticuerpo con el reactivo tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP); C: reacción maleimida-tiol entre el complejo con el lantánido y el anticuerpo parcialmente reducido. Esquema extraído de las instrucciones del MAXPAR® Antibody Labeling Kit.

En primer lugar, se realizó la formación del complejo del reactivo quelante MAXPAR con el $^{175}\text{Lu}^{3+}$ resuspendiendo el reactivo quelante en 95 μL de una disolución tampón suministrada por el Kit (tampón L) y añadiendo 5 μL de una disolución comercial 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ del $^{175}\text{Lu}^{3+}$, de tal forma que la concentración final del metal en los 100 μL fuera de 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Se mezcló todo y la mezcla se incubó a 37°C durante 40 min. El producto de la reacción se purificó mediante ultracentrifugación a 12.000 x g con filtros de membrana de 3 kDa, lavando dos veces, la primera con el tampón L y la segunda con el tampón C del kit. Tras la purificación, se resuspendió el complejo formado en 60 μL del tampón C (disolución MAXPAR-Lu). Paralelamente, se llevó a cabo la reducción parcial del anticuerpo. Para ello, se eliminó el tampón en el que se

encontraba el anticuerpo comercial mediante ultracentrifugación de 100 μL de la disolución del anticuerpo en un filtro de membrana de 50 kDa, lavando con 400 μL del tampón R del kit. Tras el lavado, se añadieron al filtro 100 μL de una disolución 4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) en tampón R, y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Tras la incubación, se realizó la purificación del anticuerpo reducido, por ultracentrifugación a 12.000 x g, lavando dos veces con el tampón C. A continuación, la disolución del complejo MAXPAR-Lu en tampón C se transfirió al filtro de 50 kDa, que contenía el anticuerpo reducido, y se incubó la mezcla durante 90 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 μL de tampón W del kit y se centrifugó a 12.000 x g durante 10 min. El lavado se repitió 3 veces más. Finalmente, el conjugado anticuerpo-MAXPAR-Lu se resuspendió en un total de 100 μL de tampón W del kit, y se determinó su concentración midiendo la absorbancia a 280 nm en un Nanodrop 2000c. Para conservar el anticuerpo marcado en disolución, una vez determinada su concentración, se eliminó el tampón W por ultracentrifugación con filtros de 50 kDa, se añadió el volumen adecuado de una disolución de PBS con 0,05% de azida de sodio para que la concentración del conjugado anticuerpo-MAXPAR-Lu fuera de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, y se centrifugó durante 2 minutos a 1.000 x g con el filtro invertido. Esta disolución del anticuerpo marcado se dividió en alícuotas que se guardaron a -20°C hasta su uso.

Una vez realizado el marcaje del anticuerpo con el complejo MAXPAR-Lu, es necesario comprobar su eficacia. Para ello, la disolución del conjugado anticuerpo-MAXPAR-Lu obtenido se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, *Size Exclusion Chromatography*), con una columna Superdex 200 10/300 GL (300 mm x 10 mm i.d., GE Healthcare Bio-Sciences), que tiene un intervalo de fraccionamiento de 10 a 600 kDa. La detección se llevó a cabo mediante ICP-MS monitorizando el ion $^{175}\text{Lu}^+$. Para la separación en la modalidad isocrática se utilizó como fase móvil acetato de amonio 50 mM, pH 7,8, a un flujo de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La columna se calibró previamente con estándares de diferentes proteínas (tiroglobulina 660 kDa, ferritina 450 kDa, inmunoglobulina G 150 kDa, albúmina 66 kDa y alfa-lactoalbúmina 15 kDa). En la Figura 51 se puede ver el cromatograma obtenido para la inyección de 100 μL de una disolución del conjugado diluida con agua.

D.- Resultados y discusión

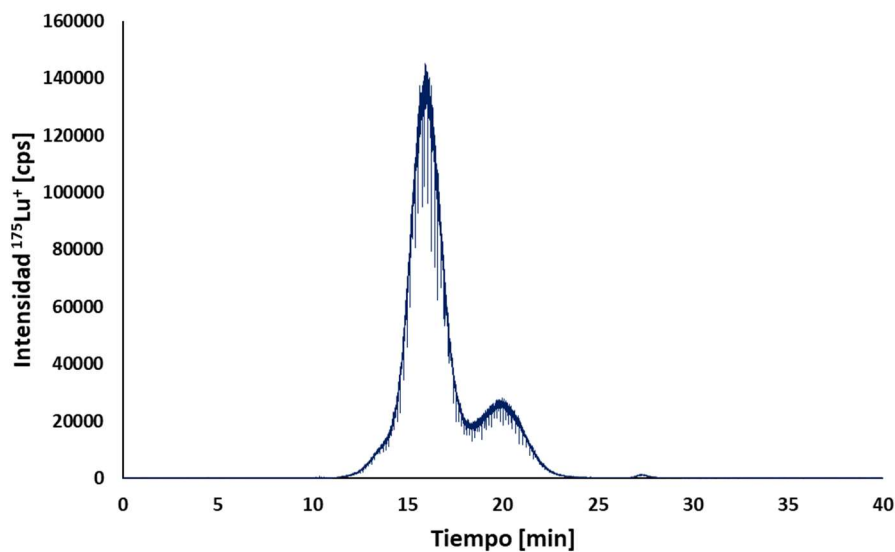


Figura 51.- Cromatograma obtenido mediante SEC-ICP-MS monitorizando $^{175}\text{Lu}^+$, para el anticuerpo conjugado con el complejo MAXPAR- ^{175}Lu .

En este cromatograma se observan dos picos cuya naturaleza se puede asignar por comparación con resultados los obtenidos en trabajos previos de Corte-Rodríguez *et al.* [289] realizados en nuestro Grupo de Investigación, para el análisis, con el mismo sistema de SEC-ICP-MS, de un anticuerpo contra el receptor de transferrina 1 (TfR1) marcado con el complejo MAXPAR- $^{142}\text{Nd}^{3+}$. De esta manera, el primero pico del cromatograma, a un tiempo de retención de alrededor de 16 min, se corresponde con el anticuerpo marcado y su área de pico es el 65% del área total del cromatograma; mientras, el segundo pico eluye a un tiempo de retención de alrededor de 20 min y se corresponde con el exceso del reactivo de marcaje (complejo MAXPAR-Lu) que queda sin reaccionar. Estos resultados revelan, por tanto, que el proceso de marcaje del anticuerpo con el complejo MAXPAR- $^{175}\text{Lu}^{3+}$ ha funcionado de manera adecuada.

Finalmente, se procedió a determinar el número de moles de Lu presentes por cada mol de anticuerpo marcado; es decir, la estequiometría Lu:anticuerpo del anticuerpo marcado. Esta estequiometría depende del número de grupos DTPA quelantes presentes en el reactivo MAXPAR (que no viene indicado por el fabricante), y del número de reactivos MAXPAR que se unen al anticuerpo a través de los grupos tiol generados por reducción, que tampoco se conocen. Por tanto, para estimar dicha

estequiometría se determinó la concentración del anticuerpo marcado en la disolución analizada previamente por SEC-ICP-MS mediante espectrofotometría midiendo su absorbancia a 280 nm. Paralelamente, se determinó la concentración de Lu en esa misma disolución mediante FIA-ICP-MS, utilizando una recta de calibrado con disoluciones patrón de Lu. A partir de las concentraciones así obtenidas, corregidas teniendo en cuenta que, en la disolución analizada, solo el 65% del anticuerpo (según el cromatograma obtenido por SEC-ICP-MS) está marcado con Lu, se calculó un valor para la estequiometría Lu:anticuerpo de 20 átomos de Lu por cada molécula de anticuerpo. Este valor es muy similar al determinado por Corte-Rodríguez *et al.* (Mario Corte-Rodríguez *et al.*) de 21 átomos de Nd por cada molécula de anticuerpo anti-TfRr1, utilizando el mismo procedimiento de marcaje con el kit Maxpar® X8 Antibody Labeling Kit.

D.3.3.- Establecimiento de las condiciones de trabajo para las medidas mediante *single cell*-ICP-MS

Para el análisis de células individuales por *single cell*-ICP-MS (SC-ICP-MS) se utilizó, para la realización de todas las medidas, un equipo de ICP-MS de triple cuadrupolo (Thermo iCAP-TQ, Thermo Fisher Scientific). Este equipo permitió monitorizar, no solo el ^{175}Lu utilizado en el marcaje del anticuerpo, sino también el fósforo, que se utilizó como marcador celular ya que está presente como elemento constitutivo de numerosos componentes celulares (ADN, ARN, fosfolípidos, etc.). La medida del $^{175}\text{Lu}^+$ se realizó en el modo de cuadrupolo simple, mientras que la medida del isótopo $^{31}\text{P}^+$ se realizó en modo de triple cuadrupolo, utilizando oxígeno como gas de reacción en la celda para la formación de $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, lo que permite resolver, como ya se ha comentado anteriormente, las interferencias poliatómicas que afectan a la medida de $^{31}\text{P}^+$. Debido a que el analizador de masas de triple cuadrupolo no permite la medida simultánea de varios isótopos, se realizó la medida de forma secuencial, en la misma muestra, de $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ en primer lugar y de $^{175}\text{Lu}^+$ a continuación. De esta forma, aunque las medidas no fueron simultáneas, proporcionaron información de ambos isótopos (Lu y P) en la misma muestra. El tiempo de adquisición utilizado para cada

D.- Resultados y discusión

isótopo en cada muestra fue de 180 s. El tiempo de integración que se utilizó para las medidas fue siempre de 5 ms, pues se ha demostrado que es el más adecuado para la obtención de un sólo punto de medida por evento celular cuando se trabaja con células eucariotas [368]. El resto de las condiciones de trabajo para las medidas mediante SC-ICP-MS se recogen en la Tabla 11.

Tabla 11.- Parámetros instrumentales utilizados para las medidas mediante SC-ICP-MS.

Parámetro	
Equipo	Thermo iCAP-TQ
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	14,00 L·min ⁻¹
Flujo de gas auxiliar	0,80 L·min ⁻¹
Flujo de gas portador	0,80 L·min ⁻¹
Flujo de gas envolvente	0,31 mL·min ⁻¹
Flujo del gas de reacción	0,31 mL·min ⁻¹ de O ₂
Q1 bias	0,00 V
Qcelda bias	-5,94 V
Q3 bias	-12,00 V
Masa Q1	31 (³¹ P ⁺), 175 (¹⁷⁵ Lu ⁺)
Masa Q3	47 (³¹ P ¹⁶ O ⁺) o 175 (¹⁷⁵ Lu ⁺)
Tiempo de integración (<i>dwel time</i>)	5 ms
Flujo de muestra	0,01 mL·min ⁻¹
Tiempo de análisis	180 s

Para la introducción de las células individuales en el plasma se utilizó un sistema de alta eficiencia, *High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System* (SC-SIS, Glass Expansion, Melbourne, Australia), cuyo esquema se puede ver en la Figura

52. Este sistema está compuesto por un nebulizador concéntrico de vidrio, diseñado para mantener una alta eficiencia de nebulización a bajos flujos de introducción de muestra ($15\text{-}45\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), utilizando un flujo bajo de gas de nebulización (gas portador, Ar) para no comprometer la estabilidad celular; y una cámara de nebulización *on-axis* de flujo laminar, consumo total y bajo volumen, fabricada en vidrio borosilicato. La cámara permite la entrada de un flujo adicional de Ar, a mayor velocidad que el gas del nebulizador, para evitar el depósito de las células del aerosol en las paredes de la cámara, además de facilitar el lavado entre muestras. El transporte, tanto de las suspensiones celulares como de otras disoluciones de limpieza o calibración, hasta el nebulizador del SC-SIS se llevó a cabo mediante una bomba de jeringa de microflujos (SP101i), equipada con una jeringa Hamilton de 1 mL, a un flujo de $10\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, con el fin de minimizar la formación de eventos múltiples debidos a la entrada simultánea de dos o más células en el plasma.



Figura 52.- Representación esquemática del sistema de introducción de muestra de alta eficiencia High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System de Glass Expansion.

Para el tratamiento de datos obtenidos en las medidas mediante SC-ICP-MS, se siguió un procedimiento iterativo basado en la realización de un promedio de la señal de todos los datos, filtrando aquellos cuya intensidad es mayor que 3 veces la

desviación estándar (3σ) sobre la media del conjunto de datos, considerados como eventos celulares. Tras filtrar estos eventos, se vuelve a promediar el conjunto de datos restante y el procedimiento se repite hasta que no se obtengan más datos por encima de 3σ sobre la media. Finalmente, cuando se tienen todos los eventos filtrados, los que sean mayores que 3σ sobre su propia media se descartan también para evitar la cuantificación de eventos causados por dos o más células entrando al sistema simultáneamente [369,370].

D.3.4.- Optimización de proceso de reconocimiento de HER2 en líneas celulares de cáncer de mama

Una vez realizado el marcaje del anticuerpo anti-HER2, y establecidas las condiciones de trabajo más adecuadas para las medidas por SC-ICP-MS, se estudió la aplicabilidad del anticuerpo marcado para el reconocimiento de HER2 a nivel de célula individual, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama con distintos niveles de la proteína. En concreto se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, HER2 negativas, y SKBR-3 y BT-474, HER2 positivas. Las células se cultivaron durante 4 días, partiendo siempre del mismo número de células, para evitar grandes variaciones en el crecimiento celular y en la expresión de la proteína HER2 entre los distintos ensayos. Transcurridos los cuatro días de cultivo en las condiciones descritas en el apartado C.3, las células se lavaron con PBS 1x tres veces y, seguidamente, se recogieron utilizando una disolución de disociación no enzimática comercial Corning™ CellStripper Dissociation Reagent [371], que permite despegar las células de la superficie de cultivo de manera suave reduciendo el riesgo de daño celular asociado al uso de enzimas con actividad proteolítica como la tripsina. Tras centrifugar las células, el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS 1x.

Para realizar siempre del mismo modo el reconocimiento de HER2 en las células, con el anticuerpo portador de la marca metálica, es necesario utilizar siempre el mismo número de estas, para no variar la proporción entre el anticuerpo y las células. Además, también es necesario conocer el número aproximado de células para introducirlas, en una suspensión adecuadamente diluida, en el sistema de SC-ICP-MS.

Por tanto, una vez recogidas las células con el reactivo Corning™ CellStripper Dissociation Reagent se determinó su número mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro de flujo modelo Cytoflex S.

La determinación del número de células por citometría de flujo se realizó por conteo absoluto en suspensiones de aproximadamente $300.000 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$, que se introducen en el citómetro de flujo mediante una bomba peristáltica a un flujo de $60 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Se registró la dispersión del haz de luz láser de una longitud de onda de 488 nm que incide sobre cada célula individual, tanto la dispersión frontal (FSC, *forward scatter*), que da información acerca del tamaño de la célula, como la dispersión lateral (SSC, *side scatter*), que da información de la granulosidad y complejidad de la célula. Esta información se representó en un gráfico de puntos (citograma) de SSC frente a FSC, que se muestra en la Figura 53 para las células BT-474, a partir del cual se lleva a cabo el conteo celular. Para asegurar que se tenían en cuenta sólo células intactas en la determinación del número de células en la suspensión analizada, se ajustó la ventana de la gráfica de dispersión para excluir los restos celulares, los fragmentos de células y las células muertas del recuento de viables (ver Figura 53).

Tras determinar la concentración celular de este modo, se realizó el reconocimiento de las células con el anticuerpo portador de la marca metálica, partiendo siempre de una alícuota con 1×10^6 células. Esta alícuota se centrifugó durante 5 min a $300 \times g$ y el precipitado se resuspendió en 500 μL de formaldehído al 4% (v/v) en PBS, con el fin de mantener fija la estructura de las células. Tras incubar a temperatura ambiente, y sin agitación, durante 15 minutos, se lavó con 500 μL de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% (p/v) en PBS y se centrifugó 5 min a $300 \times g$. A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 μL de una disolución del anticuerpo marcado con una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave, y después se lavó 3 veces con 500 μL cada vez de BSA al 3% (p/v) en PBS, y 5 veces más con 500 μL cada vez de TBS, con una centrifugación después cada lavado, con el fin de disminuir la señal del fondo en la medida de fósforo por SC-ICP-MS. Finalmente, el precipitado obtenido tras el último paso de lavado se resuspendió en 100 μL de TBS. Una alícuota de esta suspensión celular se diluyó, aproximadamente 1:30, con agua ultrapura justo antes de la medida

D.- Resultados y discusión

y se analizó mediante SC-ICP-MS monitorizando la señal de $^{175}\text{Lu}^+$ y $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ en las condiciones de la Tabla 11.

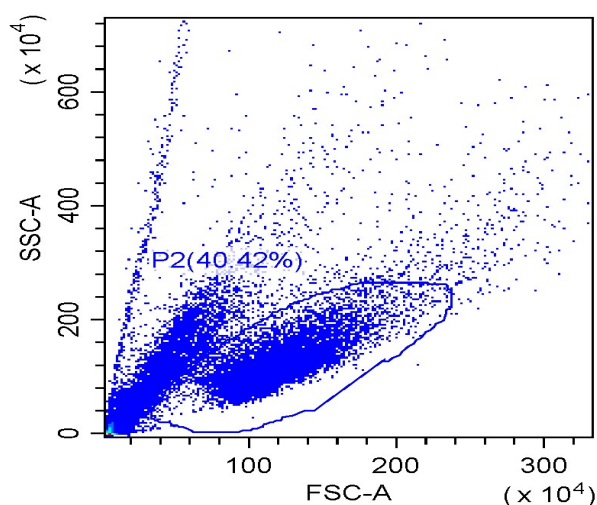


Figura 53.- Diagrama de la dispersión lateral frente a la dispersión frontal obtenido por citometría de flujo de una suspensión de células BT-474. La línea azul delimita la ventana donde las células se consideran viables y se tienen en cuenta en el conteo.

Estos análisis se llevaron a cabo con cuatro líneas celulares, dos HER2 negativas (MDA-MB-231 y MCF-7) y dos HER2 positivas (SKBR-3 y BT-474). Como ejemplo ilustrativo para comparar los resultados para las células HER2 positivas y HER2 negativas, la Figura 54 muestra los eventos detectados para una de las líneas HER2 negativas, la línea MDA-MB-231 (Figuras 54A y 54C), y una de las líneas HER2 positivas, la línea la SKBR-3 (Figuras 54B y 54D).

Como puede observarse en la Figura 54, los eventos de fósforo, utilizado como marcador celular, son comparables en las dos líneas celulares, tanto en la HER2 negativa (Figura 54A), como en la HER2 positiva (Figuras 54B), lo que pone de manifiesto la correcta introducción de las células individuales en el plasma para su análisis. Sin embargo, el número e intensidad de los eventos en la medida de lutecio es significativamente diferente entre las células HER2 negativas (Figura 54C) y las células HER2 positivas (Figuras 54D). Estos resultados ponen de manifiesto que el aumento en el número y en la intensidad de los eventos de lutecio en las células HER2 positivas no se debe a una mayor concentración celular, ni a la medida de eventos múltiples, sino a la presencia de mayores niveles de HER2 en la superficie celular. La detección de algunos eventos de lutecio en las células HER2 negativas (MDA-MB-231) se debe a la

presencia de HER2, en niveles bajos, en la mayoría de las células de cáncer de mama, e incluso en células normales no tumorales [167]. La intensidad de estos eventos está muy próxima al límite de detección instrumental de la técnica de SC-ICP-MS desarrollada, calculado como tres veces la desviación estándar del ruido de fondo (3σ), mismo criterio que el seleccionado como el umbral para la discriminación de los eventos celulares del ruido de fondo.

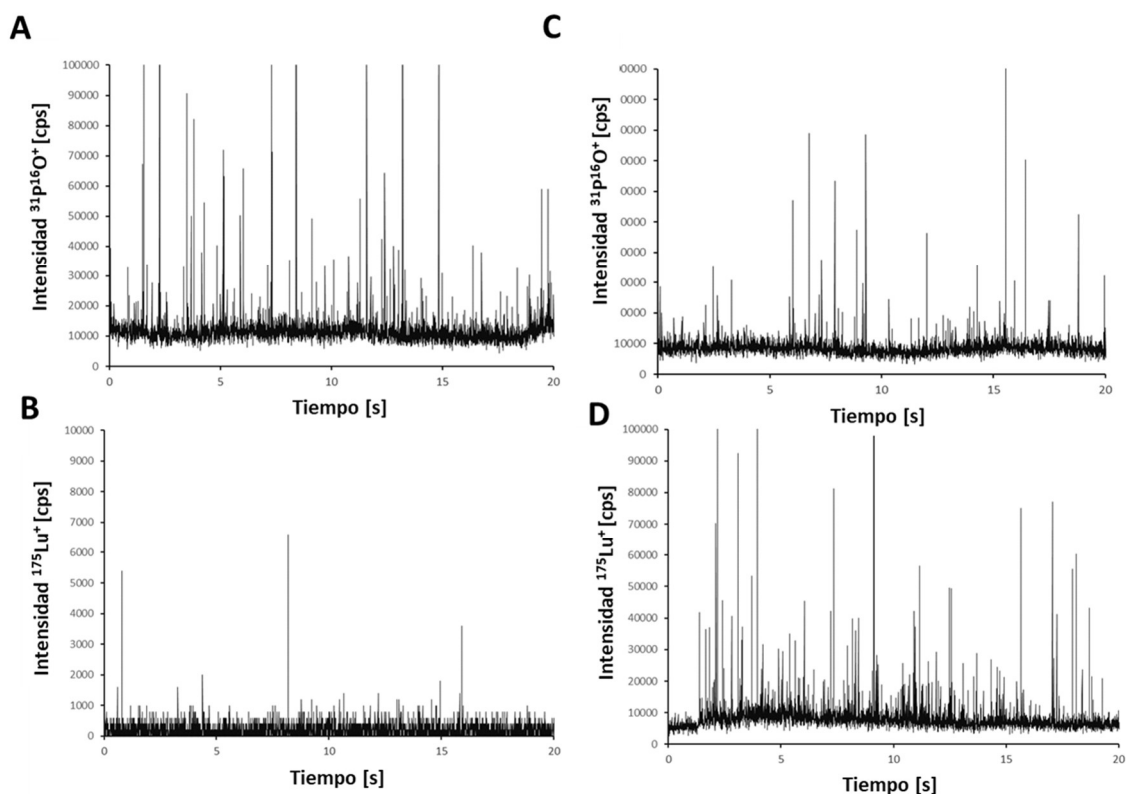


Figura 54.- Eventos celulares registrados para la medida de $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ y $^{175}\text{Lu}^+$ mediante SC-ICP-TQ-MS, después de tratar las células con el anticuerpo anti-HER2 marcado con ^{175}Lu . A) y C) línea celular MDA-MB-231; B) y C) línea celular SKBR-3.

Una vez evaluada la capacidad de la metodología en estudio para el reconocimiento, de forma selectiva, de HER2 en células individuales, el siguiente paso fue la optimización de la cantidad de anticuerpo marcado con Lu que es necesario utilizar para asegurar el reconocimiento de todas las moléculas de HER2 presentes en la superficie celular, manteniendo niveles de fondo bajos. Para ello, se realizó el tratamiento de las células con concentraciones crecientes del anticuerpo marcado: 2, 4, 6, 8 y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando siempre 1×10^6 células. Siguiendo el procedimiento de

D.- Resultados y discusión

trabajo descrito anteriormente, las suspensiones celulares resultantes se analizaron mediante SC-ICP-MS, monitorizando $^{175}\text{Lu}^+$ y $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ (marcador celular) con las condiciones presentadas en la Tabla 11, y se determinó el contenido de lutecio por célula. El estudio se llevó a cabo con las células MDA-MB-231, SKBR-3 y BT-474.

Para determinar la masa de lutecio por célula se realizó un calibrado externo, utilizando disoluciones patrón con concentraciones crecientes de Lu elemental desde 0 hasta $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparadas a partir de una disolución de Lu de $1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en HNO_3 al 1% (v/v), que se preparó a su vez por dilución de una disolución patrón comercial de Lu de $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas disoluciones se midieron en las mismas condiciones que las suspensiones celulares (Tabla 11). En la Figura 55 se puede ver la recta de calibrado obtenida, que se ajusta a la ecuación $y = 2458,2x + 0,475$; $R^2 = 0,9992$. La pendiente (b) de esta recta de calibrado se utilizó para calcular la masa de Lu por célula (m_c), mediante la ecuación que se muestra en la Figura 55 [269], en la que se tiene en cuenta, además de dicha pendiente, la eficiencia de transporte de las disoluciones patrón (η), el flujo de introducción de muestra (F), el tiempo de integración (t) y la intensidad del evento (I). La eficiencia de transporte de las disoluciones patrón, que resultó ser del 69%, se estimó mediante la determinación de la eficiencia de transporte de nanopartículas [369], utilizando un material de referencia certificado, RM 8012 del NIST, de nanopartículas de oro de 30 nm.

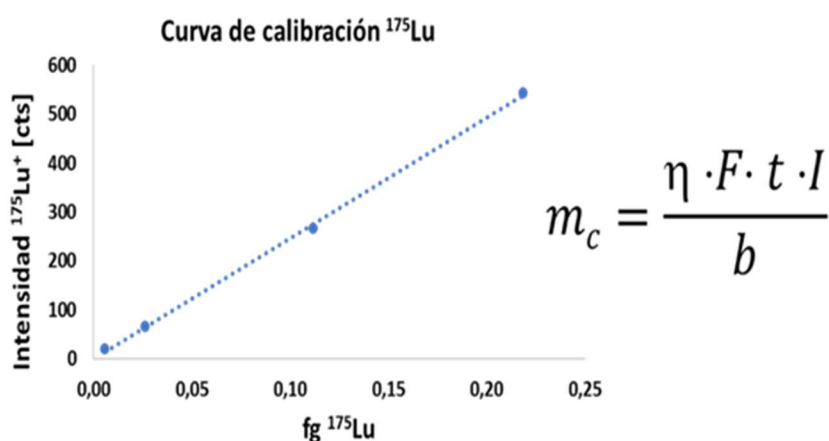
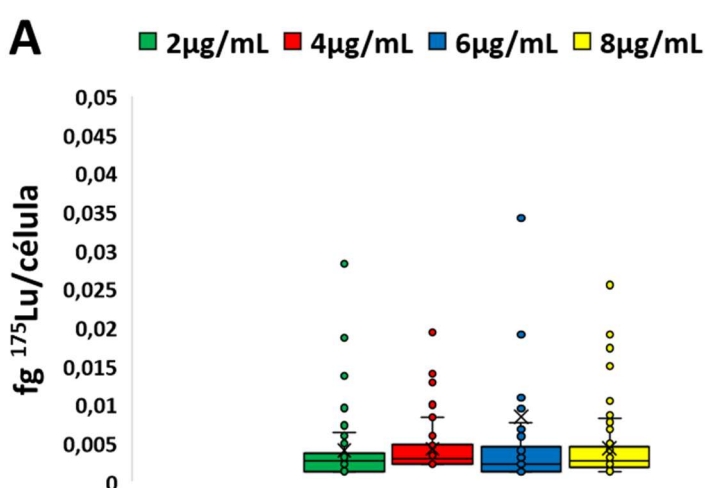


Figura 55.- Curva de calibración obtenida para lutecio elemental y ecuación empleada para determinar la masa de ^{175}Lu presente en cada célula.

Los resultados obtenidos se representan en forma de diagramas de cajas y bigotes en la Figura 56, donde se representa la masa (fg) de Lu por célula para cada una de las líneas celulares analizadas, MDA-MB-231 (Figura 56A), BT-474 (Figura 56B) y SKBR-3 (Figura 56C).

Como se puede ver en la Figura 56, en las células MDA-MB-231 la masa de Lu por célula es independiente de la concentración de anticuerpo utilizada para el reconocimiento (Figura 56A). Dado que esta línea celular se considera HER2 negativa [372], los pocos receptores HER2 presentes de forma constitutiva en la superficie celular pueden ser reconocidos usando la concentración más baja ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de anticuerpo marcado. Por tanto, el empleo de concentraciones más altas de anticuerpo no produce ningún cambio significativo en la señal de Lu por célula, lo que confirma la selectividad de la metodología hacia HER2. Sin embargo, en el caso de las células BT-474 y SKBR-3 (Figuras 56B y 56C, respectivamente), la masa de Lu por célula aumenta al aumentar la concentración del anticuerpo y, en ambos casos, se mantiene prácticamente constante a partir de una concentración de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por lo tanto, esta concentración de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ parece representar una cantidad de anticuerpo marcado lo suficientemente grande como para reconocer la totalidad de la proteína HER2 presente en la superficie celular de las líneas celulares analizadas.



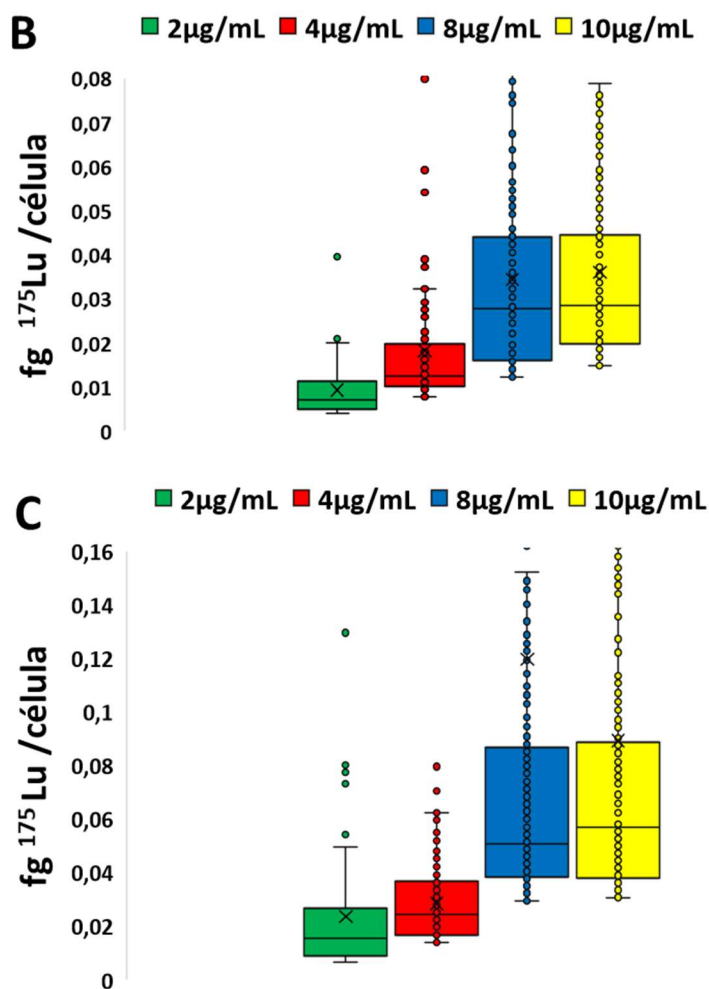


Figura 56.- Diagramas de cajas y bigotes de la masa de Lu por célula ($fg/célula$) obtenido por SC-ICP-MS utilizando distintas concentraciones de anticuerpo marcado con ^{175}Lu (entre 2 y 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$) para el reconocimiento de HER2 en las líneas celulares: MDA-MB-231 (A), BT-474 (B) y SKBR-3 (C).

También se puede observar que la masa de Lu por célula es aproximadamente 2 veces más elevada en la línea celular SKBR-3 que en la línea celular BT-474, a pesar de que ambas líneas celulares tienen el mismo grado de positividad con respecto a HER2 [372]. Esta diferencia puede atribuirse a la diferente morfología que presentan estos dos tipos de células: las BT-474 tienen un diámetro ligeramente más pequeño que las SKBR-3 [373], y se agrupan formando colonias con una fuerte adhesión entre células, mientras que las SKBR-3 son ligeramente más grandes [374], y se pueden distinguir por su crecimiento en forma de racimo de uva, con contacto laxo entre

células [375]. Por tanto, el número de receptores HER2 por área superficial podría ser menor en el caso de las células BT-474 y, en consecuencia, la masa detectada de Lu.

Para comprobar la validez de estos resultados se analizó el contenido de HER2 en el lisado celular de las células MDA-MB-231, BT-474 y SKBR-3 mediante un ensayo ELISA espectrofotométrico utilizando el kit comercial ErbB2 (HER2) Human ELISA Kit de Thermo Fisher Scientific. Para la realización del ensayo se siguió el procedimiento descrito en el apartado C.4.5, utilizando, por pocillo, 100 μL del lisado celular obtenido de acuerdo con el siguiente procedimiento: las células se recogieron y se contaron, tal como se describió anteriormente. Una vez contadas, la suspensión celular, en 1mL de tampón PBS 1x, se centrifugó y el precipitado celular se resuspendió en un tampón de extracción 1x (procedente del kit de ELISA comercial Human Transferrin Receptor ELISA kit, de Abcam), de tal forma que las células estuvieran a una concentración de $1 \times 10^7 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se incubaron entonces en hielo durante 20 minutos, para centrifugarlas posteriormente durante 20 minutos a $18.000 \times g$, y a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para eliminar restos de membranas y células rotas. El sobrenadante se utilizó para el ensayo ELISA.

Los resultados obtenidos en este análisis del lisado celular se transformaron en número de moléculas de HER2 por célula (media \pm desviación estándar, $n= 3$), dividiendo la concentración de HER2 encontrada por pocillo entre el número de células en cada pocillo, para un análisis por triplicado. En la Figura 57 se puede ver la comparación entre los resultados obtenidos por ELISA y los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta de SC-ICP-MS para las distintas líneas celulares analizadas. Como se puede observar, los resultados son cualitativamente comparables: la línea celular MDA-MB-231 (HER2 negativa) presentó una cantidad de HER2 por célula (expresada como moléculas HER2/célula en los resultados del ELISA y como fg Lu/célula en los resultados de SC-ICP-MS) mucho menor que las líneas celulares BT-474 y SKBR-3, HER2 positivas; además, las células SKBR-3 tienen aproximadamente 2 veces más cantidad de HER2 por célula que las células BT-474. Sin embargo, los resultados aportados por el ensayo ELISA no reflejaron la heterogeneidad celular presente en la muestra (lisado celular), pues sólo otorgan un valor promedio de HER2 por célula, sin tener en cuenta las variaciones existentes entre las células de una misma muestra. Por el contrario, en los resultados obtenidos a nivel en células individuales por SC-ICP-MS,

representados en forma de diagramas de cajas y bigotes, puede verse como las distintas células de una muestra presentan una distribución heterogénea de valores de HER2.

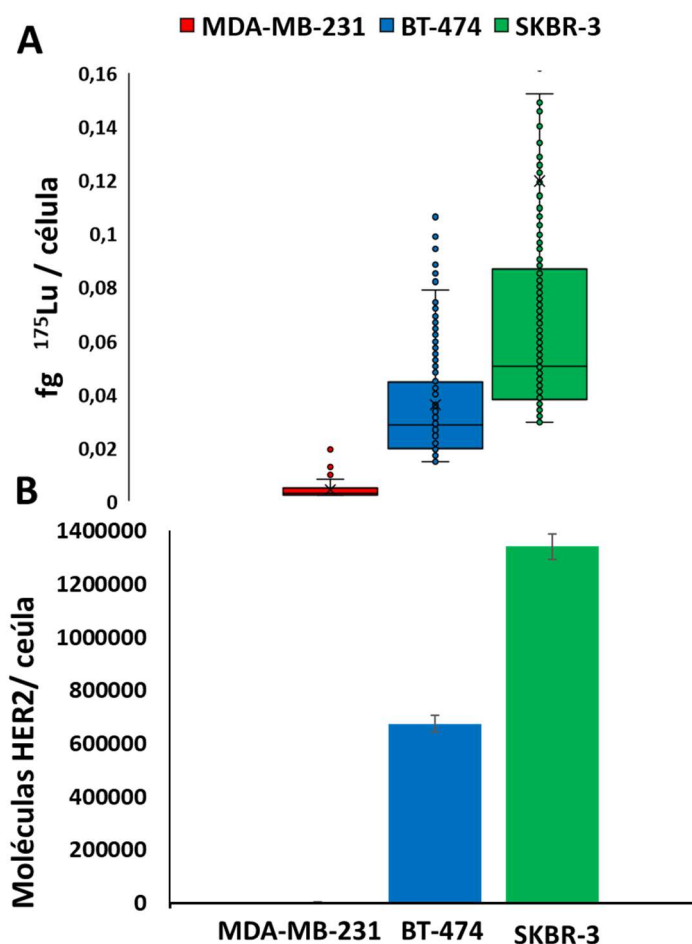


Figura 57.- Resultados obtenidos de la cantidad de HER2 por célula, en las tres líneas celulares analizadas. A) masa de ^{175}Lu /célula obtenida mediante SC-ICP-MS. B) moléculas de HER2/célula (media \pm desviación estándar, $n=3$) obtenida mediante ELISA en el lisado celular.

D.3.5.- Evaluación de las características analíticas de la metodología desarrollada

Con las condiciones óptimas para el reconocimiento de la proteína HER2 en células individuales ya establecidas, junto con las condiciones de medida mediante SC-ICP-MS, se evaluaron las características analíticas de la metodología desarrollada en términos de sensibilidad, límite de detección y selectividad.

Para determinar la sensibilidad de la metodología, se realizó la medida, con las condiciones de la Tabla 11, de estándares de Lu de diferentes concentraciones (desde 0 a 2 ng·mL⁻¹) y se determinó su intensidad. Se utilizó la ecuación de la Figura 55 para calcular la masa de Lu que entra en el plasma en el tiempo de integración, *dwell time*, (considerando que en cada tiempo de integración entra una sola célula en el sistema), con el fin de evaluar la sensibilidad por tiempo de integración. De esta manera, es posible representar la intensidad de Lu de cada uno de los estándares medidos frente a la masa por tiempo de integración de dichos estándares. La pendiente de esta gráfica es la sensibilidad del método de SC-ICP-MS, que resultó ser 1800 ct/ng por tiempo de integración. En cuanto al límite de detección, se calculó como tres veces la desviación estándar del fondo (3σ), mismo criterio que el escogido para discriminar los eventos celulares del fondo, y resultó ser de 0,002 fg Lu/célula.

La selectividad de la metodología desarrollada hacia la proteína HER2 se evaluó, en primer lugar, comparando los resultados obtenidos para las células HER2 positivas y para las células HER2 negativas (Figura 56). Además, también se estudió la selectividad del proceso de reconocimiento utilizando dos anticuerpos distintos marcados con diferentes isótopos metálicos (¹⁷⁵Lu y ¹⁴²Nd) en las mismas líneas celulares. Para ello, las líneas celulares MDA-MB-231 y SKBR-3 se sometieron a un proceso de reconocimiento de forma simultánea con dos anticuerpos, uno contra HER2 (marcado con ¹⁷⁵Lu, el mismo que el utilizado hasta ahora), y otro contra el receptor de transferrina 1 (TfR1, marcado con ¹⁴²Nd), en las condiciones de trabajo descritas en el apartado D.3.4. El anticuerpo anti-TfR1 humana utilizado fue el MAB2474 de R&D Systems, que se marcó con el isótopo ¹⁴²Nd, utilizando el reactivo MAXPAR y siguiendo el procedimiento descrito para el anticuerpo anti-HER2 en el apartado D.3.2. Las células, marcadas con ambos anticuerpos de forma simultánea, se analizaron mediante SC-ICP-MS con las condiciones descritas en la Tabla 11, monitorizando el fósforo (³¹P¹⁶O⁺), como elemento celular constitutivo, y los isótopos ¹⁷⁵Lu⁺ y ¹⁴²Nd⁺. Como las medidas fueron realizadas en un equipo de ICP-MS de triple cuadrupolo, solo pudieron realizarse medidas secuenciales, monitorizando las masas m/z 47, 142 y 175 por separado durante 180s cada una. Los resultados se muestran en la figura 58 en forma de diagramas de cajas y bigotes.

D.- Resultados y discusión

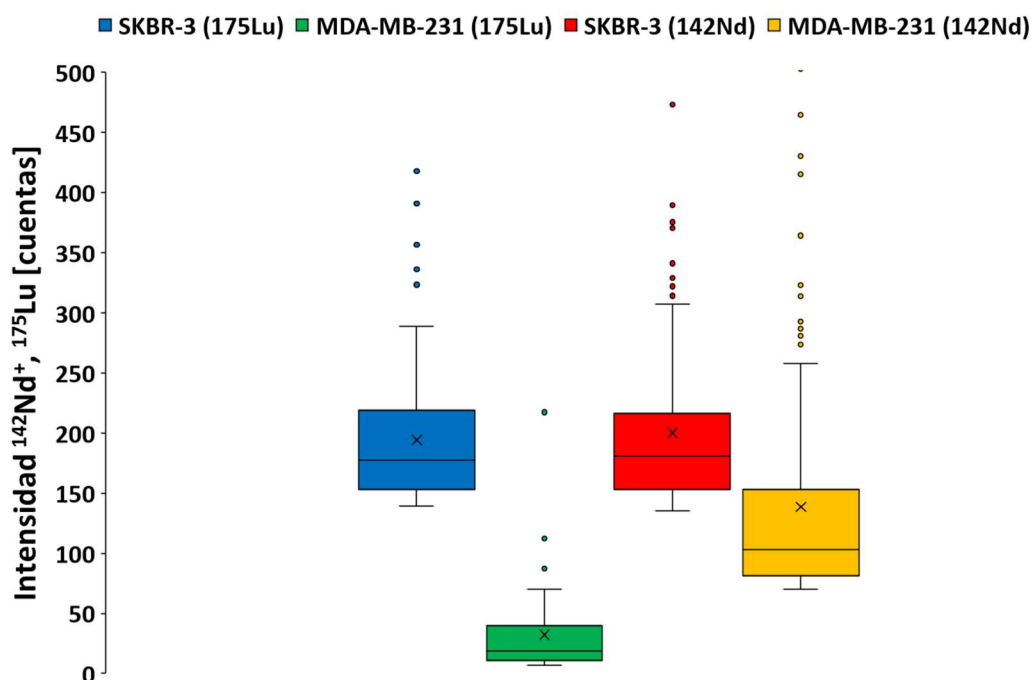


Figura 58.- Diagrama de cajas y bigotes de las señales de $^{175}\text{Lu}^+$ y $^{142}\text{Nd}^+$ correspondientes al reconocimiento simultáneo de HER2 y TfR1, respectivamente, en las líneas celulares MDA-MB-231 y SKBR-3.

Como puede verse en, la intensidad de los eventos de $^{175}\text{Lu}^+$ en la línea celular HER2 negativa (MDA-MB-231, caja verde) es muy baja en comparación con la línea celular HER2 positiva (SKBR-3, caja azul), en la que los valores son significativamente mayores (los valores son estadísticamente diferentes utilizando un test t de Student de dos colas, $p < 0,001$). Esto demuestra la selectividad del método para discriminar líneas HER2 positivas de HER2 negativas. Por otro lado, ambas líneas celulares presentan señales para el $^{142}\text{Nd}^+$ bastante intensas (cajas roja y naranja), correspondientes al reconocimiento de la proteína TfR1. Es necesario tener en cuenta que el transporte de hierro a las células está regulado por la expresión de esta proteína (TfR1) en su superficie. El Fe(III) circula en la sangre formando complejos con la transferrina, y se incorpora a las células mediante la unión de este complejo, transferrina diférrica, al receptor TfR1, que se internaliza por endocitosis. Dado que el hierro es un elemento esencial para el desarrollo celular, el receptor TfR1 se encuentra sobreexpresado en la mayoría de las células tumorales [289]. Por lo tanto, debería ser reconocido de manera eficiente por el anticuerpo anti-TfR1, marcado con ^{142}Nd , en las dos líneas celulares analizadas mediante la metodología de SC-ICP-MS, aunque con variaciones

dependiendo de su nivel de expresión en cada línea celular. Como se puede ver en la Figura 58, pese a existe una pequeña variación entre ellas, en ambas líneas celulares se produce reconocimiento y detección de eventos de $^{142}\text{Nd}^+$ de alta intensidad.

Los resultados obtenidos para el reconocimiento simultáneo en la misma muestra de células, tanto de HER2 con el anticuerpo anti-HER2 portador de la marca de ^{175}Lu , como de Tfr1 con el anticuerpo anti-Tfr1 portador de la marca de ^{142}Nd , son los esperados, atendiendo al nivel de expresión de ambas proteínas en las líneas celulares en estudio. Por lo tanto, podemos concluir que el proceso de reconocimiento con los anticuerpos portadores de una marca metálica es selectivo, se marca la proteína en estudio de forma específica.

D.3.6.- Aplicación de la metodología desarrollada al reconocimiento de HER2 en mezclas de células con diferentes niveles de la proteína

Uno de los principales retos del análisis de células individuales es poder discriminar la presencia de fenotipos malignos en poblaciones celulares complejas, donde también están presentes células no tumorales. Este tipo de discriminación se realiza actualmente en clínica mediante IHC en muestras de tejidos. Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones, particularmente en el caso de la determinación de HER2, en cuanto a la normalización de los datos que ofrece y a la capacidad de cuantificación de la proteína.

Por tanto, sería muy interesante estudiar la aplicabilidad de la metodología desarrollada en este trabajo para el reconocimiento de HER2 en poblaciones de células con distintos niveles de esta proteína; es decir, determinar su capacidad para discriminar entre células HER2 positivas y HER2 negativas en mezclas de células, y distinguir así poblaciones celulares. Este tipo de discriminación puede tener importancia a la hora de analizar muestras de biopsias con parte de tejido tumoral y de tejido sano colindante, así como para el análisis de células tumorales circulantes.

D.- Resultados y discusión

Para estos estudios se prepararon mezclas de células MDA-MB-231 y BT-474, HER2 negativas y positivas, respectivamente, mezclando volúmenes adecuados de los cultivos individuales de las dos líneas celulares (condiciones de cultivo en el apartado C.3.). De esta manera, se generaron mezclas con un porcentaje de: 0%, 20%, 50%, 80% y 100% de células HER2 positivas (BT-474) en células HER2 negativas (MDA-MB-231), manteniendo una concentración total de células de 1×10^6 células·mL⁻¹. Después de contarlas y mezclarlas cuidadosamente, las células se trataron con el anticuerpo anti-HER2, marcado con Lu, en las condiciones ya descritas (apartado D.3.4), y se analizaron mediante SC-ICP-MS utilizando las condiciones de la Tabla 11. Los eventos celulares registrados para cada una de las mezclas analizadas se muestran en la Figura 59.

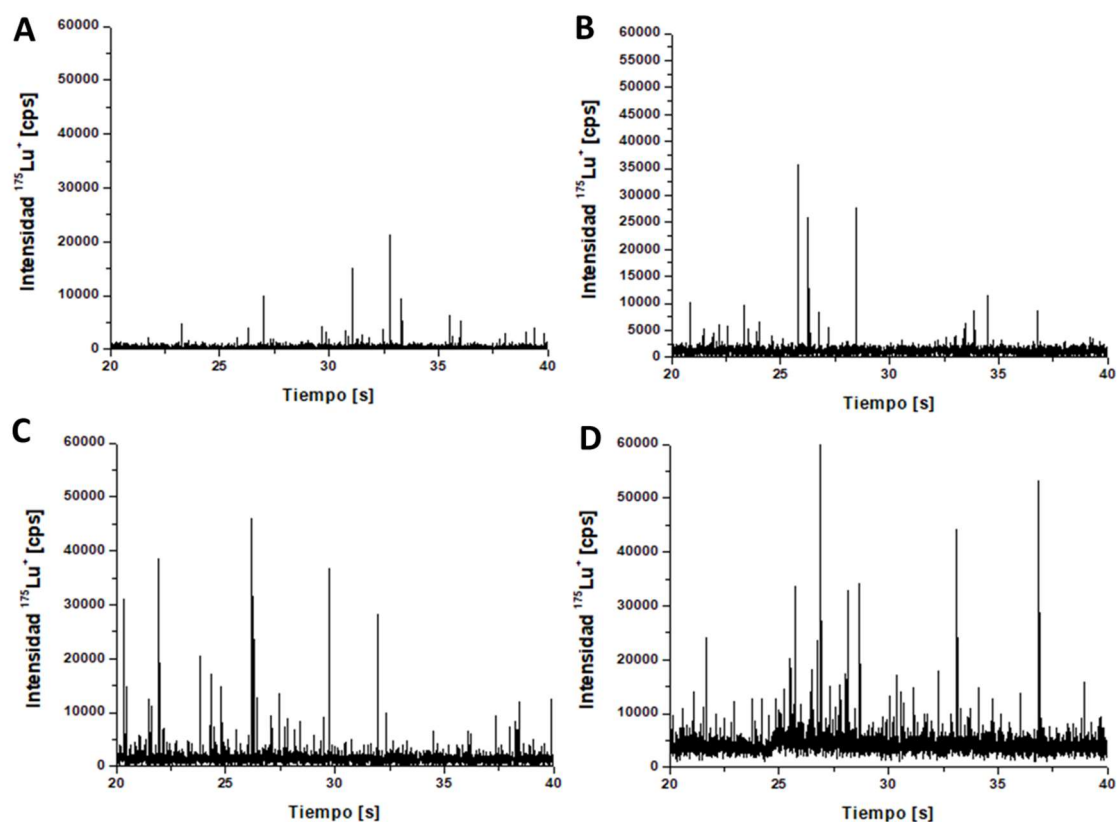


Figura 59.- Eventos celulares obtenidos en la medida del ¹⁷⁵Lu⁺ por SC-ICP-MS para mezclas de células que contienen: 0% (A), 20% (B), 50% (C) y 100% (D) de células BT-474 en células MDA-MB-231.

Como se puede ver en la Figura 59, se aprecian diferencias en los eventos celulares obtenidos para las distintas mezclas de células HER2 positivas y HER2 negativas. A mayor porcentaje de células HER2 positivas (BT-474) en la mezcla, mayor

número de eventos se obtienen y de mayor de intensidad. A partir de la intensidad de los eventos celulares registrados se calculó la masa (fg) de Lu por célula para cada una de las mezclas celulares analizadas, utilizando la ecuación de la Figura 55. Los resultados obtenidos se representan en forma de diagramas de cajas y bigotes en la Figura 60.

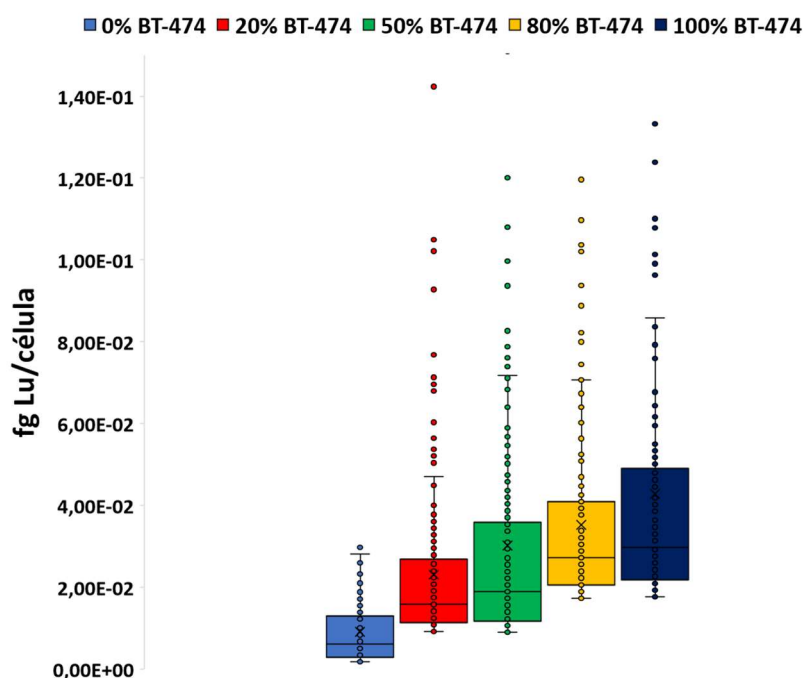


Figura 60.- Diagramas de cajas y bigotes de la masa de ^{175}Lu por célula obtenida mediante SC-ICP-MS para el análisis de mezclas de células MDA-MB-231 y BT-474 con un contenido de: 0, 20, 50, 80 y 100 % de BT-474 en MDA-MB-231

En la Figura 60 se puede ver más claramente como, a medida que aumenta el porcentaje de células BT-474 (HER2 positivas) en la mezcla, las cajas (recorrido intercuartílico) y bigotes se mueven hacia valores más altos de fg de ^{175}Lu por célula. Es decir, la frecuencia de eventos con mayor intensidad aumenta a medida que aumenta el porcentaje de células HER2 positivas en la mezcla. Así, para la mezcla con el 0% de BT-474 (100% de MDA-MB-231) la mayoría de los eventos se encuentran en el rango inferior de fg Lu/célula ($<0,01$ fg Lu/célula), con un valor para la mediana de aproximadamente 0,006 fg Lu/célula y con un rango intercuartílico muy pequeño (0,0028-0,0129 fg Lu/celula). A medida que el porcentaje de células BT-474 en la

D.- Resultados y discusión

mezcla aumenta de 0% a 20, 50, 80 y 100%, respectivamente, la mediana de fg Lu/célula se desplaza hacia valores cada vez mayores, como se recoge en la Tabla 12.

Tabla 12.- Datos extraídos de los diagramas de cajas y bigotes representados en la figura 60, para las diferentes mezclas de las células BT-474 y MDA-MB-231.

Mezcla analizada	Mediana	Cuartil inferior-Cuartil superior	Recorrido intercuartílico
0% BT-474	0,0058	0,0028-0,0129	0,0101
20% BT-474	0,0157	0,0113-0,0267	0,0154
50% BT-474	0,0188	0,0116-0,0358	0,0242
80% BT-474	0,0271	0,0205-0,0408	0,0203
100% BT-474	0,0297	0,0217-0,0489	0,0272

Además, mediante un análisis de regresión lineal simple de estos datos, se puede comprobar que existe una relación lineal entre la mediana de fg Lu/célula y el porcentaje de células BT-474 en la mezcla celular analizada. La recta de regresión obtenida, que se muestra en la Figura 61, presenta la ecuación $y = 0,00026x + 0,0081$, con un R^2 de 0,955, y una pendiente estadísticamente significativa (pendiente = $0,00026 \pm 0,00003$ (media \pm SD); $p < 0,01$ con un test t de Student). Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de la metodología desarrollada para discriminar entre diferentes poblaciones celulares.

Es necesario comentar que la principal limitación de la metodología desarrollada deriva del hecho de que las células BT-474 (HER2 positivas) generan señales de Lu con una gran dispersión en sus valores (el rango intercuartílico de las medidas de muestras con el 100% de células BT-474 va desde 0,0217 hasta 0,0489 fg Lu/célula). Estas diferencias de valores pueden atribuirse a heterogenicidad en la expresión de HER2; es decir, que existen células BT-474 con niveles de HER2 más altos y más dentro de la misma población celular [376], que solo puede apreciarse mediante el análisis de células individuales. En los análisis mediante IHC de muestras de tejidos,

la heterogeneidad, tanto a nivel celular (entre las distintas células) como a nivel tumoral (entre las distintas regiones del tumor), es una de las variables que más influye en los resultados, y que da lugar a más resultados discrepantes entre observadores [377].

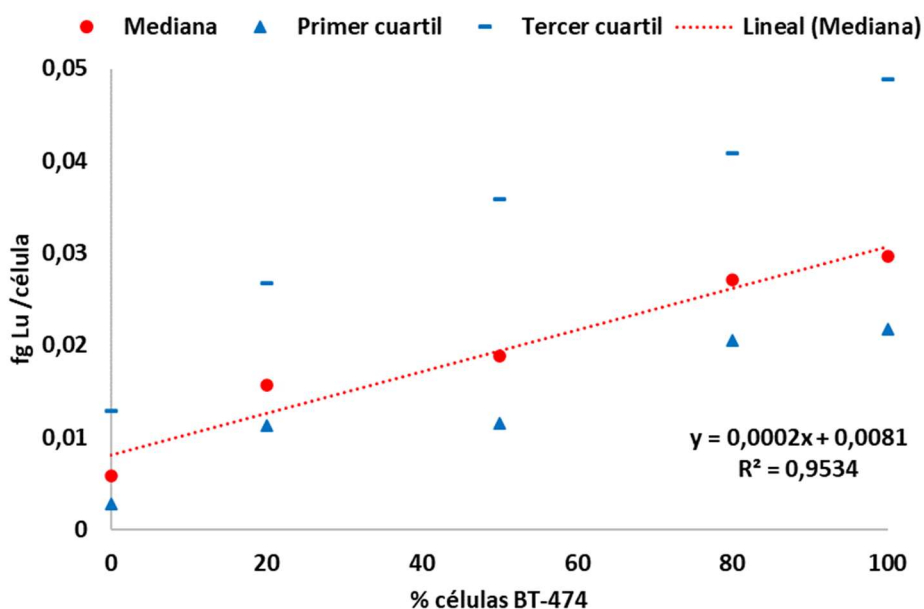


Figura 61.- Recta de regresión obtenida al representar la mediana de fg Lu/célula frente al porcentaje de células BT-474 en células MDA-MB-231. Se presentan también los valores del primer (triángulos azules) y tercer (líneas azules) cuartil para cada mezcla celular.

Finalmente, se realizó la cuantificación de HER2 mediante un ensayo ELISA espectrofotométrico comercial en el lisado celular de las mismas mezclas celulares analizadas mediante la metodología de SC-ICP-MS, para comparar los resultados obtenidos con los dos métodos. La cuantificación de HER2 mediante ELISA se realizó como ya se describió en el apartado D.3.4, utilizando el kit comercial ErbB2 (HER2) Human ELISA kit de Thermo Fisher Scientific. Los resultados obtenidos, expresados como la media del número de moléculas de HER2 por célula, para un análisis por triplicado de los lisados celulares procedentes de mezclas de células con un contenido de: 0, 20, 50, 80 y 100 % de células BT-474 en células MDA-MB-231, se presentan en la Figura 62.

D.- Resultados y discusión

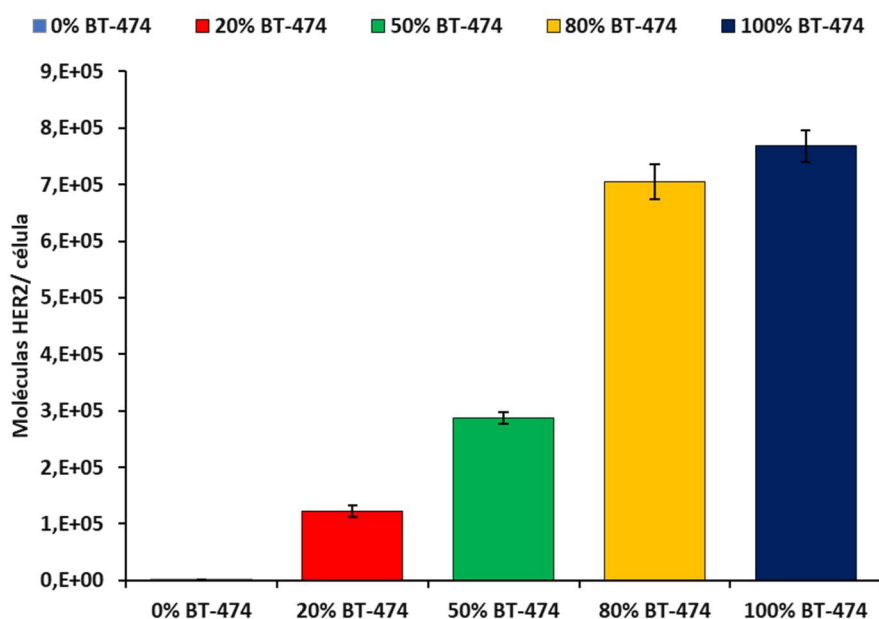


Figura 62.- Número de moléculas de HER2 por célula (media \pm SD, $n=3$) encontradas en lisados celulares mediante ELISA para el análisis de mezclas de células con un contenido de: 0, 20, 50, 80 y 100 % de células BT-474 en células MDA-MB-231.

Como se puede ver, se detecta un aumento significativo de la cantidad de moléculas de HER2 en el lisado celular al aumentar el porcentaje de células BT-474 (HER2 positivas) en la mezcla, de modo similar a lo observado en células individuales con la metodología de SC-ICP-MS (ver Figura 60). La sensibilidad del ELISA, sin embargo, es ligeramente peor, las mezclas que contienen 80% y 100% de BT-474 proporcionan valores del número de moléculas de HER2/célula de $705 \times 10^3 \pm 31 \times 10^3$ (media \pm SD, $n=3$) y $768 \times 10^3 \pm 29 \times 10^3$ (media \pm SD, $n=3$), respectivamente, que no son estadísticamente diferentes en un test t de Student de dos colas ($p>0,05$). Además, el ensayo ELISA se aplica a los lisados celulares, determinando, por tanto, además de la proteína HER2 presente en la membrana, la proteína HER2 presente dentro del citosol celular. Por tanto, la concentración de HER2 obtenida por ELISA no refleja solamente la presencia de este biomarcador en la superficie celular, donde es biológicamente relevante. Además, como ya ocurrió en el apartado D.3.6, los resultados del ensayo ELISA no aportan ningún tipo de información acerca de la heterogeneidad presente en la muestra. En este caso, la heterogeneidad es aún más evidente al ser las muestras

analizadas mezclas de dos líneas celulares con distinto nivel de expresión de HER2. Mientras que los resultados de SC-ICP-MS reflejan la heterogeneidad presente en la muestra, a través del rango intercuartílico, el ensayo ELISA solo proporciona el valor promedio, sin dar ninguna información acerca de las distintas poblaciones celulares presentes en la mezcla, siendo por lo tanto de mucho menor valor a la hora de analizar muestras celulares complejas.

E.- Conclusiones

Como resultado de los estudios realizados a lo largo de los tres capítulos que componen la presente Tesis Doctoral se puede concluir que:

1. La técnica de electroforesis en gel (GE) acoplada en línea al ICP-MS como detector selectivo de fósforo, ha permitido la separación de fragmentos de ADN con tamaños entre 50-500 pb con buena resolución. Además, mediante el acoplamiento GE-ICP-MS es posible la identificación de los fragmentos separados en función de su tamaño y su cuantificación sin necesidad de ningún proceso de marcaje.
2. La combinación de la amplificación de diferentes fragmentos de ADN mediante PCR múltiple, con la cuantificación de los productos obtenidos (amplicones) por GE-ICP-MS (monitorizando el fósforo), ha permitido desarrollar una metodología analítica para la determinación de variaciones en el número de copias (CNVs) de varios genes de forma simultánea; así como para el estudio de cambios en la expresión génica, utilizando en este caso un proceso de PCR múltiple con retro-transcripción (RT-PCR).
3. La metodología desarrollada de PCR múltiple en combinación con GE-ICP-MS ha demostrado su validez para la cuantificación simultánea de CNVs de genes relacionados con procesos tumorales en ADN genómico de células de cáncer de ovario en cultivo. La cuantificación puede llevarse a cabo mediante la utilización de una curva de calibrado, o utilizando un gen de referencia con un número de copias conocido.
4. Asimismo, se ha demostrado la aplicabilidad de la metodología de RT-PCR en combinación con GE-ICP-MS para el estudio de la expresión diferencial de genes, relacionados con la resistencia al fármaco antitumoral cisplatino, en líneas celulares de cáncer de ovario sensibles y resistentes al fármaco.
5. Las metodologías desarrolladas, PCR-GE-ICP-MS y RT-PCR-GE-ICP-MS, proporcionan información equivalente a la obtenida mediante las técnicas ya establecidas de qPCR y RT-qPCR de reacción única, pero con las ventajas de permitir la determinación de CNVs y expresión génica, respectivamente, de varios genes de forma simultánea en una única reacción, sin la necesidad de utilizar diferentes sondas fluorescentes, y con análisis más sencillo de los datos.

E.- Conclusiones

6. Se ha puesto a punto una metodología analítica para la determinación de la proteína HER2, en fluidos biológicos, que combina la especificidad de los inmunoensayos con la capacidad de amplificación de la PCR y la detección selectiva de fósforo mediante ICP-MS.

7. Con las condiciones experimentales optimizadas, existe una relación lineal entre la concentración de la proteína HER2 en la muestra y la cantidad de fósforo presente en el amplicón obtenido por PCR, determinada mediante ICP-MS.

8. La metodología desarrollada de inmuno-PCR en combinación con ICP-MS presenta un rango dinámico lineal muy superior al del correspondiente ensayo ELISA espectrofotométrico comercial, y muy buena sensibilidad, con un límite de detección de $2,5 \text{ pg mL}^{-1}$, 7 veces menor que el del ensayo ELISA.

9. La metodología desarrollada para la determinación de HER2 es útil en el análisis del sobrenadante del cultivo de células tumorales y del suero humano, a concentraciones clínicamente relevantes (muy por debajo del nivel fisiológico de $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) con buena exactitud y precisión. Además, la aplicabilidad de esta metodología puede extenderse a la determinación de otros biomarcadores proteicos de interés en la práctica clínica.

10. El empleo de un anticuerpo específico para la proteína HER2 marcado con un isótopo metálico (^{175}Lu), en combinación con la detección de este isótopo en células individuales por SC-IPC-MS, ha permitido desarrollar una metodología analítica adecuada para estudiar los niveles de HER2 en células individuales.

11. Anticuerpos contra la proteína HER2 exitosamente marcados con el isótopo metálico (^{175}Lu) son capaces de reconocer de forma selectiva esta proteína en células individuales, en diferentes líneas celulares de cáncer de mama con distintos niveles de la proteína.

12. Esta metodología, desarrollada para el reconocimiento selectivo de proteínas, se puede aplicar de modo exitoso a la determinación simultánea, dentro de la misma población celular, de proteínas diferentes presentes en la superficie celular (como HER2 y TfR 1), utilizando anticuerpos específicos marcados con isótopos metálicos diferentes.

13. La metodología desarrollada es válida y útil para distinguir e identificar heterogeneidad celular en poblaciones celulares, factor importante en el análisis de biopsias y en la identificación de células tumorales circulantes.

14. En comparación con un ensayo ELISA espectrofotométrico comercial, la estrategia analítica desarrollada proporciona información a nivel de célula individual de los niveles de HER2 presentes sólo en la superficie celular, no en todo el volumen celular.

***F.- Sugerencias para
trabajos futuros***

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, centrada en el desarrollo de metodologías analíticas basadas en la utilización de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para la determinación en muestras biológicas de biomarcadores tumorales de diferente naturaleza (genómicos y proteicos), surgen diversas ideas de trabajos futuros, relacionadas principalmente con la determinación simultánea de varios biomarcadores proteicos en el mismo ensayo. El uso de paneles de biomarcadores es un campo de gran interés actualmente, y el desarrollo de estrategias analíticas que permitan la determinación simultánea de varios marcadores tumorales está abierta a mejoras. Por lo tanto, para continuar con la línea de investigación planteada en esta Tesis Doctoral, la dirección correcta podría ser la adaptación de las metodologías a la determinación múltiple de proteínas biomarcadoras. Las dos ideas principales se detallan a continuación:

1. Aplicación de la estrategia de inmuno-PCR en combinación con la detección por ICP-MS a la determinación de varias proteínas de forma simultánea. Para ello, y utilizando la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral, se requiere del marcaje de los distintos anticuerpos con que se realizará el reconocimiento específico (inmunoensayo) de cada una de las proteínas de interés con una molécula diferente de ADN marcador. Para evitar interacciones no específicas, el marcaje de los anticuerpos debería realizarse de forma previa al inmunoensayo, mediante unión covalente de los anticuerpos con la molécula de ADN marcador. Posteriormente, mediante un ensayo de inmuno-PCR múltiple, y empleando las condiciones de trabajo adecuadas, se podrían obtener una serie de amplicones, cada uno de ellos con una concentración proporcional a la concentración en la muestra de las distintas proteínas reconocidas en el inmunoensayo. Finalmente, los amplicones obtenidos se podrían separar y cuantificar mediante GE-ICP-MS, lo que permitiría determinar el contenido de cada proteína en la muestra. Esta nueva metodología permitiría la determinación altamente sensible de varias proteínas en una muestra de forma simultánea, aumentando su aplicabilidad a paneles de biomarcadores.

2. La metodología de *single cell*-ICP-MS desarrollada en la presente Tesis Doctoral permite el reconocimiento selectivo de dos proteínas presentes en la superficie celular (HER2 y TfR1), de forma simultánea y a nivel de célula individual, utilizando anticuerpos específicos para cada proteína marcados con diferentes isotopos metálicos (^{175}Lu y ^{142}Nd). Pese a que con el empleo de un ICP-MS de triple cuadrupolo no es posible la medida simultánea de varios isotopos metálicos en la misma célula, sí que sería posible optimizar el proceso de reconocimiento de varias proteínas en las células con anticuerpos portadores de marca metálica y su detección por *single cell*-ICP-MS para establecer paneles de biomarcadores proteicos de membrana en el análisis de biopsias de tejidos o de CTCs. Se ha demostrado que la metodología desarrollada permite identificar poblaciones celulares, por lo tanto, aunque la medida de las células no sea simultánea, se podrían identificar poblaciones con sobreexpresión de varias proteínas de membrana.

G.- Bibliografía

G.- Bibliografía

- [1] American Cancer Society, ¿Qué es el cáncer?, (n.d.). <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html> (accessed September 16, 2021).
- [2] What Is Cancer? - National Cancer Institute, (n.d.). <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed September 17, 2020).
- [3] A to Z List of Cancer Types - National Cancer Institute, (n.d.). <https://www.cancer.gov/types> (accessed June 15, 2021).
- [4] Z. Herceg, P. Hainaut, Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis, *Mol. Oncol.* 1 (2007) 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.01.004>.
- [5] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [6] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Biological Hallmarks of Cancer. In *Holland-Frei Cancer Medicine*, John Wiley & Sons, 2016. <https://doi.org/10.1002/9781119000822>.
- [7] H. Takeshima, T. Ushijima, Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk, *Npj Precis. Oncol.* 3 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0079-0>.
- [8] A. Imran, H.Y. Qamar, Q. Ali, H. Naeem, M. Riaz, S. Amin, N. Kanwal, F. Ali, M.F. Sabar, I.A. Nasir, Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article., *Iran. J. Public Health.* 46 (2017) 1475–1485. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29167765> (accessed September 17, 2020).
- [9] D.C. Chung, D.A. Haber, *Principles of clinical cancer genetics: A handbook from the massachusetts general hospital*, Springer US, Boston, MA, 2010. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-93846-2>.
- [10] F. Mantovani, L. Collavin, G. Del Sal, Mutant p53 as a guardian of the cancer cell, *Cell Death Differ.* 26 (2019) 199–212. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>.
- [11] A. Torgovnick, B. Schumacher, DNA repair mechanisms in cancer development and therapy, *Front. Genet.* 6 (2015). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157>.
- [12] J.E. Audia, R.M. Campbell, Histone modifications and cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8 (2016). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>.
- [13] A. Nebbioso, F.P. Tambaro, C. Dell’Aversana, L. Altucci, Cancer epigenetics: Moving forward, *PLoS Genet.* 14 (2018) e1007362. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>.
- [14] M. Kulis, M. Esteller, *DNA Methylation and Cancer*, *Adv Genet*, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2>.
- [15] P.A. Jones, S.B. Baylin, The Epigenomics of Cancer, *Cell.* 128 (2007) 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.
- [16] J.S. You, P.A. Jones, Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?, *Cancer Cell.* 22 (2012) 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>.
- [17] España en cifras 2019, (n.d.). https://www.ine.es/prodyser/esp_a_cifras/2019/20/ (accessed June 15, 2021).
- [18] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

G.- Bibliografía

- [19] American Cancer Society, Facts & Figures 2019, Am. Cancer Soc. (2019) 1–76.
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2019/cancer-facts-and-figures-2019.pdf>.
- [20] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA. Cancer J. Clin. 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [21] Sociedad Española de Oncología Médica, Las cifras del cáncer en España 2020 Hombres, Soc. Española Oncol. Médica. (2020) 36.
- [22] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2020, CA. Cancer J. Clin. 70 (2020) 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>.
- [23] Comparator Report on Cancer in Europe 2019 – Disease Burden, Costs and Access to Medicines - IHE, (n.d.). <https://ihe.se/en/publicering/comparator-report-on-cancer-in-europe-2019/> (accessed May 26, 2021).
- [24] A.J. Atkinson, W.A. Colburn, V.G. DeGruttola, D.L. DeMets, G.J. Downing, D.F. Hoth, J.A. Oates, C.C. Peck, R.T. Schooley, B.A. Spilker, J. Woodcock, S.L. Zeger, Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework, Clin. Pharmacol. Ther. 69 (2001) 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- [25] K. Strimbu, J.A. Tavel, What are biomarkers?, Curr. Opin. HIV AIDS. 5 (2010) 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>.
- [26] A. Mishra, M. Verma, Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time?, Cancers (Basel). 2 (2010) 190–208. <https://doi.org/10.3390/cancers2010190>.
- [27] FDA-NIH Biomarker Working Group, BEST (Biomarkers , EndpointS , and other Tools), Updat. Sept. 25. (2017) 55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> (accessed May 27, 2021).
- [28] R.M. Califf, Biomarker definitions and their applications, Exp. Biol. Med. 243 (2018) 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>.
- [29] M. Gromova, A. Vaggelas, G. Dallmann, D. Seimetz, Biomarkers: Opportunities and Challenges for Drug Development in the Current Regulatory Landscape, Biomark. Insights. 15 (2020). <https://doi.org/10.1177/1177271920974652>.
- [30] E.S. Bialecki, A.M. Di Bisceglie, Diagnosis of hepatocellular carcinoma, HPB. 7 (2005) 26–34. <https://doi.org/10.1080/13651820410024049>.
- [31] Y.J. Bae, M. Schaab, J. Kratzsch, Calcitonin as biomarker for the medullary thyroid carcinoma, in: Recent Results Cancer Res., Springer New York LLC, 2015: pp. 117–137. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22542-5_5.
- [32] P. Bottoni, R. Scatena, The role of CA 125 as tumor marker: Biochemical and clinical aspects, Adv. Exp. Med. Biol. 867 (2015) 229–244. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_14.
- [33] N.L. Henry, D.F. Hayes, Cancer biomarkers, Mol. Oncol. 6 (2012) 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>.
- [34] A. Srivastava, D.J. Creek, Discovery and Validation of Clinical Biomarkers of Cancer: A Review Combining Metabolomics and Proteomics, Proteomics. 19 (2019) 1700448. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700448>.
- [35] G. Poste, Bring on the biomarkers, Nature. 469 (2011) 156–157. <https://doi.org/10.1038/469156a>.
- [36] Bruce Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, Peter Walker, Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf, Garland Publishing, 2002.
- [37] H.F.M. Kamel, H.S.B. Al-Amodi, Cancer Biomarkers, in: Role Biomarkers Med., InTech, 2016.

- <https://doi.org/10.5772/62421>.
- [38] C. Garrigós, M. Espinosa, A. Salinas, I. Osman, R. Medina, M. Taron, S. Molina-Pinelo, I. Duran, Single nucleotide polymorphisms as prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma, *Oncotarget*. 8 (2017) 106551–106564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22533>.
- [39] X. Pan, X.H. Hu, Y.H. Zhang, L. Chen, L.C. Zhu, S.B. Wan, T. Huang, Y.D. Cai, Identification of the copy number variant biomarkers for breast cancer subtypes, *Mol. Genet. Genomics*. 294 (2019) 95–110. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1488-4>.
- [40] Y.W. Huang, Association of BRCA1/2 mutations with ovarian cancer prognosis, *Med. (United States)*. 97 (2018). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009380>.
- [41] A. Mehrgou, M. Akouchekian, The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development, *Med. J. Islam. Repub. Iran*. 30 (2016) 369. [/pmc/articles/PMC4972064/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/) (accessed September 16, 2020).
- [42] Pruebas genéticas para BRCA1 y BRCA2: MedlinePlus enciclopedia médica, (n.d.). <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000690.htm> (accessed September 16, 2020).
- [43] O.H. Shayesteh, R. Ghavami, A novel label-free colorimetric aptasensor for sensitive determination of PSA biomarker using gold nanoparticles and a cationic polymer in human serum, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 226 (2020) 117644. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117644>.
- [44] Q. Xiao, Q. Jia, J. Tan, Z. Meng, Serum biomarkers for thyroid cancer, *Biomark. Med.* 14 (2020) 807–815. <https://doi.org/10.2217/bmm-2019-0578>.
- [45] C. Yoo, D.H. Yoon, C. Suh, Serum beta-2 microglobulin in malignant lymphomas: An old but powerful prognostic factor, *Blood Res.* 49 (2014) 148–153. <https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.148>.
- [46] J.A. Shaw, J. Stebbing, Circulating free DNA in the management of breast cancer, *Ann. Transl. Med.* 2 (2014). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2013.06.06>.
- [47] X. Terra, V. Ceperuelo-Mallafré, C. Merma, E. Benaiges, ..., F.X. Avilés-Jurado, Succinate pathway in head and neck squamous cell carcinoma: Potential as a diagnostic and prognostic marker, *Cancers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/cancers13071653>.
- [48] L.-H. Gam, Breast cancer and protein biomarkers, *World J. Exp. Med.* 2 (2012) 0. <https://doi.org/10.5493/wjem.v2.i5.86>.
- [49] D.C. Allred, Issues and updates: Evaluating estrogen receptor- α , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer, *Mod. Pathol.* 23 (2010) 52–59. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.55>.
- [50] W. Zhang, Advances in cancer early diagnosis with liquid biopsy-based approaches, *J. Cancer Metastasis Treat.* 7 (2021) 22. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2021.82>.
- [51] I. Martins, I.P. Ribeiro, J. Jorge, A.C. Gonçalves, A.B. Sarmento-Ribeiro, J.B. Melo, I.M. Carreira, Liquid biopsies: Applications for cancer diagnosis and monitoring, *Genes (Basel)*. 12 (2021) 1–20. <https://doi.org/10.3390/genes12030349>.
- [52] M. Arechederra, M.A. Ávila, C. Berasain, Liquid biopsy for cancer management: a revolutionary but still limited new tool for precision medicine, *Adv. Lab. Med. / Av. En Med. Lab.* 1 (2020). <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0009>.
- [53] K.A. Frazer, Decoding the human genome, *Genome Res.* 22 (2012) 1599–1601. <https://doi.org/10.1101/gr.146175.112>.
- [54] Heredity, Genes, and DNA - The Cell - NCBI Bookshelf, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9944/> (accessed September 7, 2021).

G.- Bibliografía

- [55] F. Robert, J. Pelletier, Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation, *Front. Genet.* 9 (2018) 507. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00507>.
- [56] L. Feuk, A.R. Carson, S.W. Scherer, Structural variation in the human genome, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 85–97. <https://doi.org/10.1038/nrg1767>.
- [57] R. Redon, S. Ishikawa, K.R. Fitch, L. Feuk, G.H. Perry, T.D. Andrews, ..., M.E. Hurler, Global variation in copy number in the human genome, *Nature.* 444 (2006) 444–454. <https://doi.org/10.1038/nature05329>.
- [58] A.J. Iafrate, L. Feuk, M.N. Rivera, M.L. Listewnik, P.K. Donahoe, Y. Qi, S.W. Scherer, C. Lee, Detection of large-scale variation in the human genome, *Nat. Genet.* 36 (2004) 949–951. <https://doi.org/10.1038/ng1416>.
- [59] J. Sebat, B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, S. Månér, H. Massa, M. Walker, M. Chi, N. Navin, R. Lucito, J. Healy, J. Hicks, K. Ye, A. Reiner, T.C. Gilliam, B. Trask, N. Patterson, A. Zetterberg, M. Wigler, Large-scale copy number polymorphism in the human genome, *Science* (80-.). 305 (2004) 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.1098918>.
- [60] A. Shlien, D. Malkin, Copy number variations and cancer, *Genome Med.* 1 (2009) 62. <https://doi.org/10.1186/gm62>.
- [61] P.J. Hastings, J.R. Lupski, S.M. Rosenberg, G. Ira, Mechanisms of change in gene copy number, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrg2593>.
- [62] O. Pös, J. Radvanszky, G. Buglyó, Z. Pös, D. Rusnakova, B. Nagy, T. Szemes, Copy number variation: Characteristics, evolutionary and pathological aspects, *Biomed. J.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.02.003>.
- [63] M. Zarrei, J.R. MacDonald, D. Merico, S.W. Scherer, A copy number variation map of the human genome, *Nat. Rev. Genet.* 16 (2015) 172–183. <https://doi.org/10.1038/nrg3871>.
- [64] X. Shao, N. Lv, J. Liao, J. Long, R. Xue, N. Ai, D. Xu, X. Fan, Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: A pan-cancer study, *BMC Med. Genet.* 20 (2019) 175. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0909-5>.
- [65] A. Gut, H. Moch, M. Choschzick, SOX2 Gene Amplification and Overexpression is Linked to HPV-positive Vulvar Carcinomas, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 37 (2018) 68–73. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000388>.
- [66] A. Kuzyk, S. Booth, C. Righolt, S. Mathur, J. Gartner, S. Mai, MYCN overexpression is associated with unbalanced copy number gain, altered nuclear location, and overexpression of chromosome arm 17q genes in neuroblastoma tumors and cell lines, *Genes, Chromosom. Cancer.* 54 (2015) 616–628. <https://doi.org/10.1002/gcc.22273>.
- [67] Y. Kwak, S.K. Nam, A.N. Seo, D.-W. Kim, S.-B. Kang, W.H. Kim, H.S. Lee, Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene Copy Number and mRNA Expression in Primary Colorectal Cancer and Its Clinicopathologic Correlation, *Pathobiology.* 82 (2015) 76–83. <https://doi.org/10.1159/000398807>.
- [68] G.L. Ryland, M.A. Doyle, D. Goode, S.E. Boyle, D.Y.H. Choong, S.M. Rowley, J. Li, D.D. Bowtell, R.W. Tothill, I.G. Campbell, K.L. Goringe, Loss of heterozygosity: What is it good for?, *BMC Med. Genomics.* 8 (2015) 45. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0123-z>.
- [69] S.H. Almal, H. Padh, Implications of gene copy-number variation in health and diseases, *J. Hum. Genet.* 57 (2012) 6–13. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.108>.
- [70] J.S. Beckmann, X. Estivill, S.E. Antonarakis, Copy number variants and genetic traits: Closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 639–646. <https://doi.org/10.1038/nrg2149>.
- [71] M. Fanciulli, E. Petretto, T. Aitman, Gene copy number variation and common human disease,

- Clin. Genet. 77 (2010) 201–213. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01342.x>.
- [72] S.A. McCarroll, Extending genome-wide association studies to copy-number variation, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) R135–R142. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn282>.
- [73] M.S. De Pagter, W.P. Kloosterman, The diverse effects of complex chromosome rearrangements and chromothripsis in cancer development, in: *Chromosom. Instab. Cancer Cells*, Springer International Publishing, 2015: pp. 165–193. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20291-4_8.
- [74] A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerrière, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, D. Campion, APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy, *Nat. Genet.* 38 (2006) 24–26. <https://doi.org/10.1038/ng1718>.
- [75] M. Velinov, Genomic Copy Number Variations in the Autism Clinic—Work in Progress, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 57. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00057>.
- [76] E.J. Hollox, U. Huffmeier, P.L.J.M. Zeeuwen, R. Palla, J. Lascorz, D. Rodijk-Olthuis, P.C.M. Van De Kerkhof, H. Traupe, G. De Jongh, M. Den Heijer, A. Reis, J.A.L. Armour, J. Schalkwijk, Psoriasis is associated with increased β -defensin genomic copy number, *Nat. Genet.* 40 (2008) 23–25. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.48>.
- [77] A.C.V. Krepischi, P.L. Pearson, C. Rosenberg, Germline copy number variations and cancer predisposition, *Futur. Oncol.* 8 (2012) 441–450. <https://doi.org/10.2217/fon.12.34>.
- [78] T. Furuya, Y. Suehiro, Y. Namiki, K. Sasaki, CNVs Associated with Susceptibility to Cancers: A Mini-Review, *J. Cancer Ther.* 06 (2015) 413–422. <https://doi.org/10.4236/jct.2015.65044>.
- [79] H. Peng, L. Lu, Z. Zhou, J. Liu, D. Zhang, K. Nan, X. Zhao, F. Li, L. Tian, H. Dong, Y. Yao, CNV Detection from Circulating Tumor DNA in Late Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients, *Genes (Basel)*. 10 (2019) 926. <https://doi.org/10.3390/genes10110926>.
- [80] R.P. Kuiper, M.J.L. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge, A. Geurts van Kessel, Germline copy number variation and cancer risk, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (2010) 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.03.005>.
- [81] G. Jin, J. Sun, W. Liu, Z. Zhang, L.W. Chu, S.-T. Kim, J. Sun, J. Feng, D. Duggan, J.D. Carpten, F. Wiklund, H. Grönberg, W.B. Isaacs, S.L. Zheng, J. Xu, Genome-wide copy-number variation analysis identifies common genetic variants at 20p13 associated with aggressiveness of prostate cancer, *Carcinogenesis*. 32 (2011) 1057–1062. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr082>.
- [82] B.L. Fridley, P. Chalise, Y.-Y. Tsai, Z. Sun, ..., E.L. Goode, Germline Copy Number Variation and Ovarian Cancer Survival, *Front. Genet.* 3 (2012) 142. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00142>.
- [83] C.L. Andersen, P. Lamy, K. Thorsen, E. Kjeldsen, F. Wikman, P. Villesen, B. Øster, S. Laurberg, T.F. Ørntoft, Frequent genomic loss at chr16p13.2 is associated with poor prognosis in colorectal cancer, *Int. J. Cancer*. 129 (2011) 1848–1858. <https://doi.org/10.1002/ijc.25841>.
- [84] F.J. Couch, X. Wang, L. McGuffog, A. Lee, C. Olsword, ..., A.C. Antoniou, Genome-Wide Association Study in BRCA1 Mutation Carriers Identifies Novel Loci Associated with Breast and Ovarian Cancer Risk, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003212. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003212>.
- [85] M.M. Gaudet, K.B. Kuchenbaecker, J. Vijai, R.J. Klein, T. Kirchhoff, ..., K. Offit, Identification of a BRCA2-Specific Modifier Locus at 6p24 Related to Breast Cancer Risk, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003173. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003173>.
- [86] K. Yoshihara, A. Tajima, S. Adachi, J. Quan, M. Sekine, H. Kase, T. Yahata, I. Inoue, K. Tanaka, Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients, *Genes Chromosom. Cancer*. 50 (2011) 167–177. <https://doi.org/10.1002/gcc.20841>.
- [87] D.G. Albertson, C. Collins, F. McCormick, J.W. Gray, Chromosome aberrations in solid tumors,

G.- Bibliografía

- Nat. Genet. 34 (2003) 369–376. <https://doi.org/10.1038/ng1215>.
- [88] D.T. Starczynowski, W.W. Lockwood, S. Deléhouzée, R. Chari, J. Wegrzyn, M. Fuller, M.S. Tsao, S. Lam, A.F. Gazdar, W.L. Lam, A. Karsan, TRAF6 is an amplified oncogene bridging the RAS and NF- κ B pathways in human lung cancer, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 4095–4105. <https://doi.org/10.1172/JCI58818>.
- [89] T. Santarius, J. Shipley, D. Brewer, M.R. Stratton, C.S. Cooper, A census of amplified and overexpressed human cancer genes, *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 59–64. <https://doi.org/10.1038/nrc2771>.
- [90] A. Sakthianandeswaren, M.J. Parsons, D. Mouradov, R.N. Mackinnon, B. Catimel, S. Liu, M. Palmieri, C. Love, R.N. Jorissen, S. Li, L. Whitehead, T.L. Putoczki, A. Preaudet, C. Tsui, C.J. Nowell, R.L. Ward, N.J. Hawkins, J. Desai, P. Gibbs, M. Ernst, I. Street, M. Buchert, O.M. Sieber, MACROD2 haploinsufficiency impairs catalytic activity of PARP1 and promotes chromosome instability and growth of intestinal tumors, *Cancer Discov.* 8 (2018) 988–1005. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0909>.
- [91] Y.S. Huang, W. Bin Liu, F. Han, J.T. Yang, X.L. Hao, H.Q. Chen, X. Jiang, L. Yin, L. Ao, Z.H. Cui, J. Cao, J.Y. Liu, Copy number variations and expression of MPDZ are prognostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma, *Oncotarget.* 8 (2017) 78713–78725. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20220>.
- [92] C.E. Caldon, E.A. Musgrove, Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer, *Cell Div.* 5 (2010). <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-2>.
- [93] H.C. Hwang, B.E. Clurman, Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles, *Oncogene.* 24 (2005) 2776–2786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208613>.
- [94] D.A. Levine, Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma, *Nature.* 497 (2013) 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>.
- [95] J.W. Gorski, F.R. Ueland, J.M. Kolesar, CCNE1 amplification as a predictive biomarker of chemotherapy resistance in epithelial ovarian cancer, *Diagnostics.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050279>.
- [96] H.H. Milioli, S. Alexandrou, E. Lim, C.E. Caldon, Cyclin E1 and cyclin E2 in ER+ breast cancer: prospects as biomarkers and therapeutic targets, *Endocr. Relat. Cancer.* 27 (2020) R93–R112. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0501>.
- [97] L.F. Surrey, M. Luo, F. Chang, M.M. Li, The Genomic Era of Clinical Oncology: Integrated Genomic Analysis for Precision Cancer Care, *Cytogenet. Genome Res.* 150 (2016) 162–175. <https://doi.org/10.1159/000454655>.
- [98] A. Weise, M. Gross, S. Hinreiner, V. Witthuhn, H. Mkrtchyan, T. Liehr, POD-FISH: a new technique for parental origin determination based on copy number variation polymorphism., *Methods Mol. Biol.* 659 (2010) 291–298. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-789-1_22.
- [99] A. Kallioniemi, T. Visakorpi, R. Karhu, D. Pinkel, O.P. Kallioniemi, Gene copy number analysis by fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization, *Methods A Companion to Methods Enzymol.* 9 (1996) 113–121. <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0015>.
- [100] E. Mazaika, J. Homsy, Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 82 (2014) 7.24.1-7.24.13. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0724s82>.
- [101] L. Ma, W.K. Chung, Quantitative analysis of copy number variants based on real-time lightcycler PCR, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 80 (2014) 7.21.1. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0721s80>.
- [102] L. Stuppia, I. Antonucci, G. Palka, V. Gatta, Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 3245–3276. <https://doi.org/10.3390/ijms13033245>.

- [103] K. V Voelkerding, S.A. Dames, J.D. Durtschi, Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics, *Clin. Chem.* 55 (2009) 641–658. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112789>.
- [104] S. Goodwin, J.D. McPherson, W.R. McCombie, Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.
- [105] H.J. Abel, E.J. Duncavage, Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: A review of informatic approaches, *Cancer Genet.* 206 (2013) 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.11.002>.
- [106] M. Zhao, Q. Wang, Q. Wang, P. Jia, Z. Zhao, Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: Features and perspectives, *BMC Bioinformatics.* 14 (2013) 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S11-S1>.
- [107] H. Mason-Suares, L. Landry, M. S. Lebo, Detecting Copy Number Variation via Next Generation Technology, *Curr. Genet. Med. Rep.* 4 (2016) 74–85. <https://doi.org/10.1007/s40142-016-0091-4>.
- [108] J.M. Ellingford, C. Campbell, S. Barton, S. Bhaskar, S. Gupta, R.L. Taylor, P.I. Sergouniotis, B. Horn, J.A. Lamb, M. Michaelides, A.R. Webster, W.G. Newman, B. Panda, S.C. Ramsden, G.C.M. Black, Validation of copy number variation analysis for next-generation sequencing diagnostics, *Eur. J. Hum. Genet.* 25 (2017) 719–724. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.42>.
- [109] J.M. Moreno-Cabrera, J. del Valle, E. Castellanos, L. Feliubadaló, M. Pineda, J. Brunet, E. Serra, G. Capellà, C. Lázaro, B. Gel, Evaluation of CNV detection tools for NGS panel data in genetic diagnostics, *Eur. J. Hum. Genet.* 28 (2020) 1645–1655. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0675-z>.
- [110] A.K. Singh, M.F. Olsen, L.A.S. Lavik, T. Vold, F. Drabløs, W. Sjursen, Detecting copy number variation in next generation sequencing data from diagnostic gene panels, *BMC Med. Genomics.* 14 (2021) 214. <https://doi.org/10.1186/s12920-021-01059-x>.
- [111] B.A. Bejjani, L.G. Shaffer, Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics, *J. Mol. Diagnostics.* 8 (2006) 528–533. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060029>.
- [112] D. Pinkel, D.G. Albertson, COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6 (2005) 331–354. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162140>.
- [113] W. Li, M. Olivier, Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation, *Physiol. Genomics.* 45 (2013) 1–6. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00082.2012>.
- [114] C. O'Connor, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) | Learn Science at Scitable, (2008). <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/> (accessed September 8, 2021).
- [115] A. Alamri, J.Y. Nam, J.K. Blancato, Fluorescence in situ hybridization of cells, chromosomes, and formalin-fixed paraffin-embedded tissues, in: *Methods Mol. Biol.*, Humana Press Inc., 2017: pp. 265–279. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_17.
- [116] M. Hayat, *Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas - 1st Edition*, Elsevier, 2006.
- [117] M.L. Onozato, C. Yapp, D. Richardson, T. Sundaresan, V. Chahal, J. Lee, J.P. Sullivan, M.W. Madden, H.S. Shim, M. Liebers, Q. Ho, S. Maheswaran, D.A. Haber, Z. Zheng, B. Clancy, H.L. Elliott, J.K. Lennerz, A.J. Iafrate, Highly Multiplexed Fluorescence in Situ Hybridization for in Situ Genomics, *J. Mol. Diagnostics.* 21 (2019) 390–407. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.01.010>.
- [118] L. Hu, K. Ru, L. Zhang, Y. Huang, X. Zhu, H. Liu, A. Zetterberg, T. Cheng, W. Miao, Fluorescence in situ hybridization (FISH): An increasingly demanded tool for biomarker research and

G.- Bibliografía

- personalized medicine, *Biomark. Res.* 2 (2014) 1–13. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-2-3>.
- [119] D. Huber, L. Voith von Voithenberg, G. V. Kaigala, Fluorescence in situ hybridization (FISH): History, limitations and what to expect from micro-scale FISH?, *Micro Nano Eng.* 1 (2018) 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2018.10.006>.
- [120] J. Duan, J.-G. Zhang, H.-W. Deng, Y.-P. Wang, Comparative Studies of Copy Number Variation Detection Methods for Next-Generation Sequencing Technologies, *PLoS One.* 8 (2013) e59128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059128>.
- [121] B. D’haene, J. Vandesompele, J. Hellemans, Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR, *Methods.* 50 (2010) 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>.
- [122] Z.A. Ratan, S. Bin Zaman, V. Mehta, M.F. Haidere, N.J. Runa, N. Akter, Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science, *Cureus.* 9 (2017). <https://doi.org/10.7759/cureus.1325>.
- [123] S.W. Cheung, C.A. Shaw, W. Yu, J. Li, Z. Ou, A. Patel, S.A. Yatsenko, M.L. Cooper, P. Furman, P. Stankiewicz, J.R. Lupski, A.C. Chinault, A.L. Beaudet, Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis, *Genet. Med.* 7 (2005) 422–432. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000170992.63691.32>.
- [124] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (1986) 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>.
- [125] I. Nazir, H. Zaid Mahmood, S. E Mustafa, Polymerase chain reaction: a creative review, *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* 7 (2020) 157–159. <https://doi.org/10.15406/jabb.2020.07.00228>.
- [126] L. Garibyan, N. Avashia, Research Techniques made Simple: Polymerase Chain Reaction, *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- [127] K. Kadri, Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications, in: *Synth. Biol. - New Interdiscip. Sci.*, IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>.
- [128] O. Henegariu, N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt, Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol, *Biotechniques.* 23 (1997) 504–511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>.
- [129] P. Markoulatos, N. Siafakas, M. Moncany, Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach, *J. Clin. Lab. Anal.* 16 (2002) 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.
- [130] G. Zangenberg, R.K. Saiki, R. Reynolds, Multiplex PCR, in: *PCR Appl.*, Elsevier, 1999: pp. 73–94. <https://doi.org/10.1016/b978-012372185-3/50007-9>.
- [131] E.M. Elnifro, A.M. Ashshi, R.J. Cooper, P.E. Klapper, Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology, *Clin. Microbiol. Rev.* 13 (2000) 559–570. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559-570.2000>.
- [132] P. Kainz, The PCR plateau phase - Towards an understanding of its limitations, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1494 (2000) 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00200-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00200-1).
- [133] J.Y. Lee, H.W. Lim, S.I. Yoo, B.T. Zhang, T.H. Park, Simulation and real-time monitoring of polymerase chain reaction for its higher efficiency, in: *Biochem. Eng. J.*, Elsevier, 2006: pp. 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.02.023>.
- [134] J.T. Hsu, S. Das, S. Mohapatra, Polymerase chain reaction engineering, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 359–366. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970720\)55:2<359::AID-BIT13>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<359::AID-BIT13>3.0.CO;2-C).
- [135] L. Jansson, J. Hedman, Challenging the proposed causes of the PCR plateau phase, *Biomol. Detect. Quantif.* 17 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100082>.

- [136] J. Singh, N. Birbian, S. Sinha, A. Goswami, International Journal of Advanced Research in Biological Sciences A critical review on PCR, its types and applications, *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci.* 1 (2014) 65–80. www.ijarbs.com (accessed June 7, 2021).
- [137] J. Yang, B. Kemps-Mols, M. Spruyt-Gerritse, J. Anholts, F. Claas, M. Eikmans, The source of SYBR green master mix determines outcome of nucleic acid amplification reactions, *BMC Res. Notes.* 9 (2016) 292. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2093-4>.
- [138] A. Nagy, E. Vitásková, L. Černíková, V. Křivda, H. Jiřincová, K. Sedlák, J. Horníčková, M. Havlíčková, Evaluation of TaqMan qPCR system integrating two identically labelled hydrolysis probes in single assay, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41392>.
- [139] N. Boulter, F.G. Suarez, S. Schibeci, T. Sunderland, O. Tolhurst, T. Hunter, G. Hodge, D. Handelsman, U. Simanainen, E. Hendriks, K. Duggan, A simple, accurate and universal method for quantification of PCR, *BMC Biotechnol.* 16 (2016) 27. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0256-y>.
- [140] A. Ruiz-Villalba, J.M. Ruijter, M.J.B. van den Hoff, Use and misuse of cq in qpcr data analysis and reporting, *Life.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/life11060496>.
- [141] C.G.B. Caraguel, H. Stryhn, N. Gagné, I.R. Dohoo, K.L. Hammell, Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches, *J. Vet. Diagnostic Investig.* 23 (2011) 2–15. <https://doi.org/10.1177/104063871102300102>.
- [142] R. Biassoni, A. Raso, *Quantitative Real-Time PCR*, Springer New York, New York, NY, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0733-5>.
- [143] S. Pabinger, S. Rödiger, A. Kriegner, K. Vierlinger, A. Weinhäusel, A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data, *Biomol. Detect. Quantif.* 1 (2014) 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.08.002>.
- [144] M. Varma-Basil, H. El-Hajj, S.A.E. Marras, M.H. Hazbón, J.M. Mann, N.D. Connell, F.R. Kramer, D. Alland, Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1060–1063. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.030767>.
- [145] D. Klein, Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) 257–260. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9).
- [146] S.A.E. Marras, S. Tyagi, D.O. Antson, F.R. Kramer, Color-coded molecular beacons for multiplex PCR screening assays, *PLoS One.* 14 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213906>.
- [147] J. Kulka, A.M. Tokés, P. Kaposi-Novák, N. Udvarhelyi, A. Keller, Z. Schaff, Detection of HER-2/neu gene amplification in breast carcinomas using quantitative real-time PCR - A comparison with immunohistochemical and FISH results, *Pathol. Oncol. Res.* 12 (2006) 197–204. <https://doi.org/10.1007/BF02893412>.
- [148] D. Anhof, T. Eggermann, S. Rudnik-Schöneborn, K. Zerres, Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan™ technology, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 74–78. <https://doi.org/10.1002/humu.10221>.
- [149] H. Gudnason, M. Dufva, D.D. Bang, A. Wolff, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: Effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) e127. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm671>.
- [150] P.L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes, DPCR: A technology review, *Sensors (Switzerland).* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18041271>.
- [151] G. Zhu, X. Ye, Z. Dong, Y.C. Lu, Y. Sun, Y. Liu, R. McCormack, Y. Gu, X. Liu, Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer, *J. Mol. Diagnostics.* 17 (2015) 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.01.004>.

G.- Bibliografía

- [152] A.S. Whale, S. Cowen, C.A. Foy, J.F. Huggett, Methods for Applying Accurate Digital PCR Analysis on Low Copy DNA Samples, *PLoS One*. 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058177>.
- [153] K. Carow, C. Read, N. Häfner, I.B. Runnebaum, A. Corner, M. Dürst, A comparative study of digital PCR and real-time qPCR for the detection and quantification of HPV mRNA in sentinel lymph nodes of cervical cancer patients, *BMC Res. Notes*. 10 (2017) 532. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2846-8>.
- [154] S.C. Taylor, G. Laperriere, H. Germain, Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.
- [155] J. Blaya, E. Lloret, A.B. Santísima-Trinidad, M. Ros, J.A. Pascual, Molecular methods (digital PCR and real-time PCR) for the quantification of low copy DNA of *Phytophthora nicotianae* in environmental samples, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 747–753. <https://doi.org/10.1002/ps.4048>.
- [156] A.S. Whale, J.F. Huggett, S. Cowen, V. Speirs, J. Shaw, S. Ellison, C.A. Foy, D.J. Scott, Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012). <https://doi.org/10.1093/nar/gks203>.
- [157] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e57. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf056>.
- [158] J. Kerkhof, L.C. Schenkel, J. Reilly, S. McRobbie, E. Aref-Eshghi, A. Stuart, C.A. Rupar, P. Adams, R.A. Hegele, H. Lin, D. Rodenhiser, J. Knoll, P.J. Ainsworth, B. Sadikovic, Clinical Validation of Copy Number Variant Detection from Targeted Next-Generation Sequencing Panels, *J. Mol. Diagnostics*. 19 (2017) 905–920. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.07.004>.
- [159] J.W.M. Jeuken, S. Comelissen, S. Boots-Sprenger, S. Gijsen, P. Wesseling, Multiplex ligation-dependent probe amplification: A diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors, *J. Mol. Diagnostics*. 8 (2006) 433–443. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060012>.
- [160] J. Coffa, J. van den Berg, Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland, in: *Mod. Approaches To Qual. Control, InTech*, 2011. <https://doi.org/10.5772/21898>.
- [161] R. Roskoski, The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacol. Res.* 79 (2014) 34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>.
- [162] M.J. Wieduwilt, M.M. Moasser, The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 1566–1584. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>.
- [163] C. Gutierrez, R. Schiff, HER2: Biology, detection, and clinical implications, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135 (2011) 55–62. <https://doi.org/10.1043/2010-0454-RAR.1>.
- [164] ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI, (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064> (accessed October 3, 2020).
- [165] L. Coussens, T.L. Yang-Feng, Y.C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P.H. Seeburg, T.A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke, A. Levinson, A. Ullrich, Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene, *Science* (80-.). 230 (1985) 1132–1139. <https://doi.org/10.1126/science.2999974>.
- [166] N.C. Popescu, C.R. King, M.H. Kraus, Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32, *Genomics*. 4 (1989) 362–366. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90343-1](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90343-1).
- [167] C. Gutierrez, R. Schiff, HER2: Biology, detection, and clinical implications, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135 (2011) 55–62. <https://doi.org/10.1043/2010-0454-RAR.1>.

- [168] ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)), (n.d.). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ERBB2ID162ch17q11.html> (accessed September 30, 2020).
- [169] A. Dittrich, H. Gautrey, D. Browell, A. Tyson-Capper, The HER2 Signaling Network in Breast Cancer—Like a Spider in its Web, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 19 (2014) 253–270. <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9329-5>.
- [170] Q. Lv, Z. Meng, Y. Yu, F. Jiang, D. Guan, C. Liang, J. Zhou, A. Lu, G. Zhang, Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17122095>.
- [171] C. Tsé, A.S. Gauchez, W. Jacot, P.J. Lamy, HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: Biology and clinical utility in breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* 38 (2012) 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.03.008>.
- [172] T.A. Christianson, J.K. Doherty, Y.J. Lin, E.E. Ramsey, R. Holmes, E.J. Keenan, G.M. Clinton, NH2-terminally Truncated HER-2/neu Protein: Relationship with Shedding of the Extracellular Domain and with Prognostic Factors in Breast Cancer, *Cancer Res.* 58 (1998).
- [173] A. Perrier, J. Gligorov, G. Lefèvre, M. Boissan, The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer, *Lab. Investig.* 98 (2018) 696–707. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0033-8>.
- [174] J.A. Freudenberg, Q. Wang, M. Katsumata, J. Drebin, I. Nagatomo, M.I. Greene, The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies, *Exp. Mol. Pathol.* 87 (2009) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.05.001>.
- [175] D. Furrer, C. Paquet, S. Jacob, C. Diorio, The Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Prognostic and Predictive Biomarker: Molecular Insights into HER2 Activation and Diagnostic Implications, in: *Cancer Progn.*, IntechOpen, 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78271>.
- [176] O.P. Kallioniemi, A. Kallioniemi, W. Kurisu, A. Thor, L.C. Chen, H.S. Smith, F.M. Waldman, D. Pinkel, J.W. Gray, ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 5321–5325. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5321>.
- [177] A. Adamczyk, A. Grela-Wojewoda, M. Domagala-Haduch, A. Ambicka, A. Harazin-Lechowska, A. Janecka, I. Cedrych, K. Majchrzyk, A. Kruczak, J. Rys, J. Niemiec, Proteins involved in HER2 signalling pathway, their relations and influence on metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting, *J. Cancer*. 8 (2017) 131–139. <https://doi.org/10.7150/jca.16239>.
- [178] R.M. Neve, H.A. Lane, N.E. Hynes, The role of overexpressed HER2 in transformation, *Ann. Oncol.* 12 (2001) S9–S13. https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_1.S9.
- [179] U. Krishnamurti, J.F. Silverman, HER2 in Breast Cancer, *Adv. Anat. Pathol.* 21 (2014) 100–107. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000015>.
- [180] D.J. Slamon, W. Godolphin, L.A. Jones, J.A. Holt, S.G. Wong, D.E. Keith, W.J. Levin, S.G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M.F. Press, Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* (80-.). 244 (1989) 707–712. <https://doi.org/10.1126/science.2470152>.
- [181] J.S. Ross, E.A. Slodkowska, W.F. Symmans, L. Pusztai, P.M. Ravdin, G.N. Hortobagyi, The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine LEARNING OBJECTIVES, (2009). <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0230>.
- [182] K.A. Cronin, L.C. Harlan, K.W. Dodd, J.S. Abrams, R. Ballard-Barbash, Population-based estimate of the prevalence of HER-2 positive breast cancer tumors for early stage patients in the US, *Cancer Invest.* 28 (2010) 963–968. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.496759>.

G.- Bibliografía

- [183] N. Pathmanathan, J. Geng, W. Li, X. Nie, J. Veloso, J. Hill, P. McCloud, M. Bilous, Human epidermal growth factor receptor 2 status of breast cancer patients in Asia: Results from a large, multicountry study, *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* 12 (2016) 369–379. <https://doi.org/10.1111/ajco.12514>.
- [184] S. Ménard, S. Fortis, F. Castiglioni, R. Agresti, A. Balsari, HER2 as a Prognostic Factor in Breast Cancer, *Oncology.* 61 (2001) 67–72. <https://doi.org/10.1159/000055404>.
- [185] I. Kümler, M.K. Tuxen, D.L. Nielsen, A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.002>.
- [186] J.A. Incorvati, S. Shah, Y. Mu, J. Lu, Targeted therapy for HER2 positive breast cancer, *J. Hematol. Oncol.* 6 (2013) 38. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-38>.
- [187] P. Carter, L. Presta, C.M. Gorman, J.B.B. Ridgway, D. Henner, W.L.T. Wong, A.M. Rowland, C. Kotts, M.E. Carver, H.M. Shepard, Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4285–4289. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4285>.
- [188] P.J. Medina, S. Goodin, Lapatinib: A dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, *Clin. Ther.* 30 (2008) 1426–1447. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.08.008>.
- [189] N. Patani, L.A. Martin, M. Dowsett, Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective, *Int. J. Cancer.* 133 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.27997>.
- [190] D. Furrer, F. Sanschagrín, S. Jacob, C. Diorio, Advantages and disadvantages of technologies for HER2 Testing in Breast Cancer Specimens, *Am. J. Clin. Pathol.* 144 (2015) 686–703. <https://doi.org/10.1309/AJCPT41TCBUEVDQC>.
- [191] E.A. Perez, J. Cortés, A.M. Gonzalez-Angulo, J.M.S. Bartlett, HER2 testing: Current status and future directions, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.001>.
- [192] A. Noske, S. Loibl, S. Darb-Esfahani, M. Roller, ..., G. Von Minckwitz, Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: Prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765), *Breast Cancer Res. Treat.* 126 (2011) 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1316-y>.
- [193] M. Cronin, M. Pho, D. Dutta, J.C. Stephans, S. Shak, M.C. Kiefer, J.M. Esteban, J.B. Baker, Measurement of Gene Expression in Archival Paraffin-Embedded Tissues: Development and Performance of a 92-Gene Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63093-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63093-3).
- [194] J. Tchou, L. Lam, Y.R. Li, C. Edwards, B. Ky, H. Zhang, Monitoring serum HER2 levels in breast cancer patients, *Springerplus.* 4 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1015-6>.
- [195] S.S. Ahmed, J. Iqbal, A.A. Thike, A.S.T. Lim, T.H. Lim, S.L. Tien, P.H. Tan, HER2/neu revisited: Quality and interpretive issues, *J. Clin. Pathol.* 64 (2011) 120–124. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.085423>.
- [196] S.A. Frank, *Immunology and Evolution of Infectious Disease*, Princeton University Press, 2002. <https://doi.org/10.2307/j.ctv15r5djw>.
- [197] I.A. Darwish, *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances.*, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 217–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674985> (accessed June 10, 2021).
- [198] David Wild, *The Immunoassay Handbook*, Fourth ed., Elsevier Science, 2013.
- [199] M. Alhaji, A. Farhana, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, StatPearls Publishing, 2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310382> (accessed September 8, 2021).

- [200] D.P. Bishop, N. Cole, T. Zhang, P.A. Doble, D.J. Hare, A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 3770–3787. <https://doi.org/10.1039/c7cs00610a>.
- [201] K. Kaliyappan, M. Palanisamy, J. Duraiyan, R. Govindarajan, Applications of immunohistochemistry, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4 (2012) 307. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>.
- [202] D. Varshney, Y.Y. Zhou, S.A. Geller, R. Alsabeh, Determination of HER-2 Status and Chromosome 17 Polysomy in Breast Carcinomas Comparing HercepTest and PathVysion FISH Assay, *Am. J. Clin. Pathol.* 121 (2004) 70–77. <https://doi.org/10.1309/fuqh-92b0-3902-5lhg>.
- [203] H. Yaziji, L.C. Goldstein, T.S. Barry, R. Werling, H. Hwang, G.K. Ellis, J.R. Gralow, R.B. Livingston, A.M. Gown, HER-2 Testing in Breast Cancer Using Parallel Tissue-Based Methods, *J. Am. Med. Assoc.* 291 (2004) 1972–1977. <https://doi.org/10.1001/jama.291.16.1972>.
- [204] Leica Bond Oracle™ HER2 IHC System para cáncer de mama, n.d.
- [205] A.C. Wolff, M. Elizabeth Hale Hammond, K.H. Allison, B.E. Harvey, ..., M. Dowsett, Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.77.8738>.
- [206] A.C. Wolff, M. Elizabeth, H. Hammond, K.H. Allison, B.E. Harvey, P.B. Mangu, J.M.S. Bartlett, M. Bilous, I.O. Ellis, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R.B. Jenkins, M.F. Press, P.A. Spears, G.H. Vance, G. Viale, L.M. Mcshane, M. Dowsett, JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY ASCO SPECIAL ARTICLE Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update, *J Clin Oncol.* 36 (2018) 2105–2122. <https://doi.org/10.1200/JCO>.
- [207] C. Marchiò, L. Annaratone, A. Marques, L. Casorzo, E. Berrino, A. Sapino, Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond, *Semin. Cancer Biol.* 72 (2021) 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.016>.
- [208] K.J. Bloom, R.J. Cote, Both Immunohistochemistry and Fluorescence In Situ Hybridization Play Important Roles for HER2 Evaluation Point/Counterpoint, *Clin. Chem.* 57 (2011) 983–985. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.160853>.
- [209] S. Aydin, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides.* 72 (2015) 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- [210] E. Engvall, K. Jonsson, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin g, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes, *BBA - Protein Struct.* 251 (1971) 427–434. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(71\)90132-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(71)90132-2).
- [211] B.K. Van Weemen, A.H.W.M. Schuurs, Immunoassay using antigen-enzyme conjugates, *FEBS Lett.* 15 (1971) 232–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8).
- [212] V. Agnolon, A. Contato, A. Meneghello, E. Tagliabue, G. Toffoli, M. Gion, F. Polo, A.S.C. Fabricio, ELISA assay employing epitope-specific monoclonal antibodies to quantify circulating HER2 with potential application in monitoring cancer patients undergoing therapy with trastuzumab, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59630-y>.
- [213] S. Shukla, B.K. Singh, O.P. Pathania, M. Jain, Evaluation of HER2/neu oncoprotein in serum & tissue samples of women with breast cancer, *Indian J. Med. Res. Suppl.* 143 (2016) 52–58. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.191769>.
- [214] L. Lam, N. McAndrew, M. Yee, T. Fu, J.C. Tchou, H. Zhang, Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1826 (2012) 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.012>.

G.- Bibliografía

- [215] A.F. Leary, W.M. Hanna, M.J. Van De Vijver, F. Penault-Llorca, J. Rüschoff, R.Y. Osamura, M. Bilous, M. Dowsett, Value and limitations of measuring HER-2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients, *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 1694–1705. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.3989>.
- [216] V. Ludovini, S. Gori, M. Colozza, L. Pistola, E. Rulli, I. Floriani, E. Pacifico, F.R. Tofanetti, A. Sidoni, C. Basurto, A. Rull, L. Crinò, Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: Correlation with clinicopathological parameters and survival, *Ann. Oncol.* 19 (2008) 883–890. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm585>.
- [217] S. Zhang, A. Garcia-D'Angeli, J.P. Brennan, Q. Huo, Predicting detection limits of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and bioanalytical techniques in general, *Analyst.* 139 (2013) 439–445. <https://doi.org/10.1039/c3an01835k>.
- [218] C. Yan, J. Teng, F. Liu, B. Yao, Z. Xu, L. Yao, W. Chen, Signal amplified enzyme-linked immunosorbent assay with gold nanoparticles for sensitive detection of trace furaltadone metabolite, *Microchem. J.* 159 (2020) 105414. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105414>.
- [219] T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor, Immuno-PCR: Very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates, *Science* (80-.). 258 (1992) 120–122. <https://doi.org/10.1126/science.1439758>.
- [220] C.M. Niemeyer, Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 90e – 90. <https://doi.org/10.1093/nar/gng090>.
- [221] L. Chang, J. Li, L. Wang, Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection, *Anal. Chim. Acta.* 910 (2016) 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.039>.
- [222] D.Y. Ryazantsev, D. V. Voronina, S.K. Zavriev, Immuno-PCR: achievements and perspectives, *Biochem.* 81 (2016) 1754–1770. <https://doi.org/10.1134/S0006297916130113>.
- [223] P.L. Ey, S.J. Prowse, C.R. Jenkin, Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose, *Mol. Immunol.* 15 (1978) 429–436. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(78\)90070-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(78)90070-6).
- [224] H. Zhou, R.J. Fisher, T.S. Papas, Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target proteindetection, *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 6038–6039. <https://doi.org/10.1093/nar/21.25.6038>.
- [225] R.D. Joerger, T.M. Truby, E.R. Hendrickson, R.M. Young, R.C. Ebersole, Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction, in: *Clin. Chem., American Association for Clinical Chemistry Inc.*, 1995: pp. 1371–1377. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.9.1371>.
- [226] J.A.G.L. Van Buggenum, J.P. Gerlach, S. Eising, L. Schoonen, R.A.P.M. Van Eijl, S.E.J. Tanis, M. Hogeweg, N.C. Hubner, J.C. Van Hest, K.M. Bongers, K.W. Mulder, A covalent and cleavable antibody-DNA conjugation strategy for sensitive protein detection via immuno-PCR, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22675>.
- [227] S.A. Kazane, D. Sok, E.H. Cho, M.L. Uson, P. Kuhn, P.G. Schultz, V. V. Smider, Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 3731–3736. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120682109>.
- [228] J. Dugal-Tessier, S. Thirumalairajan, N. Jain, Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A Twist to Antibody-Drug Conjugates, *J. Clin. Med.* 10 (2021) 838. <https://doi.org/10.3390/jcm10040838>.
- [229] M.C. Hansen, L. Nederby, M. Okkels-Birk Henriksen, M. Hansen, C. Guldborg Nyvold, Sensitive ligand-based protein quantification using immuno-PCR: A critical review of single-probe and proximity ligation assays, *Biotechniques.* 56 (2014) 217–227. <https://doi.org/10.2144/000114164>.
- [230] A.L.F.V. Assumpção, R.C. da Silva, Immuno-PCR in cancer and non-cancer related diseases: a

- review, *Vet. Q.* 36 (2016) 63–70. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1164912>.
- [231] C.M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, Detecting antigens by quantitative immuno-PCR, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1918–1930. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.267>.
- [232] X. Jiang, S. Cheng, W. Chen, L. Wang, F. Shi, C. Zhu, Comparison of oligonucleotide-labeled antibody probe assays for prostate-specific antigen detection, *Anal. Biochem.* 424 (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.004>.
- [233] J. He, D.L. Evers, T.J. O’Leary, J.T. Mason, Immunoliposome-PCR: A generic ultrasensitive quantitative antigen detection system, *J. Nanobiotechnology.* 10 (2012). <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-26>.
- [234] J. Zhang, J.M. Vernes, J. Ni, C. Nelson, A. Wong, S.T. Chen, A. Asundi, R. Vandlen, Y.G. Meng, Real-time immuno-polymerase chain reaction in a 384-well format: Detection of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor-like domain 7, *Anal. Biochem.* 463 (2014) 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.06.024>.
- [235] A.H. Khan, E. Sadroddiny, Application of immuno-PCR for the detection of early stage cancer, *Mol. Cell. Probes.* 30 (2016) 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.010>.
- [236] A. Gough, A.M. Stern, J. Maier, T. Lezon, T.Y. Shun, C. Chennubhotla, M.E. Schurdak, S.A. Haney, D. Lansing Taylor, Biologically relevant heterogeneity: Metrics and practical insights, *SLAS Discov.* 22 (2017) 213–237. <https://doi.org/10.1177/2472555216682725>.
- [237] M.A. Walling, J.R.E. Shepard, Cellular heterogeneity and live cell arrays, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 4049–4076. <https://doi.org/10.1039/c0cs00212g>.
- [238] S.J. Altschuler, L.F. Wu, Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference?, *Cell.* 141 (2010) 559–563. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.033>.
- [239] S. Huang, Non-genetic heterogeneity of cells in development: More than just noise, *Development.* 136 (2009) 3853–3862. <https://doi.org/10.1242/dev.035139>.
- [240] M. Guo, Y. Peng, A. Gao, C. Du, J.G. Herman, Epigenetic heterogeneity in cancer, *Biomark. Res.* 7 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40364-019-0174-y>.
- [241] M. Kærn, T.C. Elston, W.J. Blake, J.J. Collins, Stochasticity in gene expression: From theories to phenotypes, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 451–464. <https://doi.org/10.1038/nrg1615>.
- [242] N. Rosenfeld, J.W. Young, U. Alon, P.S. Swain, M.B. Elowitz, Gene regulation at the single-cell level, *Science* (80-.). 307 (2005) 1962–1965. <https://doi.org/10.1126/science.1106914>.
- [243] F.G. Giancotti, Deregulation of cell signaling in cancer, *FEBS Lett.* 588 (2014) 2558–2570. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.005>.
- [244] I. Dagogo-Jack, A.T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.
- [245] A. Marusyk, V. Almendro, K. Polyak, Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer?, *Nat. Rev. Cancer.* 12 (2012) 323–334. <https://doi.org/10.1038/nrc3261>.
- [246] G.H. Heppner, Tumor Heterogeneity, *Cancer Res.* 44 (1984).
- [247] V. Almendro, A. Marusyk, K. Polyak, Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8 (2013) 277–302. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163923>.
- [248] X.X. Sun, Q. Yu, Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment, *Acta Pharmacol. Sin.* 36 (2015) 1219–1227. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.92>.
- [249] J.W. Yun, S. Lee, D. Ryu, S. Park, W.Y. Park, J.G. Joung, J. Jeong, Biomarkers Associated with Tumor Heterogeneity in Prostate Cancer, *Transl. Oncol.* 12 (2019) 43–48.

G.- Bibliografía

- <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.09.003>.
- [250] K. Cyll, E. Ersvær, L. Vlatkovic, M. Pradhan, W. Kildal, M. Avranden Kjær, A. Kleppe, T.S. Hveem, B. Carlsen, S. Gill, S. Löffeler, E.S. Haug, H. Wæhre, P. Sooriakumaran, H.E. Danielsen, Tumour heterogeneity poses a significant challenge to cancer biomarker research, *Br. J. Cancer*. 117 (2017) 367–375. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.171>.
- [251] L. Yin, Z. Zhang, Y. Liu, Y. Gao, J. Gu, Recent advances in single-cell analysis by mass spectrometry, *Analyst*. 144 (2019) 824–845. <https://doi.org/10.1039/c8an01190g>.
- [252] L. Armbrecht, P.S. Dittrich, Recent Advances in the Analysis of Single Cells, *Anal. Chem.* 89 (2017) 2–21. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04255>.
- [253] N. Slavov, Single-cell protein analysis by mass spectrometry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 60 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.018>.
- [254] M.H. Spitzer, G.P. Nolan, Mass Cytometry: Single Cells, Many Features, *Cell*. 165 (2016) 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>.
- [255] J.R. Dean, *Practical Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Wiley, 2019. <https://doi.org/10.1002/9781119478775>.
- [256] F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk, Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1407–1413. <https://doi.org/10.1021/ac049188l>.
- [257] S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 1784–1813. <https://doi.org/10.1039/d0ja00194e>.
- [258] B. Gomez-Gomez, M. Corte-Rodríguez, M.T. Perez-Corona, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Y. Madrid, Combined single cell and single particle ICP-TQ-MS analysis to quantitatively evaluate the uptake and biotransformation of tellurium nanoparticles in bacteria, *Anal. Chim. Acta*. 1128 (2020) 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.06.058>.
- [259] A. Montaser, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, 1998.
- [260] D. Pröfrock, A. Prange, Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: A review of challenges, solutions, and trends, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 843–868. <https://doi.org/10.1366/12-06681>.
- [261] R. Thomas, *Spectroscopy Tutorial: a Beginner's Guide to ICP-MS*, *Spectroscopy*. 16 (2001) 38–55.
- [262] J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: Determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1143–1155. <https://doi.org/10.1039/c2ja30073g>.
- [263] S.D. Tanner, D.R. Bandura, O. Ornatsky, V.I. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay, in: *Pure Appl. Chem.*, De Gruyter, 2008: pp. 2627–2641. <https://doi.org/10.1351/pac200880122627>.
- [264] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry-A step towards an ideal method for nanomaterial characterization, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 1740–1783. <https://doi.org/10.1039/c9ja00206e>.
- [265] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278. <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- [266] S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, *Metallomics*. 10 (2018) 73–76. <https://doi.org/10.1039/c7mt00285h>.
- [267] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass

- spectrometry data acquisition quality, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, Royal Society of Chemistry, 2014: pp. 1252–1257. <https://doi.org/10.1039/c4ja00097h>.
- [268] M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116042. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116042>.
- [269] K.S. Ho, W.T. Chan, Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1114–1122. <https://doi.org/10.1039/c002272a>.
- [270] J.L. Todolí, J.M. Mermet, Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 61 (2006) 239–283. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.12.010>.
- [271] A.S. Groombridge, S.I. Miyashita, S.I. Fujii, K. Nagasawa, T. Okahashi, M. Ohata, T. Umemura, A. Takatsu, K. Inagaki, K. Chiba, High sensitive elemental analysis of single yeast cells (*saccharomyces cerevisiae*) by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system, *Anal. Sci.* 29 (2013) 597–603. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.597>.
- [272] Single Cell Sample Introduction Kit without Software | PerkinElmer, (n.d.). <https://www.perkinelmer.com/es/product/single-cell-kit-nexion-2000-w-o-software-n8150061> (accessed September 13, 2021).
- [273] E. Mavrikakis, L. Mavroudakis, N. Lydakis-Simantiris, S.A. Pergantis, Investigating the uptake of arsenate by *chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 9590–9598. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00917>.
- [274] R.C. Merrifield, C. Stephan, J.R. Lead, Quantification of Au Nanoparticle Biouptake and Distribution to Freshwater Algae Using Single Cell - ICP-MS, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 2271–2277. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04968>.
- [275] Glass Expansion, High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS, n.d. www.geicp.com (accessed September 13, 2021).
- [276] L. Mueller, H. Traub, N. Jakubowski, D. Drescher, V.I. Baranov, J. Kneipp, Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6963–6977. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8143-7>.
- [277] X. Yu, M. He, B. Chen, B. Hu, Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review, *Anal. Chim. Acta.* 1137 (2020) 191–207. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.041>.
- [278] A.M. Haag, Mass analyzers and mass spectrometers, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2016: pp. 157–169. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7.
- [279] M. Balcerzak, An overview of analytical applications of time of flight-mass spectrometric (TOF-MS) analyzers and an inductively coupled plasma-TOF-MS technique, *Anal. Sci.* 19 (2003) 979–989. <https://doi.org/10.2116/analsci.19.979>.
- [280] N. Jakubowski, New Trends in ICP-MS: On the Way from Single Cell to Single Protein Detection, (n.d.). <https://www.spectroscopyonline.com/view/new-trends-icp-ms-way-single-cell-single-protein-detection> (accessed September 14, 2021).
- [281] L. Hendriks, L.M. Skjolding, Single-Cell Analysis by Inductively Coupled Plasma-Time-of-Flight Mass Spectrometry to Quantify Algal Cell Interaction with Nanoparticles by Their Elemental Fingerprint, n.d. www.tofwerk.com (accessed September 14, 2021).
- [282] A. Schoeberl, S. Theiner, G. Koellensperger, Single-Cell Analysis by ICP-MS—Current Status and Future Trends, (n.d.). <https://www.spectroscopyonline.com/view/single-cell-analysis-icp-ms->

G.- Bibliografía

- current-status-and-future-trends (accessed September 14, 2021).
- [283] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, B. Hattendorf, D. Günther, Characterization of a new ICP-TOFMS instrument with continuous and discrete introduction of solutions, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 548–561. <https://doi.org/10.1039/c6ja00400h>.
- [284] Z. Liu, A. Xue, H. Chen, S. Li, Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 1475–1483. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09587-w>.
- [285] Y. Zhou, H. Wang, E. Tse, H. Li, H. Sun, Cell Cycle-Dependent Uptake and Cytotoxicity of Arsenic-Based Drugs in Single Leukemia Cells, *Anal. Chem.* 90 (2018) 10465–10471. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02444>.
- [286] X. Yu, B. Chen, M. He, H. Wang, B. Hu, 3D Droplet-Based Microfluidic Device Easily Assembled from Commercially Available Modules Online Coupled with ICPMS for Determination of Silver in Single Cell, *Anal. Chem.* (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04844>.
- [287] X. Wei, D.H. Zheng, Y. Cai, R. Jiang, M.L. Chen, T. Yang, Z.R. Xu, Y.L. Yu, J.H. Wang, High-Throughput/High-Precision Sampling of Single Cells into ICP-MS for Elucidating Cellular Nanoparticles, *Anal. Chem.* 90 (2018) 14543–14550. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04471>.
- [288] A. López-Serrano Oliver, S. Baumgart, W. Bremser, S. Flemig, D. Wittke, A. Grützkau, A. Luch, A. Haase, N. Jakubowski, Quantification of silver nanoparticles taken up by single cells using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 1256–1263. <https://doi.org/10.1039/c7ja00395a>.
- [289] M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-González, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative Analysis of Transferrin Receptor 1 (TfR1) in Individual Breast Cancer Cells by Means of Labeled Antibodies and Elemental (ICP-MS) Detection, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15532–15538. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03438>.
- [290] L. Mueller, A.J. Herrmann, S. Techritz, U. Panne, N. Jakubowski, Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3667–3676. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0310-1>.
- [291] D. Torregrosa, G. Grindlay, L. Gras, J. Mora, Immunoassays based on inductively coupled plasma mass spectrometry detection: So far so good, so what?, *Microchem. J.* 166 (2021) 106200. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106200>.
- [292] T.C. de Bang, S. Husted, Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.021>.
- [293] E. Pérez, K. Bierla, G. Grindlay, J. Szpunar, J. Mora, R. Lobinski, E. Pérez, K. Bierla, G. Grindlay, J. Szpunar, J. Mora, R. Lobinski, Lanthanide polymer labels for multiplexed determination of biomarkers in human serum samples by means of size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.056>.
- [294] G. Schwarz, L. Mueller, S. Beck, M.W. Linscheid, DOTA based metal labels for protein quantification: A review, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 221–233. <https://doi.org/10.1039/c3ja50277e>.
- [295] G. Han, M.H. Spitzer, S.C. Bendall, W.J. Fantl, G.P. Nolan, Metal-isotope-tagged monoclonal antibodies for high-dimensional mass cytometry, *Nat. Protoc.* 13 (2018) 2121–2148. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0016-7>.
- [296] L.N. Zheng, M. Wang, H.J. Wang, B. Wang, B. Li, J.J. Li, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, W.Y. Feng, Quantification of proteins using lanthanide labeling and HPLC/ICP-MS detection, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011: pp. 1233–1236. <https://doi.org/10.1039/c1ja00008j>.

- [297] Fluidigm | Consumables | Maxpar Antibodies and Assays, (n.d.). <https://www.fluidigm.com/reagents/maxpar-antibodies-and-assays> (accessed September 15, 2021).
- [298] R. Gadalla, B. Noamani, B.L. MacLeod, R.J. Dickson, M. Guo, W. Xu, S. Lukhele, H.J. Elsaesser, A.R.A. Razak, N. Hirano, T.L. McGaha, B. Wang, M. Butler, C.J. Guidos, P.S. Ohashi, L.L. Siu, D.G. Brooks, Validation of CyTOF Against Flow Cytometry for Immunological Studies and Monitoring of Human Cancer Clinical Trials, *Front. Oncol.* 9 (2019) 415. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00415>.
- [299] K.R. Atkuri, J.C. Stevens, H. Neubert, Mass cytometry: A highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development, *Drug Metab. Dispos.* 43 (2015) 227–233. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060798>.
- [300] O. Ornatsky, D. Bandura, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, S. Tanner, Highly multiparametric analysis by mass cytometry, *J. Immunol. Methods.* 361 (2010) 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.07.002>.
- [301] Z.B. Bjornson, G.P. Nolan, W.J. Fantl, Single-cell mass cytometry for analysis of immune system functional states, *Curr. Opin. Immunol.* 25 (2013) 484–494. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.07.004>.
- [302] H.G. Fienberg, E.F. Simonds, W.J. Fantl, G.P. Nolan, B. Bodenmiller, A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry, *Cytom. Part A.* 81 A (2012) 467–475. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22067>.
- [303] S.C. Bendall, G.P. Nolan, M. Roederer, P.K. Chattopadhyay, A deep profiler's guide to cytometry, *Trends Immunol.* 33 (2012) 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.010>.
- [304] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, S A Atomic Spectroscopy A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS Isotope Abundance Interference Reference A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS, n.d.
- [305] Element™ Series HR-ICP-MS, (n.d.). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAEGAAMFABWMAFC#/IQLAAEGAA MFABWMAFC> (accessed October 5, 2021).
- [306] N. Jakubowski, Analytical plasma ion sources for elemental mass spectrometry: Where are we coming from-where are we going to?, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008: pp. 673–684. <https://doi.org/10.1039/b717321k>.
- [307] TQ ICP-MS iCAP™, (n.d.). https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/731546?ce=E.21CMD.DL107.39850.01&cid=E.21CMD.DL107.39850.01&ef_id=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWIYYy-jdpo1lu3gE1-c2nqMeDh1kAPtUCyxfUgR6DhZyrDDzMpeuoRoCUEgQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!356224903374!e!!g!!thermo icap tq#/731546?ce=E.21CMD.DL107.39850.01&cid=E.21CMD.DL107.39850.01&ef_id=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWIYYy-jdpo1lu3gE1-c2nqMeDh1kAPtUCyxfUgR6DhZyrDDzMpeuoRoCUEgQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!356224903374!e!!g!!thermo icap tq (accessed October 5, 2021).
- [308] ECACC General Cell Collection: 93112519 A2780, (n.d.). https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112519&collection=ecacc_gc (accessed October 5, 2021).
- [309] ECACC General Cell Collection: 93112517 A2780cis, (n.d.). https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=93112517&collection=ecacc_gc (accessed October 5, 2021).
- [310] NIH:OVCAR-3 [OVCAR3] | ATCC, (n.d.). <https://www.atcc.org/products/htb-161> (accessed October 5, 2021).

G.- Bibliografía

- [311] ECACC General Cell Collection: 92020424 MDA-MB-231, (n.d.). https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424&collection=eacc_gc (accessed October 5, 2021).
- [312] ECACC General Cell Collection: 86012803 MCF7, (n.d.). https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803&collection=eacc_gc (accessed October 5, 2021).
- [313] SK-BR-3 [SKBR3] | ATCC, (n.d.). <https://www.atcc.org/products/htb-30> (accessed October 5, 2021).
- [314] BT-474 | ATCC, (n.d.). <https://www.atcc.org/products/htb-20> (accessed October 5, 2021).
- [315] A. Schroeder, O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, T. Ragg, The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC Mol. Biol.* 7 (2006) 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>.
- [316] D. Harpaz, E. Eltzov, T.S.E. Ng, R.S. Marks, A.I.Y. Tok, Enhanced Colorimetric Signal for Accurate Signal Detection in Paper-Based Biosensors, *Diagnostics.* 10 (2020) 28. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10010028>.
- [317] T.H. Shaikh, Copy Number Variation Disorders, *Curr. Genet. Med. Rep.* 5 (2017) 183–190. <https://doi.org/10.1007/s40142-017-0129-2>.
- [318] K. Chin, S. DeVries, J. Fridlyand, P.T. Spellman, R. Roydasgupta, W.L. Kuo, A. Lapuk, R.M. Neve, Z. Qian, T. Ryder, F. Chen, H. Feiler, T. Tokuyasu, C. Kingsley, S. Dairkee, Z. Meng, K. Chew, D. Pinkel, A. Jain, B.M. Ljung, L. Esserman, D.G. Albertson, F.M. Waldman, J.W. Gray, Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies, *Cancer Cell.* 10 (2006) 529–541. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.009>.
- [319] K.A. Kwei, Y. Kung, K. Salari, I.N. Holcomb, J.R. Pollack, Genomic instability in breast cancer: Pathogenesis and clinical implications, *Mol. Oncol.* 4 (2010) 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.001>.
- [320] L.W.M. Loo, D.I. Grove, E.M. Williams, C.L. Neal, L.A. Couse, E.L. Schubert, I.N. Holcomb, H.F. Massa, J. Glogovac, C.I. Li, K.E. Malone, J.R. Daling, J.J. Delrow, B.J. Trask, L. Hsu, P.L. Porter, Array comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in breast cancer subtypes, *Cancer Res.* 64 (2004) 8541–8549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1992>.
- [321] B.E. Stranger, M.S. Forrest, M. Dunning, C.E. Ingle, C. Beazley, N. Thorne, R. Redon, C.P. Bird, A. De Grassi, C. Lee, C. Tyler-Smith, N. Carter, S.W. Scherer, S. Tavaré, P. Deloukas, M.E. Hurles, E.T. Dermitzakis, Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene phenotypes, *Science* (80-.). 315 (2007) 848–853. <https://doi.org/10.1126/science.1136678>.
- [322] X. Pan, X. Hu, Y.-H. Zhang, L. Chen, L. Zhu, S. Wan, T. Huang, Y.-D. Cai, Identification of the copy number variant biomarkers for breast cancer subtypes, 294 (2019) 95–110. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1488-4>.
- [323] T. Iglesias González, M. Espina, L.M. Sierra, J. Bettmer, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Enhanced detection of DNA sequences using end-point PCR amplification and online gel electrophoresis (GE)-ICP-MS: Determination of gene copy number variations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11028–11032. <https://doi.org/10.1021/ac502671f>.
- [324] D. Bell, A. Berchuck, M. Birrer, J. Chien, ..., E. Thomson, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma, *Nature.* 474 (2011) 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>.
- [325] Z. Ping, Y. Xia, T. Shen, V. Parekh, G.P. Siegal, I.E. Eltoum, J. He, D. Chen, M. Deng, R. Xi, D. Shen, A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27545>.
- [326] H.C. Lien, Y.L. Chen, Y.L. Juang, Y.M. Jeng, Frequent alterations of HER2 through mutation, amplification, or overexpression in pleomorphic lobular carcinoma of the breast, *Breast Cancer*

- Res. Treat. 150 (2015) 447–455. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3336-0>.
- [327] H. Norppa, Genetic polymorphisms and chromosome damage, in: *Int. J. Hyg. Environ. Health*, Elsevier GmbH, 2001: pp. 31–38. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00069>.
- [328] Q. Yang, H.A.A. Ali, S. Yu, L. Zhang, X. Li, Z. Du, G. Zhang, Evaluation and validation of the suitable control genes for quantitative PCR studies in plasma DNA for non-invasive prenatal diagnosis, *Int. J. Mol. Med.* 34 (2014) 1681–1687. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1944>.
- [329] K. V. Ferry, T.C. Hamilton, S.W. Johnson, Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ERCC1-XPF, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1305–1313. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00441-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00441-X).
- [330] J. Zisowsky, S. Koegel, S. Leyers, K. Devarakonda, M.U. Kassack, M. Osmak, U. Jaehde, Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.003>.
- [331] N. Tajeddine, L. Galluzzi, O. Kepp, E. Hangen, E. Morselli, L. Senovilla, N. Araujo, G. Pinna, N. Larochette, N. Zamzami, N. Modjtahedi, A. Harel-Bellan, G. Kroemer, Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death, *Oncogene.* 27 (2008) 4221–4232. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.63>.
- [332] Primer3 Input, (n.d.). <https://primer3.ut.ee/> (accessed September 21, 2021).
- [333] OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT, (n.d.). <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer> (accessed September 21, 2021).
- [334] L.L. Fernández, M. Montes-Bayón, E.B. González, L.M. Sierra, A. Sanz-Medel, J. Bettmer, Initial studies on quantitative DNA induced oxidation by gel electrophoresis (GE)-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 195–200. <https://doi.org/10.1039/c0ja00163e>.
- [335] M. Arandjelovic, K. Guschanski, G. Schubert, T.R. Harris, O. Thalmann, H. Siedel, L. Vigilant, Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples, *Mol. Ecol. Resour.* 9 (2009) 28–36. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02387.x>.
- [336] S. Varma, Y. Pommier, M. Sunshine, J.N. Weinstein, W.C. Reinhold, High resolution copy number variation data in the NCI-60 cancer cell lines from whole genome microarrays accessible through CellMiner, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092047>.
- [337] D. Etemadmoghadam, B.A. Weir, G. Au-Yeung, K. Alsop, G. Mitchell, J. George, S. Davis, A.D. D'Andrea, K. Simpson, W.C. Hahn, D.D.L. Bowtell, Synthetic lethality between CCNE1 amplification and loss of BRCA1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 19489–19494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314302110>.
- [338] K. Mitrunen, N. Jourenkova, V. Kataja, M. Eskelinen, V. Kosma, S. Benhamou, H. Vainio, M. Uusitupa, A. Hirvonen, Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer., *Undefined.* (2001).
- [339] X.P. Yue, T.C. Chang, J.M. DeJarnette, C.E. Marshall, C.Z. Lei, W.S. Liu, Copy number variation of PRAMEY across breeds and its association with male fertility in Holstein sires, *J. Dairy Sci.* 96 (2013) 8024–8034. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7037>.
- [340] M. Espina, M. Corte-Rodríguez, L. Aguado, M. Montes-Bayón, M.I. Sierra, P. Martínez-Cambor, E. Blanco-González, L.M. Sierra, Cisplatin resistance in cell models: evaluation of metallomic and biological predictive biomarkers to address early therapy failure, *Metallomics.* 9 (2017) 564–574. <https://doi.org/10.1039/C7MT00014F>.
- [341] M. Corte-Rodríguez, M. Espina, L.M. Sierra, E. Blanco, T. Ames, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Quantitative evaluation of cellular uptake, DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines: Comparison of different Pt-containing drugs, *Biochem. Pharmacol.* 98 (2015) 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.112>.

G.- Bibliografía

- [342] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*. 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [343] M.J. Duffy, J.M. Bonfrer, J. Kulpa, G.J.S. Rustin, G. Soletormos, G.C. Torre, M.K. Tuxen, M. Zwirner, CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use, *Int. J. Gynecol. Cancer*. 15 (2005) 679–691. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00130.x>.
- [344] L. Loo, J.A. Capobianco, W. Wu, X. Gao, W.Y. Shih, W.H. Shih, K. Pourrezaei, M.K. Robinson, G.P. Adams, Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers, *Anal. Chem*. 83 (2011) 3392–3397. <https://doi.org/10.1021/ac103301r>.
- [345] E. Fitzpatrick, B.J. Czerniecki, Interference-Free HER2 ECD as a Serum Biomarker in Breast Cancer, *J. Mol. Biomark. Diagn*. 04 (2013) 151. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.1000151>.
- [346] C.L. Arteaga, M.X. Sliwkowski, C.K. Osborne, E.A. Perez, F. Puglisi, L. Gianni, Treatment of HER2-positive breast cancer: Current status and future perspectives, *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 9 (2012) 16–32. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.177>.
- [347] J. Flanigon, M. Kamali-Moghaddam, I. Burbulis, C. Annink, M. Steffen, P. Oeth, R. Brent, D. van den Boom, U. Landegren, C. Cantor, Multiplex protein detection with DNA readout via mass spectrometry, *N. Biotechnol*. 30 (2013) 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.003>.
- [348] C.M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, Immuno-PCR: High sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification, *Trends Biotechnol*. 23 (2005) 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.006>.
- [349] N. Malou, D. Raoult, Immuno-PCR: A promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies, *Trends Microbiol*. 19 (2011) 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.004>.
- [350] Software Vector NTI - ES, (n.d.). [//www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html](http://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html) (accessed September 24, 2021).
- [351] A. Gauchez, N. Ravel, D. Villemain, F.-X. Brand, D. Pasquier, R. Payan, M. Mousseau, Evaluation of a Manual ELISA Kit for Determination of HER2/neu in Serum of Breast Cancer Patients, *Anticancer Res*. 28 (2008).
- [352] A. Lievens, S. van Aelst, M. van den Bulcke, E. Goetghebeur, Simulation of between Repeat Variability in Real Time PCR Reactions, *PLoS One*. 7 (2012) e47112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047112>.
- [353] T. Iglesias González, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, New strategy to address DNA-methyltransferase activity in ovarian cancer cell cultures by monitoring the formation of 5-methylcytosine using HPLC-UV, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci*. 1028 (2016) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.038>.
- [354] T. Pham, A. Tyagi, Y. Wang, J. Guo, Single-cell proteomic analysis, *WIREs Mech. Dis*. 13 (2021) e1503. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1503>.
- [355] K.D. Duncan, J. Fyrestam, I. Lanekoff, Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics, *Analyst*. 144 (2019) 782–793. <https://doi.org/10.1039/c8an01581c>.
- [356] A. Kulkarni, A.G. Anderson, D.P. Merullo, G. Konopka, Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications, *Curr. Opin. Biotechnol*. 58 (2019) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.001>.
- [357] T. Fehm, S. Becker, S. Duerr-Stoerzer, K. Sotlar, V. Mueller, D. Wallwiener, N. Lane, E. Solomayer, J. Uhr, Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status., *Breast Cancer Res*. 9 (2007). <https://doi.org/10.1186/bcr1783>.

- [358] T. Fehm, V. Müller, B. Aktas, W. Janni, A. Schneeweiss, E. Stickeler, C. Lattrich, C.R. Löhberg, E. Solomayer, B. Rack, S. Riethdorf, C. Klein, C. Schindlbeck, K. Brocker, S. Kasimir-Bauer, D. Wallwiener, K. Pantel, HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: A prospective, multicenter trial, *Breast Cancer Res. Treat.* 124 (2010) 403–412. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1163-x>.
- [359] H. Frithiof, K. Aaltonen, L. Rydén, A FISH-based method for assessment of HER-2 amplification status in breast cancer circulating tumor cells following CellSearch isolation, *Onco. Targets. Ther.* 9 (2016) 7095–7103. <https://doi.org/10.2147/OTT.S118502>.
- [360] J.A. Mayer, T. Pham, K.L. Wong, J. Scoggin, E. V. Sales, T. Clarin, T.J. Pircher, S.D. Mikolajczyk, P.D. Cotter, F.Z. Bischoff, FISH-based determination of HER2 status in circulating tumor cells isolated with the microfluidic CEE™ platform, *Cancer Genet.* 204 (2011) 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.10.011>.
- [361] S. Zhang, L. Li, T. Wang, L. Bian, H. Hu, C. Xu, B. Liu, Y. Liu, M. Cristofanilli, Z. Jiang, Real-time HER2 status detected on circulating tumor cells predicts different outcomes of anti-HER2 therapy in histologically HER2-positive metastatic breast cancer patients, *BMC Cancer.* 16 (2016) 526. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2578-5>.
- [362] T. Lozar, K. Gersak, M. Cemazar, C.G. Kuhar, T. Jesenko, The biology and clinical potential of circulating tumor cells, *Radiol. Oncol.* 53 (2019) 131–147. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0024>.
- [363] Y.F. Sun, X.R. Yang, J. Zhou, S.J. Qiu, J. Fan, Y. Xu, Circulating tumor cells: Advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137 (2011) 1151–1173. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-0988-y>.
- [364] X. Hu, X. Zang, Y. Lv, Detection of circulating tumor cells: Advances and critical concerns (Review), *Oncol. Lett.* 21 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12683>.
- [365] G. De Rubis, S. Rajeev Krishnan, M. Bebawy, Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis, *Trends Pharmacol. Sci.* 40 (2019) 172–186. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.006>.
- [366] M. Corte Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative Evaluation of Cisplatin Uptake in Sensitive and Resistant Individual Cells by Single-Cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.* 89 (2017) 11491–11497. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02746>.
- [367] Human ErbB2/Her2 (Research Grade Trastuzumab Biosimilar) Antibody MAB9589-100: R&D Systems, (n.d.). https://www.rndsystems.com/products/human-erbb2-her2-research-grade-trastuzumab-biosimilar-antibody-hu5_mab9589 (accessed October 3, 2021).
- [368] R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K.L. Leblanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: Analytical strategies based on ICP-TQ-MS, *Analyst.* 145 (2020) 1457–1465. <https://doi.org/10.1039/c9an01565e>.
- [369] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9369. <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- [370] F. Laborda, J. Jiménez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1362–1371. <https://doi.org/10.1039/c0ja00098a>.
- [371] L. Amable, S. Smith, C. Stephan, New Research Evaluating Cisplatin Uptake in Ovarian Cancer Cells by Single Cell ICP-MS | Enhanced Reader, 2017.

G.- Bibliografía

- [372] X. Dai, H. Cheng, Z. Bai, J. Li, Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping, *J. Cancer*. 8 (2017) 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.
- [373] M.S. Gee, R. Upadhyay, H. Bergquist, H. Alencar, F. Reynolds, M. Maricevich, R. Weissleder, L. Josephson, U. Mahmood, Human breast cancer tumor models: Molecular imaging of drug susceptibility and dosing during HER2/neu-targeted therapy, *Radiology*. 248 (2008) 925–935. <https://doi.org/10.1148/radiol.2482071496>.
- [374] Z. Liu, Y. Lee, J.H. Jang, Y. Li, X. Han, K. Yokoi, M. Ferrari, L. Zhou, L. Qin, Microfluidic cytometric analysis of cancer cell transportability and invasiveness, *Sci. Rep.* 5 (2015) 14272. <https://doi.org/10.1038/srep14272>.
- [375] P.A. Kenny, G.Y. Lee, C.A. Myers, R.M. Neve, J.R. Semeiks, P.T. Spellman, K. Lorenz, E.H. Lee, M.H. Barcellos-Hoff, O.W. Petersen, J.W. Gray, M.J. Bissell, The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression, *Mol. Oncol.* 1 (2007) 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>.
- [376] N. Takegawa, J. Tsurutani, H. Kawakami, K. Yonesaka, R. Kato, K. Haratani, H. Hayashi, M. Takeda, Y. Nonagase, O. Maenishi, K. Nakagawa, [fam-] trastuzumab deruxtecan, antitumor activity is dependent on HER2 expression level rather than on *HER2* amplification, *Int. J. Cancer*. 145 (2019) 3414–3424. <https://doi.org/10.1002/ijc.32408>.
- [377] S.J. Potts, J.S. Krueger, N.D. Landis, D.A. Eberhard, G. David Young, S.C. Schmechel, H. Lange, Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue, *Lab. Investig.* 92 (2012) 1342–1357. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.91>.

***H.- Publicaciones
derivadas***

H.- Publicaciones derivadas

A continuación, se enumeran y se adjuntan las publicaciones realizadas en revistas científicas derivadas del trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral:

- A. A. Fernández Asensio, T. Iglesias, A. Cotarelo, M. Espina, E. Blanco-González, L.M. Sierra, M. Montes-Bayón. *Multiplex polymerase chain reaction in combination with gel electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for the determination of gene copy number variations and gene expression changes*. Anal. Chim. Acta, 2018, 1023, 64-73.

- B. A. Fernández Asensio, L.M. Sierra, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González. *Sensitive determination of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) by immuno-polymerase chain reaction with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection*. Anal. Chem. Acta, 2019, 1090, 39-46.

- C. A. Fernández Asensio, M. Corte-Rodríguez, J. Bettmer, L.M. Sierra, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González. *Targeting HER2 protein in individual cells using ICP-MS detection and its potential as prognostic and predictive breast cancer biomarker*. Talanta, 2021, 235.



Multiplex polymerase chain reaction in combination with gel electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for the determination of gene copy number variations and gene expression changes

A. Fernández Asensio^{a, b}, T. Iglesias^b, A. Cotarelo^a, M. Espina^a, E. Blanco-González^b, L.M. Sierra^{a, *}, M. Montes-Bayón^{b, **}

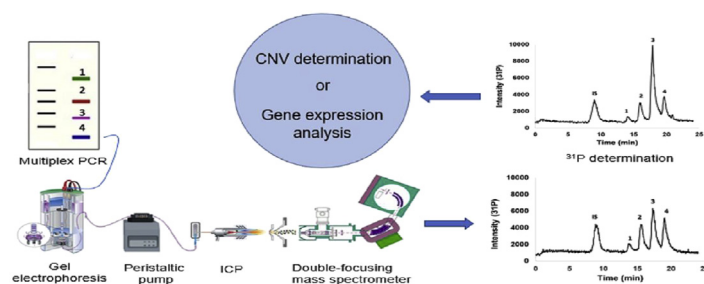
^a Department of Functional Biology (Genetic Area) and Oncology University Institute from Principado de Asturias (IUOPA), University of Oviedo, C/ Julián Clavería s/n, 33006, Oviedo, Spain

^b Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, C/ Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

HIGHLIGHTS

- Conventional multiplex PCR was combined with GE-ICP-MS for CNV and gene expression analyses in cancer cells.
- Amplicons were separated, identified and label-free quantitate through ³¹P monitoring.
- CNVs results obtained with this method were in accordance to literature data and to uniplex qPCR results.
- This method provided the same information on relative gene expression for three genes, as single reaction RT-qPCR.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2017

Received in revised form

9 March 2018

Accepted 10 March 2018

Available online 29 March 2018

Keywords:

Copy number variations

Gene expression analysis

Multiplex polymerase chain reaction

Gel electrophoresis coupled to inductively

coupled plasma mass spectrometry

Reverse transcription-quantitative

polymerase chain reaction

ABSTRACT

During the last few years multiplex real-time or quantitative polymerase chain reaction PCR (qPCR) has become the method of choice for multiplex gene expression changes and gene copy number variations (CNVs) analysis. However, such determinations require the use of different fluorescent labels for the different amplified sequences, which increases significantly the costs of the analysis and limits the applicability of the technique for simultaneous amplification of many targets of interest in a single reaction. In this regard, the use of the coupling between gel electrophoresis (GE) separation with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection allows the label-free determination of multiplex PCR-amplified sequences (amplicons) by monitoring the P present in the DNA backbone. The quantitative dimension is obtained since under optimal and controlled multiplex PCR conditions the peak areas of the separated amplicons are directly proportional to the amount of DNA template in the original sample. Moreover, the calibration of the GE-ICP-MS system with a DNA ladder permits direct estimation of the size (bp) of the PCR products. The suitability of the proposed multiplex strategy has been evaluated addressing two different situations: determination of CNVs and gene expression changes in human ovarian cancer cells. In the first case, the results obtained for the simultaneous quantitation of

* Corresponding author. Dpto. Biología Funcional, Área de Genética, C/Julián Clavería s/n, 33006 Oviedo, Spain.

** Corresponding author. Dpto. Química Física y Analítica, Facultad de Química, C/Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

E-mail addresses: lsierra@uniovi.es (L.M. Sierra), montesmaria@uniovi.es (M. Montes-Bayón).

CNVs of four genes (*HER2*, *CCNE1*, *GSTM1*, *ACTB*) on DNA obtained from OVCAR-3 cells were in accordance with the literature data, and also with the results obtained by conventional simplex qPCR. In the second case, multiplex gene expression changes of *BAX*, *ERCC1* and *CTR1* genes, using *ACTB* as constitutive gene, on A2780cis respect to A2780 cells, resistant and sensitive to cisplatin, respectively, provided the same information as single reaction reverse transcription (RT)-qPCR.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Determination of variations in DNA gene copy number under the form of deletions and duplications of more than one gene or gene fragment [1,2] has become increasingly important, since these copy number variations (CNVs) are extensively related to a great number of human diseases and syndromes [2–5], from infectious, autoimmune and neuropsychiatric disorders to cancer [6,7]. Therefore, reliable and efficient determination of CNVs will be essential to develop diagnostic, prognostic and therapeutics tools for CNVs-related diseases.

Similarly, gene expression analysis, which provides quantitative information about the population of messenger RNA (mRNA) transcripts in cells and tissues, is important for identifying genes involved in the development of diseases such as cancer [8,9]. Gene expression is crucial in all normal cellular events but it is also a necessary step to the pathogenic events that drive the development and progression of a disease, as well as governing response to therapy [10–12]. Thus, determination of gene expression in a multiplex way, with the aim of improving the diagnosis of a disease, predict therapeutic response, and determine disease prognosis is a current topic of active research [8,9].

In the case of CNVs, monitoring of such variations has been traditionally conducted by well-known and widely applied techniques [13,14] such as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and comparative genomic hybridization with DNA microarrays (array-CGH) [15,16], which is also widely used for gene expression determination. FISH analysis for targeted DNA regions is a difficult technique to implement as a multiplex assay, while array-CGH allows for simultaneous screening of many genes across the entire genome with high resolution [17–19] and even ultra-high resolution [20]. However, the lack of standardized reference samples and the large incongruities in the results from the different commercial array-CGH platforms highlight the need for standardizing array data collection, quality assessment and experimental validation with orthogonal techniques [18,19]. Nowadays, next generation sequencing (NGS) have greatly improved the resolution and accuracy of genome-wide CNVs analysis using different NGS-based tools [17,21,22]. However, the enormous variability in performance of these tools [21,23], as well as the massive amount of data generated constitute a great challenge for result interpretations [24].

Besides the above mentioned techniques, real-time or quantitative polymerase chain reaction (qPCR) is now the state-of-art technology for quantifying targeted genomic regions for both CNVs [25] and gene expression (in this case following a reverse transcription step to convert the mRNA to complementary DNA, cDNA) [25,26]. This is due to the low consumables costs, the high sensitivity and the open format (independent of a single supplier) of the qPCR technique.

With qPCR, the PCR product accumulation is measured in real-time resulting in a sigmoidal amplification curve. Several fluorescent detection chemistries are available to measure PCR product accumulation, including hydrolysis probes, molecular beacons, dual

hybridization probes and double stranded DNA specific binding dyes. In this regard, for the amplification of multiple DNA sequences simultaneously, different dyes or fluorescent probes are required, what increases significantly the costs of the analysis and limits the applicability of the technique for simultaneous amplification of many targets of interest in a single reaction. In addition, the use of some of these dyes such as SYBR Green I exhibit a large number of disadvantages [27] such as extensive optimization requirements, inhibition of PCR in a concentration-dependent manner, effects on DNA melting temperature and preferential binding to certain DNA sequences. This last drawback prevents the analysis of multiple DNA sequences. To overcome this problem, alternative PCR-based approaches with a higher multiplexing capability, such as multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) can be used for targeted screening of CNVs [28–30]. The MLPA technique allows the simultaneous measure of relative CNVs of up to 40 different DNA sequences [28], but due the time-consuming nature of the probe-generation process the vast majority of MLPA applications are restricted to genes for which it is possible to use commercially available kits [29–31].

In this work, we have tried to illustrate the combination of conventional multiplex PCR with an alternative strategy for the simultaneous quantification of the amplified DNA sequences, based on the use of gel electrophoresis (GE) with on-line elemental detection by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The ICP-MS detector has unrivaled advantages in quantification compared to molecular MS detectors, such as Electrospray ionization (ESI)-MS and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)-MS. First, in ICP-MS the ionization is virtually compound independent and second, it is easier to interface with electrophoretic-based separation techniques (capillary electrophoresis or GE). The ICP-MS technique produces the complete atomization and ionization of different DNA sequences (fragments), and the obtained signal is proportional to the number of P-atoms in the sequence and, therefore, to the amount of the corresponding amplified fragment in the original sample. Using different initial DNA amounts a calibration curve can be established and then the amount of amplified fragment measured can be correlated with the initial amount of DNA used for the PCR reaction. The on-line coupling of ICP-MS to separation techniques that permit the isolation of DNA fragments as function of their size, such as column GE, allows the simultaneous identification of the amplified gene fragment size and its quantification, as previously demonstrated in the case of a single gene as proof of concept [32]. The work presented here shows the extension of the referenced work to relevant multiplex PCR amplification of genes used to detect CNVs and gene expression changes by means of ICP-MS detection of the P present in the amplified fragments. The results of multiplex CNVs determination were validated by analyzing genomic DNA from the ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 which possesses substantial copy-number changes. These results were also confirmed by conventional simplex qPCR. In the case of multiplex gene expression analysis the results were compared to those obtained by single reaction reverse transcription (RT)-qPCR.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and cell cultures

The human ovarian carcinoma cell line A2780 was a kind gift from Dr. J.M. Pérez Freije (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Spain). This cell line was authenticated at the Biotechnological and Biomedical Assay Unit from the Scientific and Technical Services (SCTs) of the University of Oviedo using the AmpFLSTR® Identifier® Plus-PCR Amplification Kit (Thermo Scientific, Wilmington, DE). The *in vitro* derived cisplatin-resistant A2780cis cell line was purchased from the European Collection of cell cultures through Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and the human ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, using RPMI 1640 medium (Invitrogen, Fisher Scientific, Madrid, Spain) containing 5 mg L⁻¹ of Plasmocin (InvivoGen, San Diego, USA). The medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) in the case of A2780 and A2780cis cells, and 20% fetal bovine serum and 0.01 mg mL⁻¹ of bovine insulin (Invitrogen) in the case of OVCAR-3 cells. For A2780cis cells, 1 μM cisplatin (Sigma-Aldrich) was added every three passages to maintain resistance.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was extracted and purified from all the cultured cells (from about 3–4 × 10⁶ cells per extraction) using the silica-based column DNA purification kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). The kit was used according to the instructions given by the manufacturer with the inclusion of a RNase A treatment to generate RNA-free genomic DNA. The extracted DNA was eluted using 100 μL of the elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA), and quantified by fluorescence spectroscopy using the Qubit dsDNA HS Assay kit and the Qubit 2.0 fluorometer (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA) at the Biotechnological and Biomedical Assay Unit (SCTs, University of Oviedo).

2.3. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction from cultured cells was carried out with the E. Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek, Norcross, USA), according to the instructions given by the manufacturer. Briefly, 3–4 × 10⁶ cells were lysed with 350 μL of the TRK lysis buffer, then 70% ethanol was added and the mixture was transferred to a HiBind® RNA Mini column. DNA contamination was removed by adding to the column 75 μL of DNase I digestion mixture (DNase I Digestion Set, Omega Bio-tek) and, after cleaning several times, RNA was eluted with 50 μL DEPC water. The extracted RNAs were stored at –80 °C.

All extracted RNA samples were analysed for RNA concentration and RNA Integrity Number (RIN) scores by using the Agilent 2100 Bioanalyzer RNA Nano kit (Agilent Technologies) at the Biotechnological and Biomedical Assay Unit (SCTs, University of Oviedo), obtaining RIN values between 9.50 and 9.70 for all the samples. RNA concentration and purity was also determined by taking triplicate measurements of A260/A280 ratios with the use of a Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Following RNA extraction and quantification, cDNA was synthesized from 5 μg of the total RNA using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the instructions given by the manufacturer. The reactions were performed in 20 μL final volume with 4 μL of 5X buffer,

1 mM of dNTPs, 5 μM of oligo-dT primer, 1 U μL⁻¹ of RNase inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor) and 10 U μL⁻¹ of reverse transcriptase. This reaction mix was incubated at 42 °C for 60 min and at 70 °C for 5 min.

2.4. Multiplex PCR for gene copy number determination

2.4.1. Primers design

Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments of four genes in a single reaction mix. Two genes, *HER2* and *CCNE1*, are sometimes amplified in breast and ovarian cancer, respectively [33–35]; a third gene, *GSTM1*, is lacked in around 50% of Caucasian population [36]; the fourth one, the reference *ACTB* gene, was used as internal endogenous control [37].

Gene sequences were obtained from the *Ensembl Genome Browser* database to prevent primer design over single nucleotide polymorphism (SNPs) positions. Primers were then designed using the online program *Primer 3 Input* (<http://primer3.ut.ee/>) that provides pairs of primers, between 18 and 26 nucleotides long, with good energy levels and GC optimal content. Additionally, primers were selected considering that the size of the amplified fragments should differ in at least 70 bp, to allow a good separation by GE-ICP-MS, and that all of them should present the same annealing temperature. Once designed, primers were checked for possible theoretical cross-interactions and/or heterodimers formation in multiple reactions, with the online program *OligoAnalyzer* from *Integrated DNA Technologies* (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). All primers were checked against the others and only those with free energy higher than –9 kcal mol⁻¹ were accepted. Sequences and sizes of primers and fragments are detailed in [Table 1](#).

2.4.2. Multiplex PCR conditions

After checking the primer pairs in single PCR reactions to determine their performance, multiplex-PCR reactions were performed in 40 μL final volume, studying the effects of several variables like amount of starting DNA, primer concentrations and cycling conditions. The final content of the reaction mixture was: 20 μL 2x MyTaq HS Mix (Bioline, Taunton, Massachusetts, USA), 3.75% dimethyl sulfoxide (DMSO), the desired amount of DNA and optimal concentrations of each gene-specific primers (3,75 nM of each *GSTM-F/GSTM-R* primer, 350 nM of each *CCNE-F/CCNE-R* primer, 175 nM of each *HER-F/HER-R* primer and 375 nM of each *ACTB-F/ACTB-R* primer). The final amplification conditions consisted of an initial step of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of a two-step reaction, 45 s at 95 °C and 2.30 min at 62.5 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C. All the reactions were performed in a Thermal Cycler (Sure Cycler 8800, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Each amplification was repeated at least three times.

With these conditions, several starting genomic DNA amounts from the A2780 cell line, from 0.5 to 40 ng, were used to obtain a calibration curve for each amplified fragment within the multiplex PCR. DNA from OVCAR-3 cells was then used to check the detection of CNVs, under the same conditions.

2.5. Multiplex reverse transcription (RT)-PCR for gene expression analysis

2.5.1. Primers design

Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments of cDNA from four genes in a single reaction mixture. Three genes (*BAX*, *CTR1*, *ERCC1*) are related to cisplatin resistance, and the housekeeping gene *ACTB* was used as non-variable (reference) gene [38]. According to the literature, cisplatin resistance might be, in some cases, related to overexpression of *CTR1* [39] and *ERCC1* [40]

Table 1
Primer pairs used to amplify the targeted genes for CNVs and expression analysis.

Gene CNVs analysis			
Target gene	Primer name	Sequence	Expected product size
ACTB	ACTB-F	5'-TGGTCATCTTCCACCAGG-3'	110
	ACTB-R	5'-AGGAAGGAGGCTGCTTGTC-3'	
HER-2	HER-F	5'-AGAAGGTTCTCTTCCAGG-3'	187
	HER-R	5'-CCTCAAATCCAGCTCTGCAG-3'	
CCNE1	CCNE-F	5'-CCACTGACTATTGAAGAAAGGGT-3'	266
	CCNE-R	5'-ACTCCAAGAATGCAACAGGG-3'	
GSTM1	GSTM-F	5'-GTTGCTGCCCAATTTCC-3'	348
	GSTM-R	5'-TTGTAACACCAGGAAGCGC-3'	
Gene expression analysis			
Target gene	Primer name	Sequence	Expected product size
ACTB	ACB-F	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCT-3'	111
	ACB-R	5'-TACTCTGCTTGTCTGATCCA-3'	
BAX	BAX-F	5'-GAGCTGCAGAGGATGATTGC-3'	182
	BAX-R	5'-GTTCTGATCAGTTCCGGCAC-3'	
CTR1	CTR-F	5'-CAACCACTTCAGCCTCACAC-3'	250
	CTR-R	5'-ACAGGCATGGAATTGTAGCG-3'	
ERCC1	ERC-F	5'-TTGTGATACCCCTCGACGAG-3'	321
	ERC-R	5'-CGGAATTACGTGCGCAAAAT-3'	

and low expression of *BAX* [41]. Primers were designed in such a way that they annealed in different exons to prevent amplification from genomic DNA. For the rest of the design, everything was as indicated above for multiplex PCR for gene copy determination, including the difference in size among the amplified fragments. The primers designed are listed in Table 1.

2.5.2. Multiplex RT-PCR conditions

After checking primer pairs in single PCR reactions, multiple RT-PCR reactions were carried out in 40 μ L final volume, analysing the influence of starting cDNA amounts, primer concentrations and cycling conditions. In the final conditions, the reactions were performed with 4 μ L of PCR buffer (pH = 8.0) 10X, 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl₂ and 2.5 U of BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline). Primer concentrations were 0.2 μ M of each ACB-F/ACB-R primer, 0.2 μ M of each BAX-F/BAX-R primer, 0.25 μ M of each CTR-F/CTR-R primer and 0.125 μ M of each ERC-F/ERC-R primer. As indicated, all the amplification reactions were performed in a Sure Cyclor 8800 (Agilent Technologies) using the following conditions: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 2 min at 72 °C, and finally 10 min at 72 °C. Each amplification was repeated at least three times.

With these conditions, several cDNA starting quantities (equivalent to 0.5–50 ng of mRNA) were used to obtain a calibration curve, necessary to check the linearity of the response (cDNA starting quantity versus product yield), and to choose the best cDNA starting quantity to detect differences between amplified fragments. That amount was then used to perform multiplex RT-PCR with cDNA obtained from A2780 and A2780cis cell lines to study gene expression variations. Three independent experiments were performed, to determine mean fold changes between A2780cis and A2780 cells, after the GE-ICP-MS analysis. Confidence intervals (CI), estimated as ± 1.96 standard errors, were calculated in order to determine if mean fold changes were statistically different from 1.

2.6. Conventional slab GE separation

For checking multiplex PCR reactions, slab gel electrophoresis was carried out in 2% agarose gels (in 0.01 mol L⁻¹ Tris-borate-EDTA, TBE, pH = 8.2) stained with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹), using the size marker 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) and a

voltage of 150 V. Gels were visualized with Gene Flash Syngene Bio Imaging (Syngene).

2.7. GE-ICP-MS analysis of multiplex PCR products

Multiplex PCR products (30 μ L) were purified with the Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, UK) and recovered in a final volume of 30 μ L of water. Aliquots of this solution were analysed using a continuous elution gel electrophoretic system (Mini Prep Cell including a high-voltage power supply PowerPac3000, BioRad Laboratories, Munich, Germany) described in detail elsewhere [42]. Within this work, the outlet of the GE system was connected to a concentric nebulizer with a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. Unless stated otherwise, the parameters of the gel housed in glass tubes (ID: 2.2 mm) were as follows: 2% (w/v) agarose SeaKem® LE (BioRad, Barcelona, Spain) prepared in 50 mmol L⁻¹ ammonium acetate buffer (pH = 8.0), which served also as electrode and elution buffer. The gel length varied between 20 and 30 mm. DNA separations were carried out at voltages between 200 and 250 V. Sample volume injected on the top of the gel was 8 μ L (4 μ L of sample, 2 μ L of 40% sucrose solution and 2 μ L of 5 μ g mL⁻¹ PO₄³⁻). The element-specific detection of ³¹P was performed using a double focusing ICP-MS (DF-ICP-MS) instrument (ELEMENT II, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany), working at medium resolution (Rs = 4000) in order to avoid possible spectral interferences. The operating conditions were as follows: 1350 W RF power, 15.5 L min⁻¹ coolant gas, 0.9 L min⁻¹ auxiliary gas, 0.9 L min⁻¹ nebulizer gas and 100 ms dwell time.

2.8. Single reaction qPCR assays for CNVs analysis

Uniplex qPCR was used to measure the copy number of *HER2*, *CCNE1*, *GSTM1* genes, using again *ACTB* as reference gene, using the Power SYBR Green PCR Master Mix from Applied Biosystems and the primers described in Table 1. The qPCR was carried out in 96 well plates with a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), using 10 μ L of Master Mix, 7 μ L of water, 0.5 μ L of each primer (final concentration 0.25 μ M) and 2 μ L of DNA template (25 ng/ μ L), in 20 μ L final volume reaction. The qPCR program was: 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C.

To assess the amplification efficiency for all the assayed genes, the standard curves were derived using five standard dilutions, in

triplicate, of DNA template (50 ng–5 µg). Good linearity was obtained with correlation coefficients higher than 0.99, and the PCR efficiencies ranged between 0.90 and 1.10. The SDS 2.3 and RQ Manager 1.2 softwares (Applied Biosystems) were used to calculate the quantification cycle (C_q) value, and then the relative copy number of each target gene in the sample (OVCA9 cells) against the calibrator (A2780 cells) was calculated with the $\Delta\Delta C_q$ method [43], using the *ACTB* gene as reference. Three technical replicates were done per experiment, and three independent experiments were carried out for each cell line.

2.9. Single reaction RT-qPCR gene expression assays

Gene expression was analysed by single reaction RT-qPCR with TaqMan[®] hydrolysis probes (Applied Biosystems) for: *CTR1* (Hs00977266_g1), *BAX* (Hs00180269_m1) and *ERCC1* (Hs01012158_m1), using the *ACTB* (Hs01060665_g1) gene as reference gene, as above. The RT-qPCR was carried out in 96 well plates with the same 7900HT Fast Real-Time PCR System as above, using TaqMan Universal Mastermix II with UNG (Applied Biosystems), in 10 µL final volume reactions, with 0.5 µL TaqMan probe and 4 µL of diluted cDNA (1:8) per reaction. The qPCR program was: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C.

Data were analysed with ExpressionSuite Software v1.0.3 (Applied Biosystems), correcting them with respect to the reference gene, to determine $\Delta\Delta C_q$ data, and using the relative quantification (RQ) method, which provides the fold change against the calibrator in each analysis. A2780 cells were always used as calibrator. Three technical replicates were done per experiment, and three independent experiments were carried out and used to estimate mean fold changes.

Confidence intervals (CI), estimated as ± 1.96 standard errors, were calculated in order to determine if mean fold changes were statistically different from 1.

3. Results and discussion

3.1. Determination of gene copy number variations

3.1.1. Optimization of multiplex PCR-GE-ICP-MS

Optimization experiments were carried out to select the most adequate conditions for simultaneous PCR amplification of the selected genes (*HER2*, *CCNE1*, *GSTM1* and *ACTB*, localized in chromosomes 17, 19, 1 and 5, respectively) in genomic DNA from cultured cells. Firstly, special attention was paid in primer design, particularly to primer length, GC content, melting temperature (T_m), possible interactions among the primers used and the formation of primer dimers. Secondly, the effect of key variables affecting the specificity and efficiency of PCR such as primer concentration, number of PCR cycles and cycling temperatures were examined using the designed oligonucleotide primers (Table 1). Best results for amplification of the four selected genes at concentrations from 2 to 50 ng of DNA template were obtained using 35 cycles of PCR and the concentrations of primers given under multiplex PCR conditions (Materials and Methods, section 2.4.2). The reaction was at first carried out using the following three-step PCR protocol: 10 min at 95 °C, 35 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C.

With these multiplex PCR conditions, the determination of the obtained products was approached using the GE-ICP-MS system previously described. First, the most important factors affecting the separation of different DNA fragments, such as gel concentration and gel length, as well as the applied voltage, were studied for a 50 bp DNA ladder ranging from 50 to 500 bp. Results demonstrated

that 2% agarose gel, 200 V as applied voltage and gel dimensions of 26 × 2.2 mm were the best conditions for the optimal separation of the DNA fragments up to 500 bp within 25 min, as presented in Fig. 1A. Under these conditions, the chromatographic resolution between two adjacent peaks of DNA fragments, differing by 50 bp, ranged from 0.95 to 1.2. The peaks of the different DNA fragments were also well separated from the peak of the inorganic phosphate (PO₄³⁻) (the first peak in the electropherogram of Fig. 1A), that was added to the DNA ladder as an internal standard (IS) for correcting possible variations on the migration times and peak areas. The migration time of the different DNA fragments can be correlated with the number of base pairs using a lineal relationship, as shown in the Fig. 1B, obtaining an adequate correlation coefficient (R² = 0.998).

The above implemented conditions were used for the separation of the four amplicons obtained after multiplex PCR corresponding to: *ACTB* (110 bp), *HER2* (187 bp), *CCNE1* (266 bp) and *GSTM1* (348 bp). An example of the electropherogram obtained is shown in Fig. 2A (in the inset it is possible to observe the separation obtained in a conventional slab gel). As can be seen, four distinct peaks corresponding to the expected amplicons were obtained and they were baseline separated. These peaks were also well separated from the peak of the inorganic phosphate (PO₄³⁻) (see Fig. 2A) added as internal standard (IS). Using the calibration curve for fragment sizing (see Fig. 1B), it was possible to determine amplicon lengths of around 108 ± 19 bp, 197 ± 11 bp, 290 ± 14 bp and 380 ± 16 bp (mean ± standard deviation, n = 6), which are in accordance with the expected sizes.

In this vein, the reproducibility of migration times under defined

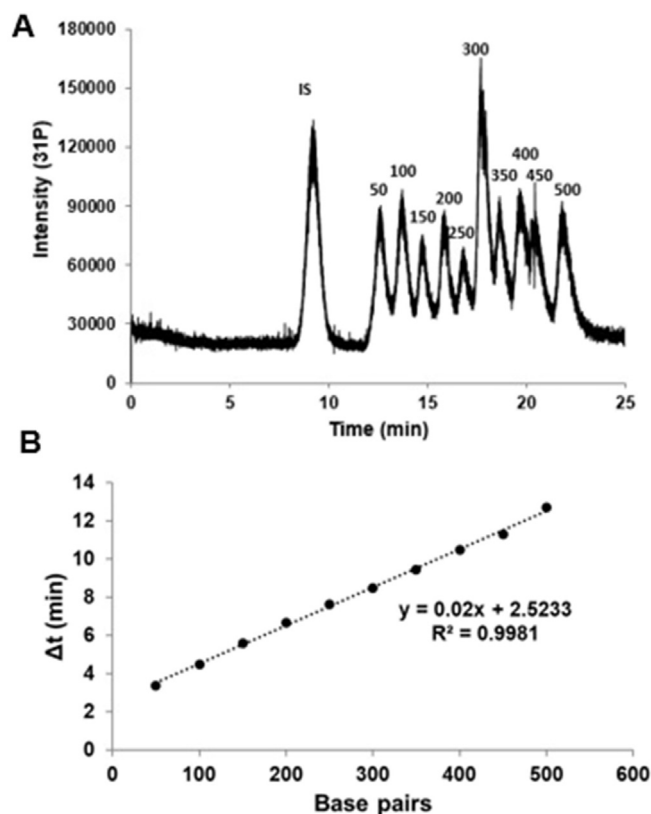


Fig. 1. Implementation of DNA fragment separation. (A) Separation of a 50bp DNA marker using optimized condition for on-column GE with ICP-MS detection of ³¹P. (B) Calibration graph, obtained with these conditions, relating migration times with fragment size of DNA marker.

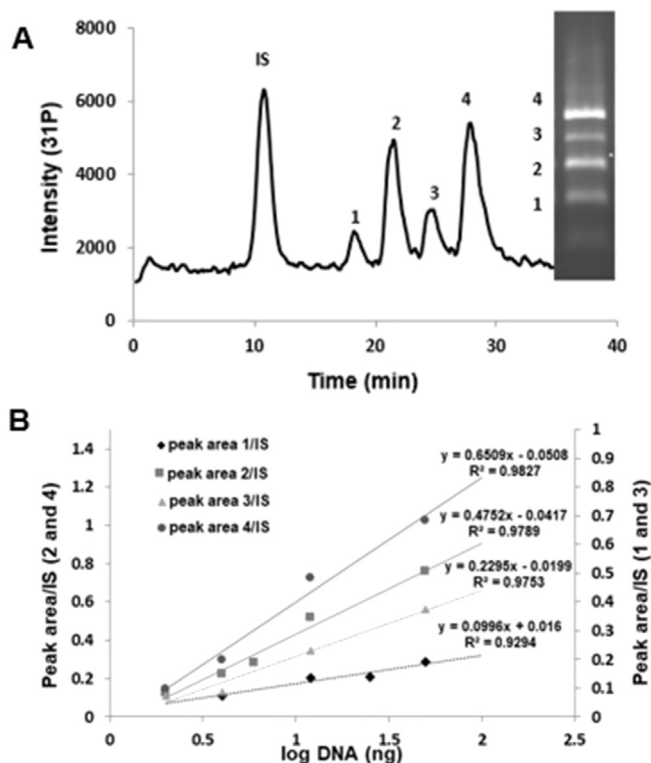


Fig. 2. (A) Electropherogram obtained by GE-ICP-MS for the separation of the multiplex PCR products (three-steps reaction) corresponding to: 1, *ACTB*; 2, *HER2*; 3, *CCNE1* and 4, *GSTM1*. Inset shows the slab-gel separation. (B) Variation of the amplicon/phosphate (IS) peak areas ratio with initial DNA amounts for all the amplified genes.

GE-ICP-MS conditions is an indicator of the suitability of this technique for identifying a particular multiplex PCR product on the basis of its size, as well as a measure of how well the multiplex PCR generated the expected products. Since the migration time of the different fragments was corrected with the migration time of the IS (PO_4^{3-}), the intra-day reproducibility (expressed as relative standard deviation, RSD) of the corrected migration times was found to be less than 4% ($n=6$) for all the amplicons, which gives a very good reproducibility of product size estimation (lower than 17%).

To evaluate the suitability of the developed multiplex PCR-GE-ICP-MS strategy for quantitative analysis, the reproducibility of peak area was also determined using PO_4^{3-} as IS. The results obtained for the intra-day RSD of the ratio between the amplicon peak area and the IS peak area was between 1% and 6%.

3.1.2. Calibration and determination of copy number variations

The electropherogram of Fig. 2A reveals that the signal intensity of the four separated amplicons in the ICP-MS is different for each of them, but comparable to the differences observed in the slab gel (see the inset of Fig. 2A). Thus, these differences might probably be ascribed not only to the different size of the PCR products (the ICP-MS signal intensity is proportional to the amount of P in the amplicon), but also to the different amplification efficiency obtained in the multiplex PCR for each of the amplified fragments. Taking into account that one of the parameters affecting the PCR efficiency is the DNA template initial amount, its effect on the peak area of the fragments, as previously established for the amplification of a single fragment [32], was checked with amounts of template DNA from 2 to 50 ng. The obtained results are plotted in Fig. 2B, where the represented signal corresponds to the amplicon peak area divided by the peak area of the IS (PO_4^{3-}).

According to these results, linear correlations ($R^2 > 0.93$) were observed between the peak area ratios and the DNA template amounts for all the amplified genes: *ACTB*, *HER2*, *CCNE1* and *GSTM1*. When comparing among sequences, the highest amplification rates, taking into account the size (amount of P) of the amplicon, were observed for *HER2* (187 bp) followed by *GSTM1* (348 bp) and *CCNE1* (266 bp). While the amplification efficiency was very low for *ACTB* (slope of the fitting curve 0.10).

Traditionally the PCR is conducted using three steps per cycle (a denaturation step, an annealing step and an extension step, each at a different temperature), but the annealing step and extension step can be combined into one step (two-step PCR protocol) [44]. The two-step protocol is used, primarily, for reducing the time of the PCR, although it may also improve the amplification yield [44]. In this regard, further experiments were conducted in order to achieve better sensitivity for all the PCR products by using a multiplex PCR with two steps per cycle instead of three. Fig. 3A shows the electropherogram obtained for the separation of the PCR products obtained using 5 ng of DNA template and the optimized two-steps PCR protocol (5 min at 95 °C, 35 cycles of 45 s at 95 °C and 2.3 min at 62.5 °C, and 10 min at 72 °C). Under these conditions, it was possible to increase the amplification efficiency for all the genes under study, which allowed to obtain limits of detection (calculated as the amount of DNA template required to give a signal of 3 times the background noise of the electropherogram) between 0.2 ng for *CCNE1* (about 50 cells) and 0.5 ng for *GSTM1* and *HER2* (about 100 cells), demonstrating the applicability of the developed technique to address changes in small DNA amounts. Below this input,

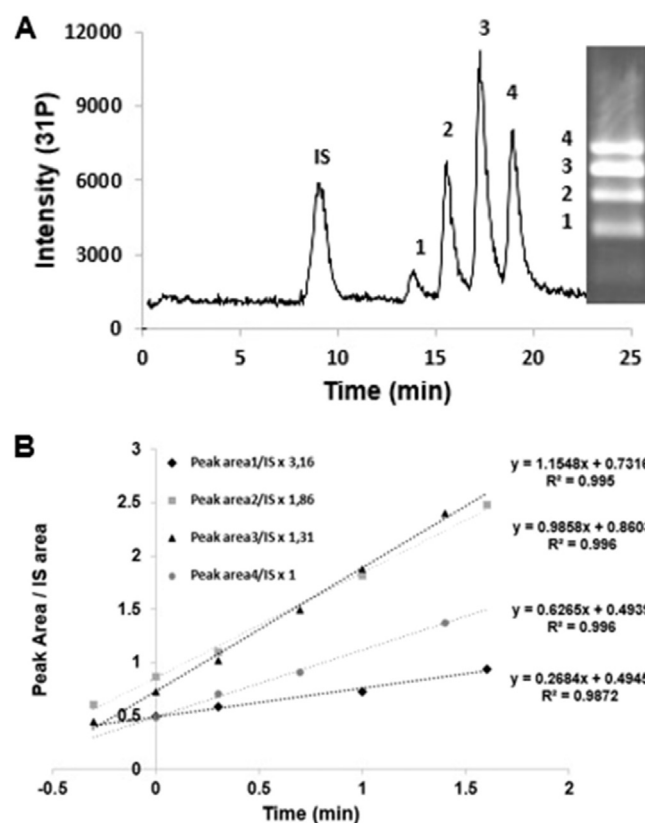


Fig. 3. (A) Electropherogram obtained by GE-ICP-MS for the separation of the four amplicons obtained after multiplex PCR (two-steps reaction) corresponding to: 1, *ACTB*; 2, *HER2*; 3, *CCNE1* and 4, *GSTM1*. Inset shows the slab-gel separation. (B) Size corrected calibration graphs for each amplified gene relating amplicon/phosphate (IS) peak areas ratio with initial DNA amounts.

the signal generated was not detectable by the GE-ICP-MS instrument.

In all cases, very good linear correlations ($R^2 > 0.99$) were observed between the peak area ratios (corrected by the size of the amplicon) and the DNA template amounts for all the analysed amplicons, as observed in Fig. 3B. As can be seen, after size correction *ACTB* exhibits a similar behaviour as before, showing very low amplification efficiency at any of the assayed template levels; whereas the amplification of *HER2* and *CCNE1* was similar (regression slopes of the calibration graphs 1.15 ± 0.04 and 0.99 ± 0.03 , respectively). The amplification efficiency of *GSTM1* was around half of the amplification efficiency of *HER2* and *CCNE1* (regression slope of the calibration graph 0.63 ± 0.02).

The validity of the multiplex PCR-GE-ICP-MS method to determine CNVs was tested using the ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 which possesses substantial copy number changes [45,46]. Thus, the DNA extracted from OVCAR-3 and A2780 cells was used for multiplex-PCR amplification and GE-ICP-MS analysis of the four genes under study using the same amount of DNA template (5 ng) and the described experimental conditions. Fig. 4A shows that the OVCAR-3 cell line exhibits a strong increase of the *CCNE1* peak intensity compared to the other genes and also compared to this gene in the A2780 cell line (Fig. 4B). Quantitatively, the absolute number of copies of the genes under study in samples, OVCAR-3 and A2780, could be determined using the proposed methodology and the calibration lines of Fig. 3B. The obtained results revealed an increase in the number of copies of 2.64 ± 0.41 (mean \pm SD, $n = 3$) in the OVCAR-3 cells, with respect to the A2780 cells, only for the

CCNE1 gen. These are the expected results since the *CCNE1* gene is documented to be present in around six copies in the genome of OVCAR-3 cells [45], in comparison with the two copies detected in other ovarian cancer cells, such as A2780 cells, which lack *CCNE1* amplification [45]. Thus, these results proved the usefulness of the developed methodology.

Moreover, since the amplifications of *HER2* and *CCNE1* were similar (when data were corrected considering fragment size), these genes can be used as control of each other to determine copy number variation without the need of a calibration curve. So, when amplification of *CCNE1* was compared to that of *HER2* in OVCAR-3 cells, the ratio between peak areas was 2.63 ± 0.24 (mean \pm SD, $n = 3$), very close to the value obtained using the calibration graph, as expected, because *HER2* is not amplified in OVCAR-3 cells [47]. In this way, the value and usefulness of this methodology considerably improves, because then calibration curves are not needed.

In addition, the peak area ratio between *GSTM1* and *CCNE1* and between *GSTM1* and *HER2* in A2780 cells were 0.57 ± 0.07 (mean \pm SD, $n = 3$) and 0.58 ± 0.09 (mean \pm SD, $n = 3$), respectively, and that between *GSTM1* and *HER2*, in OVCAR-3 cells, was 0.57 ± 0.05 (mean \pm SD, $n = 3$). These results suggest that the analysed cells are heterozygous for the null *GSTM1* allele, that is, that there is only one gene copy per cell. Around 50% of Caucasians are homozygous for this null allele [36,48]. This means that around 40% of Caucasians would be heterozygous for this allele, and could therefore present some deficiency in the response to genotoxic agents [36]. However, this possible deficiency has not been studied because it is almost impossible to distinguish between individuals with one or two copies of the active alleles. The methodology developed in this work however, could clearly identify heterozygous individuals, and would allow the analysis of the influence of *GSTM1* gene copy number in the response to genotoxic exposure, such as those in cancer chemotherapy treatments [49].

To further evaluate the accuracy of CNVs analysis by the developed multiplex PCR-GE-ICP-MS method, we have also compared its performance with that of conventional uniplex qPCR. To do that, single reaction qPCR assays were performed for each gene under study with genomic DNA (50 ng) from OVCAR-3 cells and A2780 cells. The obtained results, using the relative quantification method described in Material and Methods (section 2.8), showed an increase in *CCNE1* copy number of 2.88 ± 0.75 (mean \pm SD, $n = 3$) in OVCAR-3 cells compared to A2780 cells. This result was not significantly different from that obtained with the multiplex PCR-GE-ICP-MS method (2.64 ± 0.41), ($p = 0.65$, with a two tail Student *t*-test), what demonstrates the good performance in copy number measurement of the developed multiplex methodology.

3.2. GE-ICP-MS for multiplex gene expression analysis

Gene expression was evaluated in the A2780 and A2780cis cell lines (sensitive and resistant to cisplatin, respectively), amplifying one cDNA fragment for each one of the three genes related to cisplatin resistance: *BAX* (182 bp), *CTR1* (250 bp) and *ERCC1* (321 bp), using *ACTB* (111 bp) as a reference gene. The optimization of the RNA extraction conditions, cDNA synthesis and multiplex RT-PCR of these four genes was conducted and the final conditions are summarized in the Materials and Methods (section 2.5.2.). Using the same GE-ICP-MS experimental conditions to that described for CNVs analysis, the products of the RT-multiplex PCR reaction were separated. A typical electropherogram obtained, corresponding to cDNA equivalent to 18.8 ng of RNA, is shown in Fig. 5 (the inset shows the separation in the slab gel), where the multiplex RT-PCR products from the four selected genes can be baseline resolved in 20 min.

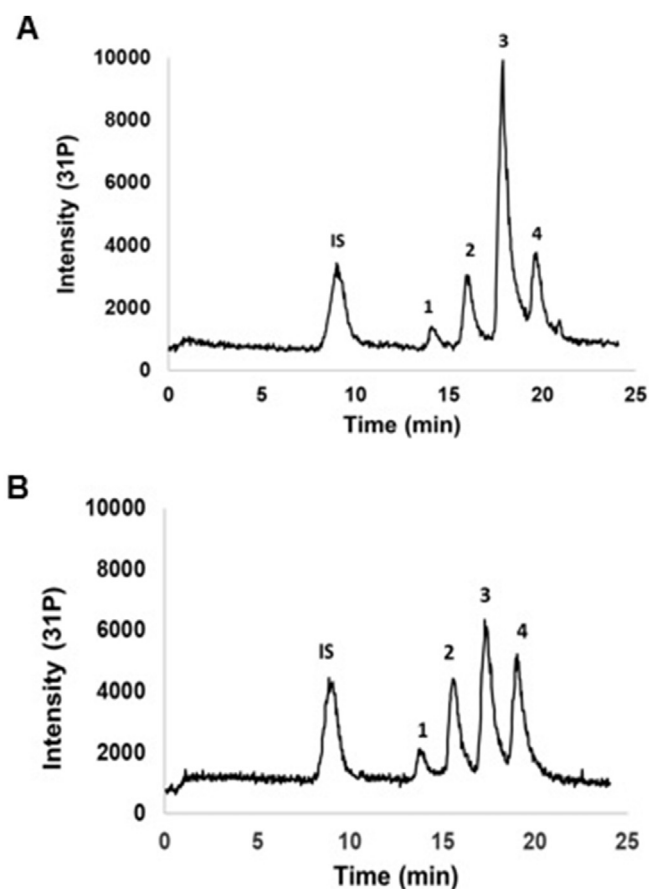


Fig. 4. Electropherograms obtained by GE-ICP-MS for the multiplex PCR products obtained with 5 ng DNA template from: (A) OVCAR-3 cells. (B) A2780 cells.

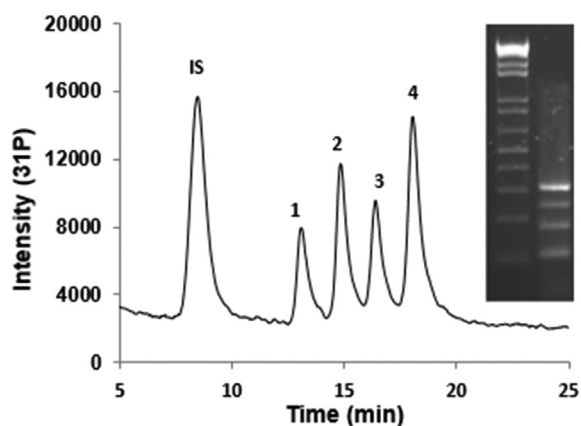


Fig. 5. Electropherogram obtained by GE-ICP-MS for the separation of the multiplex RT-PCR products corresponding to: 1, *ACTB*; 2, *BAX*; 3, *CTR1* and 4, *ERCC1*. The slab gel separation of the measured sample is also present in the image.

The multiplex analysis of gene expression was performed referring the peak area of the different amplified fragments to the peak area of the reference gene (*ACTB*). In addition, gene expression differences (fold changes) between cisplatin resistant and sensitive cell lines were estimated as the ratio between gene expression in A2780cis (resistant) and A2780 (sensitive) cells. The obtained results are plotted in Fig. 6A where clear and statistically significant differences between the two cell lines can be observed for *BAX* and *ERCC1* genes. *BAX* was more expressed in the resistant than in the sensitive cells (fold change 2.03 ± 0.23 ; CI 1.57–2.49), contrary to what was described with other cisplatin resistant cells [41], whereas *ERCC1* was less expressed in the resistant cells (fold change 0.57 ± 0.10 ; CI 0.39–0.80), again opposed to data obtained in other resistant cells [40]. However, contrary to what is described in those other cisplatin resistant cells, the resistance of A2780cis cells is mainly due to a very low intake of the drug [50], which can explain the differences in expression found in both genes between the different cell lines. Finally, there are no differences between resistant and sensitive cells for the expression of *CTR1* (fold change 1.06 ± 0.45 ; CI 0.04–2.08), although lower expression in the resistant cells was described before [39].

To check if these differences with published results were dependent on the analysed cell lines, the expression of the genes under study in both cell lines was analysed by using single reaction RT- TaqMan qPCR assays. The obtained results, presented in Fig. 6B, show that *BAX* is more expressed in the resistant cells (3.27 ± 0.36 (mean \pm SE, $n = 3$); CI 2.56–3.98), *ERCC1* is less expressed in the resistant cells (0.18 ± 0.04 (mean \pm SE, $n = 3$); CI 0.11–0.26), and that there are not differences for *CTR1* expression (1.10 ± 0.3 (mean \pm SE, $n = 3$); CI 0.50–1.71).

According to these results, both methodologies provided the same information about the relative expression of the analysed genes in A2780cis, compared to A2780 cells: *BAX* is over-expressed in A2780cis cells, *ERCC1* is over-expressed in A2780 cells, and *CTR1* is equally expressed in both cell types. Therefore, in spite of these differences with published data, the newly developed methodology could be as accurate to study gene expression as monoplex RT-qPCR, with TaqMan hydrolysis probes. However, well-designed probes are expensive and the data analysis require specific data collection and processing strategies, some of which considerably differ in their performance [51]. In contrast, the newly developed methodology does not need the use of any fluorescent probe, allows easy multiplex analysis and the analysis of results is very straightforward.

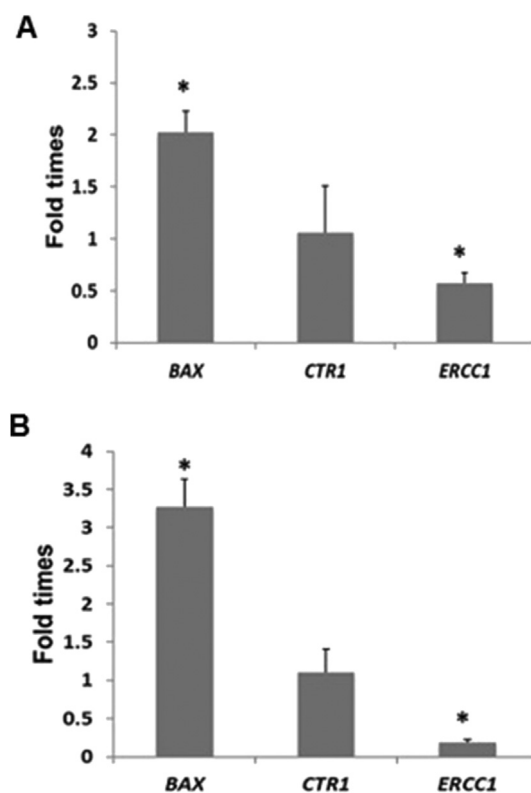


Fig. 6. *BAX*, *CTR1* and *ERCC1* gene expression in A2780cis cells, compared to A2780 cells, in fold changes. (A) Results obtained with the implemented multiplex RT-PCR-GE-ICP-MS methodology. (B) Results obtained with single reaction RT-qPCR assays.

4. Conclusions

Gel electrophoresis coupled to ICP-MS as P-selective detector has been used in this work, allowing the separation of double-stranded DNA fragments based on size. Retention in the agarose gel can be directly correlated with fragment size and baseline resolution can be achieved for fragments on the range of 50–500 bp. This technique, therefore, leads to DNA fragments separation, identification without the need of melting curves and quantification in the absence of any labeling procedure. The high sensitivity of the coupled GE-ICP-MS technique is directly dependent upon the number of P-atoms present in the separated DNA fragments and, therefore, this set up is particularly useful for applications in which the quantity of DNA is limited. Furthermore, reproducibility is a key aspect of this type of set-up and they have been proved to be adequate (%RSD on the migration time and on the peak areas are below 4% and 6%, respectively).

The sensitivity of the coupling of GE-ICP-MS can be dramatically improved by conducting PCR amplification of the sought fragment and this has been implemented in the case of multiplex amplification of different fragments, both for CNVs determination and gene expression analysis.

The obtained results showed that the developed multiplex methodology is rather accurate and as good as single reaction qPCR and RT-qPCR, for CNVs and gene expression analyses, respectively, but with the advantages of multiplexing capacity, easy detection without the need of any fluorescent probe, and straightforward data analysis.

Summarizing, we have developed a methodology that has proved its validity and usefulness in multiplex CNVs determination,

and that might also be very useful in the analysis of multiplex gene expression.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by the Gobierno del Principado de Asturias (Oviedo, Spain) through Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación (PCTI) co-financed by FEDER funds (Ref. FC-15-GRUPIN-14-010) and by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) of Spain under the Project CTQ2016-80060-C2-1R.

References

- [1] L. Feuk, A.R. Carson, S.W. Scherer, Structural variation in the human genome, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 85–97, <https://doi.org/10.1038/nrg1767>.
- [2] S.H. Almal, H. Padh, Implications of gene copy-number variation in health and diseases, *J. Hum. Genet.* 57 (2012) 6–13, <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.108>.
- [3] J.S. Beckmann, X. Estivill, S.E. Antonarakis, Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 639–646, <https://doi.org/10.1038/nrg2149>.
- [4] M. Fanciulli, E. Petretto, T. Aitman, Gene copy number variation and common human disease, *Clin. Genet.* 77 (2010) 201–213, <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01342.x>.
- [5] S.A. McCarroll, Extending genome-wide association studies to copy-number variation, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) R135–R142, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn282>.
- [6] T. Furuya, Y. Suehiro, Y. Namiki, K. Sasaki, CNVs associated with susceptibility to cancers: a mini-review, *J. Canc. Ther.* 6 (2015) 413–422, <https://doi.org/10.4236/jct.2015.65044>.
- [7] T.-M. Kim, R. Xi, L.J. Luquette, R.W. Park, M.D. Johnson, P.J. Park, Functional genomic analysis of chromosomal aberrations in a compendium of 8000 cancer genomes, *Genome Res.* 23 (2013) 217–227, <https://doi.org/10.1101/gr.140301.112>.
- [8] F. Chibon, Cancer gene expression signatures – the rise and fall? *Eur. J. Canc.* 49 (2013) 2000–2009, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.02.021>.
- [9] G. Arpino, D. Generali, A. Sapino, L. Del Matro, A. Frassoldati, M. de Laurentis, Luigi Dogliotti, Gene expression profiling in breast cancer: a clinical perspective, *Breast* 22 (2013) 109–120, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.01.016>.
- [10] E.T. Dermatakis, From gene expression to disease risk, *Nat. Genet.* 40 (2008) 492–493, <https://doi.org/10.1038/ng0508-492>.
- [11] D. Murray, P. Doran, P. MacMathuna, A.C. Moss, In silico gene expression analysis? an overview, *Mol. Canc.* 6 (2007) 50, <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-50>.
- [12] J.J. Michaelson, S. Loguercio, A. Beyer, Detection and interpretation of expression quantitative trait loci (eQTL), *Methods* 48 (2009) 265–276, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.004>.
- [13] S. Ceulemans, K. van der Ven, J. Del-Favero, Targeted screening and validation of copy number variations, in: *Methods Mol. Biol.*, 2012, pp. 311–328, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-507-7_15.
- [14] D. Dhawan, H. Padh, Pharmacogenetics: technologies to detect copy number variations, *Curr. Opin. Mol. Therapeut.* 11 (2009) 670–680, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20072944>. (Accessed 27 June 2017).
- [15] N.P. Carter, Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays, *Nat. Genet.* 39 (2007) S16–S21, <https://doi.org/10.1038/ng2028>.
- [16] J.H. Lee, J.T. Jeon, Methods to detect and analyze copy number variations at the genome-wide and locus-specific levels, *Cytogenet. Genome Res.* 123 (2009) 333–342, <https://doi.org/10.1159/000184725>.
- [17] C. Alkan, B.P. Coe, E.E. Eichler, Genome structural variation discovery and genotyping, *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 363–376, <https://doi.org/10.1038/nrg2958>.
- [18] R.R. Haraksingh, A. Abyzov, A.E. Urban, Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans, *BMC Genom.* 18 (2017) 321, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3658-x>.
- [19] D. Pinto, K. Darvishi, X. Shi, D. Rajan, D. Rigler, T. Fitzgerald, L. Feuk, Comprehensive assessment of array-based platforms and calling algorithms for detection of copy number variants, *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 512–520, <https://doi.org/10.1038/nbt.1852>.
- [20] D.F. Conrad, D. Pinto, R. Redon, L. Feuk, O. Gokcumen, Y. Zhang, M.E. Hurler, Origins and functional impact of copy number variation in the human genome, *Nature* 464 (2010) 704–712, <https://doi.org/10.1038/nature08516>.
- [21] M. Piroznia, F.S. Goes, P.P. Zandi, Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches, *Front. Genet.* 6 (2015) 138, <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00138>.
- [22] F. Zare, M. Dow, N. Montealeone, A. Hosny, S. Nabavi, An evaluation of copy number variation detection tools for cancer using whole exome sequencing data, *BMC Bioinf.* 18 (2017) 286, <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1705-x>.
- [23] A. Valsesia, A. Macé, S. Jacquemont, J.S. Beckmann, Z. Kutalik, The growing importance of CNVs: new insights for detection and clinical interpretation, *Front. Genet.* 4 (2013) 92, <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00092>.
- [24] H.J. Abel, E.J. Duncavage, Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches, *Cancer Genet.* 206 (2013) 432–440, <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.11.002>.
- [25] B. D'haene, J. Vandesompele, J. Hellemans, Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR, *Methods* 50 (2010) 262–270, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>.
- [26] J. Huggett, K. Dheda, S. Bustin, A. Zumla, Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations, *Gene Immun.* 6 (2005) 279–284, <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>.
- [27] H. Gudnason, M. Dufva, D.D. Bang, A. Wolff, Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007), <https://doi.org/10.1093/nar/gkm671> e127.
- [28] J.P. Schouten, C.J. McElgunn, R. Waaijer, D. Zwiijnenburg, F. Diepvens, G. Pals, Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e57, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060695>. (Accessed 8 March 2018).
- [29] C. Hömig-Hölzel, S. Savola, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics, *Diagn. Mol. Pathol.* 21 (2012) 189–206, <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3182595516>.
- [30] G.W. Shin, S.-H. Jung, S.-H. Yim, B. Chung, G. Yeol Jung, Y.-J. Chung, Stuffer-free multiplex ligation-dependent probe amplification based on conformation-sensitive capillary electrophoresis: a novel technology for robust multiplex determination of copy number variation, *Electrophoresis* 33 (2012) 3052–3061, <https://doi.org/10.1002/elps.201200334>.
- [31] M. Marcinkowska, K.-K. Wong, D.J. Kwiatkowski, P. Kozłowski, Design and generation of MLPA probe sets for combined copy number and small-mutation analysis of human genes: EGFR as an example, *Sci. World J.* 10 (2010) 2003–2018, <https://doi.org/10.1155/2010.195>.
- [32] T. Iglesias González, M. Espina, L.M. Sierra, J. Bettmer, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Enhanced detection of DNA sequences using end-point PCR amplification and online gel electrophoresis (GE)-ICP-MS: determination of gene copy number variations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11028–11032, <https://doi.org/10.1021/ac502671f>.
- [33] H.-C. Lien, Y.-L. Chen, Y.-L. Juang, Y.-M. Jeng, Frequent alterations of HER2 through mutation, amplification, or overexpression in pleomorphic lobular carcinoma of the breast, *Breast Canc. Res. Treat.* 150 (2015) 447–455, <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3336-0>.
- [34] Z. Ping, Y. Xia, T. Shen, V. Parekh, G.P. Siegal, I.-E. Eltoum, J. He, D. Chen, M. Deng, R. Xi, D. Shen, A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27545, <https://doi.org/10.1038/srep27545>.
- [35] D. Bell, A. Berchuck, M. Birrer, J. Chien, D.W. Cramer, F. Dao, E. Thomson, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma, *Nature* 474 (2011) 609–615, <https://doi.org/10.1038/nature10166>.
- [36] H. Norppa, Genetic polymorphisms and chromosome damage, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204 (2001) 31–38, <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00069>.
- [37] Q. Yang, H.A.A. Ali, S. Yu, L. Zhang, X. Li, Z. Du, G. ZHANG, Evaluation and validation of the suitable control genes for quantitative PCR studies in plasma DNA for non-invasive prenatal diagnosis, *Int. J. Mol. Med.* 34 (2014) 1681–1687, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1944>.
- [38] H. Ali, Z. Du, X. Li, Q. Yang, Y.C. Zhang, M. Wu, Y. Li, G. Zhang, Identification of suitable reference genes for gene expression studies using quantitative polymerase chain reaction in lung cancer in vitro, *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 3767–3773, <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3159>.
- [39] J. Zisowsky, S. Koegel, S. Leyers, K. Devarakonda, M.U. Kassack, M. Osmak, U. Jaehde, Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 298–307, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.10.003>.
- [40] K. V. Ferry, T.C. Hamilton, S.W. Johnson, Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1305–1313, [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00441-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00441-X).
- [41] N. Tajeddine, L. Galluzzi, O. Kepp, E. Hangen, E. Morselli, L. Senovilla, G. Kroemer, Hierarchical involvement of Bak, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced cell death, *Oncogene* 2763 (2008) 4221–4232, <https://doi.org/10.1038/ncr.2008.63>.
- [42] W. Brüchert, J. Bettmer, On-line Coupling of Gel Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma-sector Field-mass Spectrometry for the Determination of DsDNA Fragments, 2005, <https://doi.org/10.1021/AC050425>.
- [43] X.P. Yue, T.C. Chang, J.M. DeJarnette, C.E. Marshall, C.Z. Lei, W.S. Liu, Copy number variation of PRAMEY across breeds and its association with male fertility in Holstein sires, *J. Dairy Sci.* 96 (2013) 8024–8034, <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7037>.
- [44] H.X. Jin, S.B. Seo, H.Y. Lee, S. Cho, J. Ge, J. King, B. Budowle, S.D. Lee, Differences of PCR efficiency between two-step PCR and standard three-step PCR protocols in short tandem repeat amplification, *Aust. J. Forensic Sci.* 46 (2014) 80–90, <https://doi.org/10.1080/00450618.2013.788681>.
- [45] S. Varma, Y. Pommier, M. Sunshine, J.N. Weinstein, W.C. Reinhold, High

- resolution copy number variation data in the NCI-60 cancer cell lines from whole genome microarrays accessible through CellMiner, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092047> e92047.
- [46] D. Etemadmoghadam, B.A. Weir, G. Au-Yeung, K. Alsop, G. Mitchell, David D.L. Bowtell, Synthetic lethality between CCNE1 amplification and loss of BRCA1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110 (2013) 19489–19494, <https://doi.org/10.1073/pnas.1314302110>.
- [47] J. Jones, L.D. Lagasse, B.Y. Karlan, Steroid hormonal independence of HER-2/neu mRNA expression in four human ovarian carcinoma cell lines, *Gynecol. Oncol.* 55 (1994) 421–426, <https://doi.org/10.1006/gyno.1994.1316>.
- [48] K. Mitrunen, N. Jourenkova, V. Kataja, M. Eskelinen, V.M. Kosma, S. Benhamou, H. Vainio, M. Uusitupa, A. Hirvonen, Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10 (2001) 229–236. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11303592>. (Accessed 9 March 2018).
- [49] E. Reszka, W. Wasowicz, J. Gromadzinska, Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility, *Br. J. Nutr.* 96 (2006) 609–619, <https://doi.org/10.1079/BJN20061878>.
- [50] M. Espina, M. Corte-Rodríguez, L. Aguado, M. Montes-Bayón, M.I. Sierra, P. Martínez-Cambor, E. Blanco-González, L.M. Sierra, Cisplatin resistance in cell models: evaluation of metallomic and biological predictive biomarkers to address early therapy failure, *Metall* 9 (2017) 564–574, <https://doi.org/10.1039/C7MT00014F>.
- [51] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.



Sensitive determination of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) by immuno-polymerase chain reaction with inductively coupled plasma-mass spectrometry detection

A. Fernández Asensio^{a, b}, L.M. Sierra^a, M. Montes-Bayón^{b, *}, E. Blanco-González^{b, **}

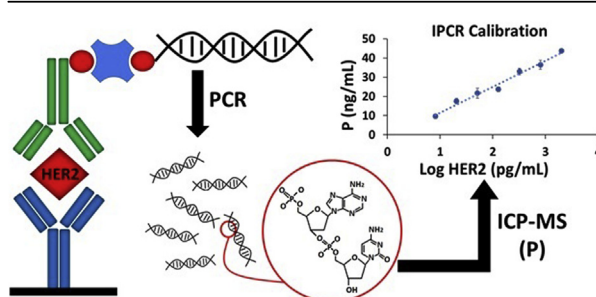
^a Department of Functional Biology (Genetic Area), Oncology University Institute (IUOPA) and Institute of Sanitary Research of Asturias (ISPA), University of Oviedo, Spain

^b Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, and Institute of Sanitary Research of Asturias (ISPA), University of Oviedo, C/ Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

HIGHLIGHTS

- Immuno PCR is explored for the sensitive analysis of HER2 in biological samples.
- Elemental detection of phosphorous by ICP-MS after PCR permits the quantification of the amplicon.
- The combination of immune PCR-ICP-MS permits sensitivity in the low picograms per milliliter.
- The hybrid strategy represents an extraordinary improvement in biomarker analysis.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 May 2019

Received in revised form

26 July 2019

Accepted 16 September 2019

Available online 19 September 2019

Keywords:

Immuno-PCR

ELISA

HER2 ECD

Cancer biomarker

ICP-MS

ABSTRACT

Sensitive and selective analytical methods are necessary for the determination of clinical biomarkers of breast cancer. The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is an important breast cancer biomarker since tumors with HER2 protein overexpression (HER2-positive tumors) turn out to be more aggressive and likely to recur. Therefore, accurate determination of serum HER2 values is critical to optimize clinical outcomes in patients with breast cancer. To gain sensitivity and selectivity in the determination of HER2, a sandwich immune assay (highly selective) has been implemented using a detection antibody labelled with a DNA marker. Further amplification of the label using the polymerase chain reaction (PCR), followed by phosphorous quantification of the PCR product (amplicon) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), completes this novel assay. Considering that the concentration of the amplicon is proportional to the amount of antigen (HER2) that is recognized by the labelled detection antibody, the concentration of HER2 can be directly obtained by P-analysis. For this aim, a DNA marker of 123 base pairs has been connected to the detection antibody of a sandwich immune assay conducted in pre-coated plates containing the capture antibody of HER2. After the recognition occurred, the PCR amplification was conducted and the PCR product analysed by ICP-MS. Detection limits of 2.5 pg mL^{-1} of HER2 could be achieved using 35 PCR cycles (7-fold lower than the commercial ELISA method). The developed methodology has been applied to the determination of HER2

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: montesmaria@uniovi.es (M. Montes-Bayón), eblancog@uniovi.es (E. Blanco-González).

in biological samples (human serum and cell culture supernatant of breast cancer cells, MDA-MB-231) obtaining mean method recoveries of about 87% and 81%, respectively.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The development of analytical strategies that allow the accurate and sensitive quantification of specific tumor biomarkers, which may occur in very low concentrations within complex biological matrices, has become very significant [1]. This is particularly important when such biomarkers will have an impact in the management and treatment of the disease [2]. In this regard, HER2 (also known as HER2/neu, neu and ErbB-2) is a 185 kDa transmembrane glycoprotein encoded by the *HER2* proto-oncogene. Gene amplification and/or overexpression of the protein occurs in 15%–30% of metastatic breast cancers and it is associated with poor prognosis of the disease [3]. HER2 is composed of a functional intracellular tyrosine kinase domain, a short transmembrane portion and an extracellular domain (ECD) that can be cleaved by proteolysis and get released into the serum where is usually detected [4]. Elevated serum levels of the HER2 ECD (above the health-related reference range of 2–15 ng mL⁻¹) [5] are highly correlated with HER2 overexpression and/or gene amplification in tumor tissue [6]. Thus, information on the HER2 ECD concentration in serum and tissues can serve as biomarker of tumor aggressiveness, and as a predictive biomarker when assessing HER2 targeted therapy [7].

For the analysis of HER2, several strategies have been proposed. Among them, immunohistochemistry (IHC) or fluorescence in situ hybridization (FISH) are the most widely applied methods [8]. IHC assesses the expression of the HER2 protein in breast cancer tissues and FISH assesses HER2 gene amplification. However, differences in HER2 testing methods, interpretation, and reporting criteria have been observed, which can create uncertainty for oncologists when determining patient eligibility for treatment [9]. The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods is also suggested for the quantification of HER2 in serum and other biological fluids [10] but it fails when a low concentration of the target protein is present [10]. One alternative way to enhance the analytical response of a bioassay is to introduce reporting molecules, generally attached to the detection antibodies (or aptamers), that can be determined with high sensitivity [11]. Some examples include the use of metallic nanoparticles, which contains a large number of metal ions that can be further measured by elemental mass spectrometry [12,13]. This type of strategy permits to increase the bioassays sensitivity due to the amplification of the signal provided by the incorporation of nanoparticles at the point of the recognition.

Other methods explore the possibility of signal amplification downstream from the recognition step. In this regard, the labelling of antibodies with DNA sequences that can be amplified, afterwards, by the polymerase chain reaction (PCR) has yielded in the so-called immuno-polymerase chain reaction (IPCR) [14,15]. This strategy combines the molecular specificity of immune assays (e.g. in a sandwich format) with the exponential amplification power of PCR by using an antibody labelled with a DNA fragment instead of the antibody–enzyme conjugate used in ELISA. The DNA fragment functions as the reporter molecule to be amplified by PCR. The subsequent quantification of the PCR products typically leads to a several-fold increase in sensitivity in comparison to analogous ELISA [16]. Since the first description of the IPCR technique in 1992

[14], many improvements have been conducted, including the addition of real-time PCR to quantify the amplification products [17], making the technique suitable for the determination of a number of important protein antigens, including cancer biomarkers [18,19]. However, although real-time PCR can be considered a routine method, the technique is not free of limitations. First, the results obtained might be non-reproducible due to the presence of sample contaminants that can partially inhibit Taq polymerase and/or primer annealing [20]. In addition, for the determination of multiple sequences simultaneously, different fluorescent labels without spectral overlap are required, and this limits the applicability of the technique [21].

Here, we develop a new IPCR strategy that combines the amplification capability of conventional PCR with an alternative technique for the quantification of the PCR products based on the use of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). This strategy allows the label-free determination of single and multiplex PCR-amplified sequences (amplicons) by monitoring the P present in the DNA backbone, as demonstrated in our previous works [22,23]. Since the amount of P detected after the PCR correlates with the number of DNA molecules present in the sample before the reaction [22,23], when applied to IPCR, the detected P would be an indication of the amount of antigen recognized by the immunoassay. The performance of the proposed IPCR method is evaluated in the determination of biologically relevant concentrations of the HER2 ECD in serum (concentrations below the lower limit of normal range, 2 ng mL⁻¹) and cell culture supernatant. For this aim, a sandwich immunoassay using an immobilized capture antibody and a biotinylated detection antibody, which is stepwise linked to a biotinylated DNA reporter molecule using streptavidin, is developed. Subsequently, the DNA reporter molecule is amplified by conventional PCR and the amount of product formed, which reflects the amount of target protein (HER2) that was bound by the antibodies, is quantified by ICP-MS. The analytical performance of the proposed IPCR-ICP-MS is established and compared with that obtained by ELISA using similar immune reagents.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and cell culture

The human breast adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 was kindly provided by S. Cal (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Spain). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere using DMEM medium (Biowest, Nuaille, France), containing 5 mg L⁻¹ of plasmocin (InvivoGen, San Diego, USA). The culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Fisher Scientific, Madrid, Spain). Cells were cultured in T-25 flasks and were subcultured when confluence reached 90% using trypsin to detach them from the surface of the flask. Cell culture supernatant was recovered after four days of cells growing and used as sample in the immuno-PCR assay.

2.2. Preparation of biotinylated DNA marker

A biotinylated DNA marker was prepared by PCR amplification of a 123 base pairs (bp) long segment of the pUC19 plasmid, using

a 5'-biotinylated forward primer (F: 5'-biotin-GGCCAGTGAATTCGAGCTCG3') and an un-modified reverse primer (R: 5'-GTGGAATTGTGAGCGGATAAC3'). PCR was performed in a Thermal Cycler (Sure Cycler 8800, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) under the following reaction conditions: 1 μL of pUC19 (18.25 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$), 4 μL of PCR buffer (pH 8.0) $10\times$ 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl_2 , 150 nM of each primer and 2.5 U of BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline, London, U.K.) and H_2O to complete 40 μL final volume. The temperature profile was as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 45 s, annealing at 60 °C for 45 s, extension at 72 °C for 30 s, and finally 10 min at 72 °C. The resulting 123 bp PCR product was purified with the Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, Chicago, USA), and DNA concentration was quantified by fluorescence spectroscopy using the Qubit dsDNA HS Assay kit and the Qubit 2.0 fluorimeter (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA) at the Biotechnological and Biomedical Assay Unit from the Scientific and Technical Services (SCTs, University of Oviedo).

2.3. Sandwich ELISA

HER2 ECD levels in both human serum and cell culture supernatant were measured by a sandwich ELISA assay using the ErbB2 (HER2) Human ELISA kit from Thermo-Fisher Scientific (Waltham, USA). The assay was performed on 96-well strip plates coated with anti-human HER2 antibodies. The standard used was a lyophilized recombinant human HER2 protein that was reconstituted in the assay diluent supplied with the kit. The detection antibody was biotinylated and conjugated with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP). Thus, spectrophotometric detection of the assay was enabled by adding tetramethylbenzidine (TMB) as substrate. The kit was used as recommended by the manufacturer. In short, 100 μL of protein standards of different concentrations (from 8.19 to 2000 pg mL^{-1}) or samples, respectively, were placed into the coated wells for 2.5 h and incubated at room temperature with gentle shaking. Then, the supernatant was discarded, and wells were washed 4 times with washing buffer. After washing, 100 μL of the biotinylated anti-HER2 antibody (80-fold diluted) was incubated in the wells at room temperature for 45 min. The wells were then washed (4 times) and then 100 μL of streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (300-fold diluted) were added and the mix was incubated during 45 min at room temperature with gentle shaking. Finally, 100 μL of TMB substrate was dispensed into each well and everything was incubated at room temperature in the darkness for 30 min, followed by the addition of 50 μL of the stopping solution. The absorbance was determined by means of a microplate reader at 450 nm and 550 nm.

2.4. Sandwich immuno-PCR

A schematic representation of the immuno-PCR assay is shown in Fig. 1. The assay was carried out using the ELISA assay kit from Thermo-Fisher Scientific. The kit was used according to the conditions given by the manufacturer, but some modifications were introduced to adapt it to an immuno-PCR assay. First, an additional step of blockage by incubation of the plates with 200 μL of 1 g L^{-1} single stranded DNA from salmon testes (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 3 h at room temperature, and 48 h at 4 °C was added. The plates were washed afterwards with washing buffer (twice), followed by adding 100 μL of recombinant Human HER2 protein standards (concentration from 8.19 to 2000 pg mL^{-1}), or samples, to each well. Then, the protocol was similar to the one used for ELISA except for the last step. In conventional ELISA, 100 μL of TMB substrate were added to each well,

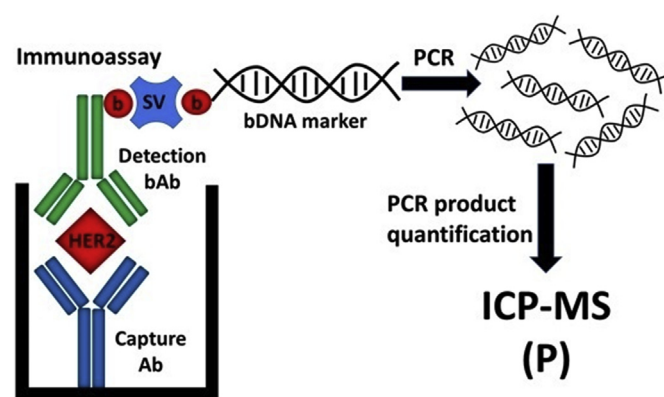


Fig. 1. Schematic representation of the general strategy for the determination of HER2 by immuno-PCR-ICP-MS. Capture antibody (Ab) is immobilized onto the plate surface and the antigen (HER2) is detected with a biotinylated antibody (bAb), which is linked to a biotinylated DNA (bDNA) marker using streptavidin (SV). The DNA marker is then amplified by conventional PCR and the PCR product is quantified by triple quadrupole ICP-MS monitoring PO^+ (m/z 47).

while in the immuno-PCR, 100 μL of biotinylated DNA marker (0.835 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$) were added and incubated for 1 h at room temperature with gentle shaking. Finally, wells were washed 7 times before adding 25 μL of 0.1% nitric acid solution to break the biotin-streptavidin interactions and release the DNA marker. After 1 min of incubation, the supernatant was removed and an aliquot of 10 μL was transferred to PCR tubes for amplification by conventional PCR.

PCR was done with the following couple of oligonucleotides primers (F: 5'-CCTCTAGAGTCGACCTGCAGG3' and R: 5'-GTGGAATTGTGAGCGGATAAC3') using 10 μL of immunoassay product, 4 μL of PCR buffer (pH 8.0) $10\times$ 0.2 mM of dNTPs, 1.5 mM of MgCl_2 , 100 nM of each oligonucleotide, 2.5 U of BIOTAQ™ DNA polymerase (Bioline) and H_2O to complete the final volume (40 μL). PCR conditions were 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, and finally 10 min at 72 °C. Along with standards or samples, background and negative controls, which contained all the components except for the HER2 protein and the DNA marker, respectively, were also run.

PCR products were purified (30 μL of each) with the Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, Chicago, USA), washing three times with wash buffer, and recovered in a final volume of 80 μL of water.

2.5. Determination of immuno-PCR products by ICP-MS

Purified PCR products were analysed by ICP-MS using a triple quadrupole ICP-MS Thermo iCAP-TQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) mass spectrometer. All the measurements were done in triple quad mode, using oxygen as reaction gas and detecting the reaction product of $^{31}\text{P}^+$ with oxygen at m/z 47 (PO^+). The ICP-MS instrument was equipped with a Micro mist nebulizer and a cyclonic spray chamber (ESI Elemental Service & Instruments GmbH, Mainz, Germany). Instrumental operating conditions are given in Table 1.

Samples were introduced using a flow injection set-up using 0.1% HNO_3 as carrier at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . The sample injection was done using a dual mode injection valve from Rheodyne, model 9725 (Cotati, California, USA), equipped with a 20 μL PEEK injection loop.

2.6. Conventional slab gel electrophoresis separation

For checking PCR reactions, slab gel electrophoresis (GE) was

Table 1
Instrumental conditions of iCAP-TQ-ICP-MS and reaction conditions of PCR.

ICP-MS	
Parameter	
RF power (W)	1550
Plasma gas flow (L min ⁻¹)	14.0
Auxiliary gas flow (L min ⁻¹)	0.8
Carrier gas flow (L min ⁻¹)	1.0071
Measurement mode	Triple Quadrupole
Cell gas flow (mL min ⁻¹)	0.28 (O ₂)
Q1 bias (V)	0.00
QCell bias (V)	-6.38
Q3 bias (V)	-12.00
Q1 masses (u)	31
Q3 masses (u)	47
Nebulizer	MicroMist™
Spray chamber	Cyclonic
Spray chamber temperature (°C)	2.70 °C
PCR	
Process	
Initial denaturation	5 min at 95 °C
Denaturation	45 s at 95 °C
Annealing	45 s at 60 °C
Extension	30 s at 72 °C
Number of cycles	35
Final extension	10 min at 72 °C

carried out in 2% agarose gels (in TBE buffer (Tris-borate-EDTA), pH 8.2), stained with ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹), using the size marker 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) and a voltage of 150 V. Gels were visualized with Gene Flash Syngene Bio Imaging (Syngene).

3. Results and discussion

3.1. Development of the IPCR-ICP-MS method for determination of HER2

Careful optimization of the PCR conditions to amplify a 91bp DNA fragment from the biotinylated 123 bp DNA marker was first conducted. Final optimized reaction conditions are summarized in Table 1. Using these conditions the concentration of the PCR product (amplicon) obtained is on the linear part of the reaction curve and, therefore, the amplicon concentration correlates with the initial DNA template concentration [22,23]. Subsequent IPCR was conducted using pre-coated reaction wells that contained the capture anti-HER2 antibody. Beforehand, a treatment of the wells was necessary to avoid unspecific secondary interactions. For this aim, wells were blocked using different molecules like, bovine serum albumin, calf thymus DNA and salmon sperm DNA. Best results were obtained with the latest, in terms of elimination of any blank traces after amplification of the negative control.

Then, the IPCR was conducted by sequential addition of the HER2 protein standards (or samples), the biotinylated detection antibody, streptavidin and finally, the biotinylated DNA marker as described in Fig. 1. After successive washing steps, the remaining product was removed from the plates (by acid treatment) and amplified using the PCR reaction conditions previously optimized (see Table 1). The products obtained after PCR amplification, which are proportional to the amount of HER2 recognized by the antibodies, were first measured by agarose gel electrophoresis (after clean-up) to ensure the presence of the expected amplicon (91bp) and the absence of other secondary PCR products. Fig. 2 shows the gel electrophoresis images of the amplicon corresponding to different concentrations of HER2 standard from 2000 to 8 pg mL⁻¹.

The gel images obtained using aliquots of 4, 7 and 10 µL of the immunoassay product solution for PCR are shown in Fig. 2A, 2B and 2C, respectively. As observed, the bands of the amplicon are not detectable when using 4 µL (Fig. 2A), indicating that the amount of the DNA marker that corresponds to the amount of HER2 is very small. By using 7 µL (Fig. 2B), it is possible to visualize a band for the highest concentrations of the antigen (HER2). However, all the tested antigen concentrations can be clearly visualized when using 10 µL (Fig. 2C) of the immunoassay product for amplification. In this case, all concentrations show a single band that corresponds to a DNA fragment of approximately 91 pb (size of the expected amplicon).

Since only one GE band is observed after amplification (meaning that only one P-containing molecule is present), the concentration of the amplicon can be directly obtained by ICP-MS monitoring the phosphorous signal. The use of ICP-MS for the determination of nucleic acids offers the advantage of being a species-independent technique, meaning that the P-signal does not depend on the chemical form of the species ionized in the plasma. Such advantage enables to quantify any P-containing compound using, for instance, P-containing inorganic standards (e.g. PO₄³⁻). However, phosphorus detection by ICP-MS is hampered by the poor ionisation efficiency (ionisation potential, 10.5 eV) and its numerous and abundant spectral interferences of its only isotope (³¹P). A sector field ICP-MS (ICP-SFMS) instrument can be used to separate these spectral interferences allowing the selective detection of P with adequate sensitivity for the quantification of PCR amplicons [22,23]. However, the recent implementation of tandem ICP-MS (ICP-MS/MS or triple quadrupole ICP-MS) offers the possibility of monitoring P overcoming spectral interferences by applying mass-shift experiments [24]. This instrumental approach involves setting the first quadrupole (Q1) at *m/z* 31. Then, in the collision reaction cell (CRC), oxygen is introduced to form the oxide species that, in the case of phosphorous, is PO⁺ (*m/z* 47). Finally, the third quadrupole (Q3) is set at *m/z* 47 avoiding those interferences at *m/z* 31 to affect the P monitoring. This mass shift operation mode has been successfully applied in combination with chromatographic separation techniques to the study of phosphopeptides [25], DNA-protein conjugates [26] and organophosphorus pesticides [27].

The above described approach is used in this work to measure the phosphorous in the amplicons in the oxide form (PO⁺, *m/z* 47), under the conditions given in Table 1 and using flow injection analysis. The concentration of P in the amplicon is obtained by referring the measured peak area in the flow diagram to a previously obtained P-calibration curve using PO₄³⁻ standard solutions and the same flow injection sample introduction set-up. Then, the P-concentrations obtained for the amplicon, which are proportional to the amplicon concentration, are plotted against the analysed antigen concentrations (HER2, log scale; in the range of 8–2000 pg mL⁻¹) to establish a correlation between the amount of amplicon measured and the amount of HER2 recognized by the immunoassay.

Fig. 3 shows the average calibration curve obtained for the HER2 standards in four different days. As the PCR amplification occurs in an exponential way, the correlation between these sets of values is adjusted to a logarithmic scale [22,23]. On the view of these results, it can be concluded that the linear dynamic range of the assay is remarkable (two orders of magnitude). In addition, the calculated detection limit for the determination of HER2 (calculated as 3S_a/b where S_a refers to the standard deviation of the intercept and b is the slope of the regression line) turned out to be 2.5 pg mL⁻¹, which is lower than those reported for ELISA or other methods [28]. Other figures of merit are summarized in Table 2. Among them, the inter-day reproducibility, addressed as the relative standard deviation (RSD) of independent assays conducted in three different days for

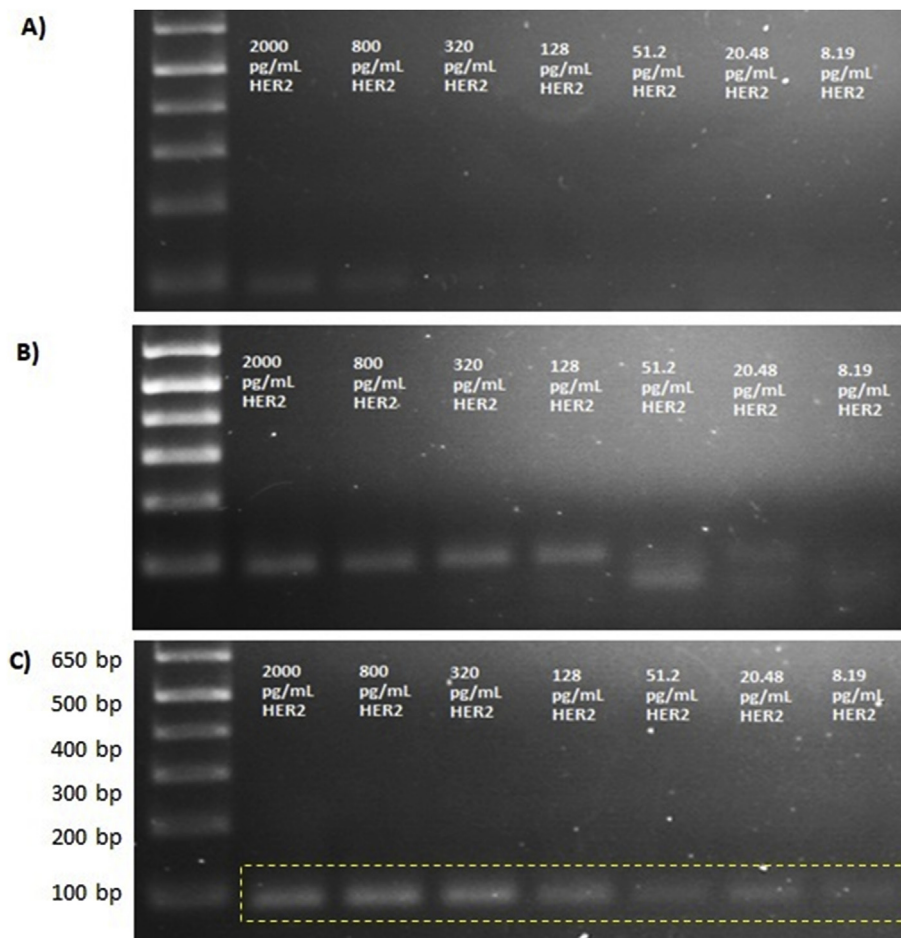


Fig. 2. Gel electrophoresis images obtained for the PCR product (amplicon) corresponding to different concentrations of HER2. The electropherograms are obtained by taking aliquots of 4 μL (A), 7 μL (B) and 10 μL (C) of the immunoassay product solution for amplification. Total immunoassay product solution volume is 25 μL .

the concentration level of 20 pg mL^{-1} , is about 8%. Such result suggests that the method has a good precision, considering the variations usually encountered for independent PCR assays [29].

In addition, the slope of the calibration curve permits to estimate the correlation between the P-concentration of the PCR amplicon obtained by ICP-MS and the initial antigen concentration (log scale). This factor (averaged 13.6 ± 0.6) remains mainly constant from day to day (inter-day SD = 0.6, $n = 4$), thus, it can be used for further transformation of the P-concentration of the PCR amplicon (easily obtained by FIA-ICP-MS) into HER2 concentration. Due to the species-independent response of ICP-MS there is no need to conduct a calibration with HER2 standards for every analysis. Therefore, the combination of the IPCR with elemental mass spectrometry shows the advantages of the selectivity of the immune assays with the extremely high sensitivity of ICP-MS detection of the amplified PCR product. Such hybrid methodology could be used for the analysis of other biomarkers for which extremely low detection limits are required and cannot be attained using direct assays.

3.2. Application to cell culture supernatant and serum samples analysis

The developed methodology was applied to the analysis of HER2 in different biological samples. One of them was the cell culture supernatant of the breast cancer cell line MDA-MB-231 after 4 days

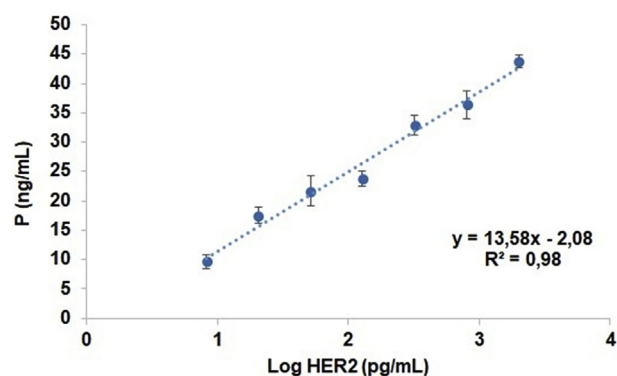


Fig. 3. Calibration curve obtained for the P-concentration (obtained from the amplicon) versus logarithm of HER2 concentration. The curve is the average of four independent experiments conducted in four different days. The errors bars represent the inter-day standard deviation (SD) of the measurements ($n = 4$).

of culture. This cell line, although highly metastatic and invasive, has been shown to be HER2 negative. The methodology was also applied to human serum samples (HER2 negative) obtained from the “Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias”, following the ethical guidelines established by the Ethic’s Commission of the institution. The results obtained for three replicate analysis of the cell culture supernatant and the serum

Table 2
Comparative figures of merit of ELISA versus IPCR-ICP-MS for HER2 determination in biological fluids.

Parameter	IPCR-ICP-MS	ELISA
^a DL (pg mL ⁻¹)	2.5	17
^b QL (pg mL ⁻¹)	8.3	56
^c Inter-day reproducibility (%RSD, n = 3)	8%	13%
^d Recoveries (%) (serum/cell supernatant)	83 ± 27/76 ± 22	113 ± 28/91 ± 19

^a Detection limit calculated as $3S_a/b$ (S_a = standard deviation of the intercept, b = slope of the regression line).

^b Quantification limit calculated as $10S_a/b$.

^c Relative standard deviation of independent assays conducted in three different days for the concentration level of 20 pg mL⁻¹.

^d Values are mean ± SD (n = 3) for a spiked concentration level of 100 pg mL⁻¹.

samples were very low and corresponded to 24.2 ± 1.4 pg mL⁻¹ (mean ± SD, n = 3) and 11.7 ± 1.6 pg mL⁻¹ (mean ± SD, n = 3), respectively. These values are well below the clinical cut-off value of 15 ng mL⁻¹ [10]. Therefore, the method could provide a very reliable measure of clinically relevant HER2 concentrations in biological samples since the sample can be diluted as necessary before the analysis to yield HER2 values within the measuring range allowing to decrease the matrix influence. Additionally, different spike and recovery experiments were conducted in both samples, cell culture supernatant and serum, to evaluate the method accuracy. For the analysis, aliquots of the samples were spiked with increasing concentrations of HER2 and then diluted (1:4 cell culture supernatant and 1:2 serum) in assay buffer to give final spiked concentrations of 15, 100 and 600 pg mL⁻¹. As Table 3 shows, the average recoveries obtained for HER2 ranged from 74%–92% and 83%–94% in the cell culture supernatant and in the serum, respectively. These values confirm the consistent capabilities of the proposed methodology for the ultrasensitive analysis of HER2 in biological media (the recoveries obtained for a concentration level as low as 20 pg mL⁻¹ are about 90%) in a wide dynamic range. Also, further multiplexed of the assay by using DNA markers with different size for different analytes can be foreseen.

3.3. IPCR-ICP-MS in comparison to ELISA for the analysis of HER2

The proposed strategy of IPCR-ICP-MS was compared with the use of commercial ELISA using HRP-labelled antibody as detection antibody and spectrophotometric detection (450 nm). Table 2 compares the analytical figures of merit of the two methods. Regarding detection limits, the IPCR-ICP-MS provides about 7-times better detection limits using just 10 µL of the immunoassay product solution for PCR. It is expected that this value can be improved when using the total volume of the solution (25 µL) for amplification. Regarding the inter-day reproducibility for the concentration level of 20 pg mL⁻¹, the %RSD of the IPCR-ICP-MS method (8%) is slightly better than that of ELISA (13%). Results for spike and recovery of antigen (spiked level 100 pg mL⁻¹) with both methods revealed that the mean recoveries obtained by ELISA

(113% in serum and 91% in cell culture supernatant) are higher than those obtained by the IPCR-ICP-MS method (83% in serum and 76% in cell culture supernatant). This could be ascribed to the losses during the clean-up of the PCR product. Previous experiments in our group revealed losses up to 50% and to be amplicon-size dependent [30].

Fig. 4 shows the comparative results of both strategies in both samples for all the spiked concentration levels assayed (15, 100 and 600 pg mL⁻¹). To address if the two sets of data obtained with the ELISA assay and with the proposed IPCR-ICP-MS method are statistically different from each other, the two-tailed Student's *t*-test and *p* values at 95% confidence level were used. As can be observed, the results obtained applying both methods for the analysis of the spiked cell culture supernatant samples are in good agreement with each other. The encountered differences (consistently lower values are obtained by IPCR-ICP-MS than by ELISA), which could be ascribed to the losses during the clean-up of the PCR product, are not statistically significant at the 95% confidence level ($p > 0.05$). The concentration of HER2 obtained by the proposed method and by ELISA in the serum samples spiked at 100 and 600 pg mL⁻¹ are also no significantly different ($p > 0.05$) from each other. However, in the case of a spiked concentration of 15 pg mL⁻¹ the result obtained by the IPCR-ICP-MS method (19.7 ± 2.4 pg mL⁻¹) is more accurate than that obtained by ELISA (43 ± 17 pg mL⁻¹), which is too high (the serum contained 20.9 pg mL⁻¹) and variable. This could be due to the fact that the concentration of HER2 in the sample is very close to the detection limit of the ELISA assay (17 pg mL⁻¹, see Table 2). In any case, the obtained results show the excellent capabilities of the proposed set-up and paves an excellent way for further multiplex experiments.

4. Conclusions

The combination of the excellent recognition capabilities of sandwich immune assays, the amplification possibilities of PCR and the selective detection of P using elemental mass spectrometry has permitted to develop the IPCR-ICP-MS assay for HER2 ECD. Sensitivity of the assay is higher than that obtained from commercial ELISA, and the linear dynamic range covers two orders of magnitude. This methodology was applied to the determination of an important breast cancer biomarker, HER2, in cell culture supernatant from breast cancer cells and human serum samples at concentrations far below the clinical cut-off with good reproducibility and accuracy, but could be extended to different protein biomarkers of interest for clinical diagnosis. This type of strategy shows the high potential of the correlation that can be established between the PCR amplification and the ICP-MS detection of phosphorous in the generated products. Taking into account that signal amplification is considered the “holy grail” for improving sensitivity in biomarker analysis, the possibility of carrying out amplification after the recognition improves the biocompatibility and feasibility of this assay over other strategies.

Table 3
Recoveries of HER2 from spiked samples by the developed IPCR-ICP-MS method.

Sample	Expected HER2 concentration (pg mL ⁻¹)	^a Found HER2 concentration (pg mL ⁻¹)	Recoveries (%)
Cell culture supernatant	21.0	19.2 ± 3.2	92
	106.0	81 ± 23	76
	606.0	451 ± 123	74
Human Serum	20.9	19.7 ± 2.4	94
	105.9	88 ± 28	83
	605.9	503 ± 188	83

^a Values are mean ± SD (n = 3).

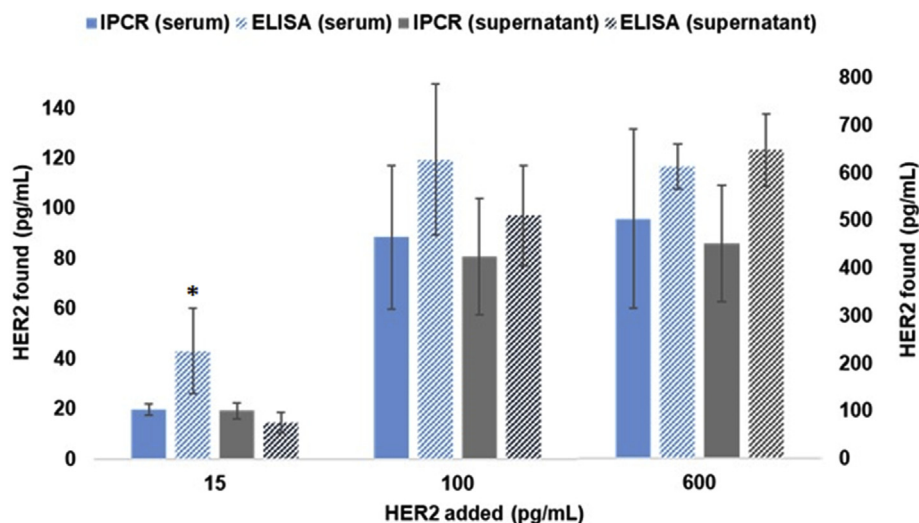


Fig. 4. Comparison of ELISA and immuno-PCR-ICP-MS for the determination of HER2 in serum (blue) and cell culture supernatant (grey) at different levels of spiked concentration (15, 100 and 600 pg mL^{-1}). The y-axis on the left side corresponds to the HER2 concentrations found for the spiked levels of 15 and 100 pg mL^{-1} , and the y-axis on the right side corresponds to the HER2 concentrations found for the spiked level of 600 pg mL^{-1} . The errors bars represent the standard deviation (SD) of the measurements (triplicate analysis, $n = 3$). * Significantly higher than the immuno-PCR-ICP-MS result (t -test, $p < 0.05$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

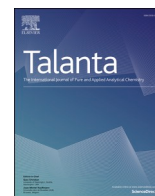
Acknowledgements

This work was supported by the Gobierno del Principado de Asturias (Oviedo, Spain) through Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación (PCTI) co-financed by FEDER funds (Ref. FC-GRUPIN-IDI/2018/000242) and by the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) of Spain under the Project CTQ2016-80060-C2-1R. A. F. Asensio acknowledges the Gobierno del Principado de Asturias (Spain) for the funding through Severo Ochoa scholarship's program.

References

- [1] M.J. Duffy, C.M. Sturgeon, G. Soletormos, V. Barak, R. Molina, D.F. Hayes, E.P. Diamandis, P.M. Bossuyt, Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers, *Clin. Chem.* 61 (2015) 809–820, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239863>.
- [2] A.M. Kabel, Tumor markers of breast cancer: new perspectives, *J. Oncol. Sci.* 3 (2017) 5–11, <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>.
- [3] D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, W.L. McGuire, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235 (1987) 177–182, 80.
- [4] M. Krainer, T. Brodowicz, R. Zeillinger, C. Wiltshcke, C. Scholten, M. Seifert, E. Kubista, C.C. Zielinski, Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer, *Oncology* 54 (1997) 475–481, <https://doi.org/10.1159/000227606>.
- [5] L. Loo, J.A. Capobianco, W. Wu, X. Gao, W.Y. Shih, W.-H. Shih, K. Pourrezaei, M.K. Robinson, G.P. Adams, Highly sensitive detection of HER2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients by piezoelectric microcantilevers, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3392–3397, <https://doi.org/10.1021/ac103301r>.
- [6] J. Tchou, L. Lam, Y.R. Li, C. Edwards, B. Ky, H. Zhang, Monitoring serum HER2 levels in breast cancer patients, *SpringerPlus* 4 (2015) 237, <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1015-6>.
- [7] C.L. Arteaga, M.X. Sliwkowski, C.K. Osborne, E.A. Perez, F. Puglisi, L. Gianni, Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 9 (2012) 16–32, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.177>.
- [8] G. Pauletti, S. Dandekar, H. Rong, L. Ramos, H. Peng, R. Seshadri, D.J. Slamon, Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry, *J. Clin. Oncol.* 18 (2000) 3651–3664, <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.21.3651>.
- [9] E.A. Perez, J. Cortés, A.M. Gonzalez-Angulo, J.M. Bartlett, HER2 testing: current status and future directions, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 276–284, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.001>.
- [10] L. Lam, N. McAndrew, M. Yee, T. Fu, J.C. Tchou, H. Zhang, Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD, *Biochim. Biophys. Acta* 1826 (2012) 199–208, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.012>.
- [11] H. Zhang, Q. Zhao, X.-F. Li, X.C. Le, Ultrasensitive assays for proteins, *Analyst* 132 (2007) 724, <https://doi.org/10.1039/b704256f>.
- [12] J.M. Liu, X.P. Yan, Ultrasensitive, selective and simultaneous detection of cytochrome c and insulin based on immunoassay and aptamer-based bioassay in combination with Au/Ag nanoparticle tagging and ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1191–1197, <https://doi.org/10.1039/c0ja00232a>.
- [13] X. Zhang, B. Chen, M. He, H. Wang, B. Hu, Gold nanoparticles labeling with hybridization chain reaction amplification strategy for the sensitive detection of HepG2 cells by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 736–740, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.073>.
- [14] T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor, Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates, *Science* 258 (1992) 120–122.
- [15] J. Flanigan, M. Kamali-Moghaddam, I. Burbulis, C. Annink, M. Steffen, P. Oeth, R. Brent, D. van den Boom, U. Landegren, C. Cantor, Multiplex protein detection with DNA readout via mass spectrometry, *N. Biotech.* 30 (2013) 153–158, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.003>.
- [16] C.M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 208–216, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.006>.
- [17] M. Adler, R. Wacker, C.M. Niemeyer, Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies, *Analyst* 133 (2008) 702–718, <https://doi.org/10.1039/b718587c>.
- [18] A.H. Khan, E. Sadroddiny, Application of immuno-PCR for the detection of early stage cancer, *Mol. Cell. Probes* 30 (2016) 106–112, <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.010>.
- [19] N. Malou, D. Raoult, Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies, *Trends Microbiol.* 19 (2011) 295–302, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.004>.
- [20] S.C. Taylor, G. Laperriere, H. Germain, Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2409, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.
- [21] D. Klein, Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) 257–260.
- [22] T. Iglesias González, M. Espina, L.M. Sierra, J. Bettmer, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Enhanced detection of DNA sequences using end-point PCR amplification and online gel electrophoresis (GE)-ICP-MS: determination of gene copy number variations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11028–11032, <https://doi.org/10.1021/ac502671f>.
- [23] A. Fernández Asensio, T. Iglesias, A. Cotarelo, M. Espina, E. Blanco-González, L.M. Sierra, M. Montes-Bayón, Multiplex polymerase chain reaction in combination with gel electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for the determination of gene copy number

- variations and gene expression changes, *Anal. Chim. Acta* 1023 (2018) 64–73, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.047>.
- [24] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, Inductively coupled plasma – tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): a powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements – a tutorial review, *Anal. Chim. Acta* 894 (2015) 7–19, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.053>.
- [25] S. Díez Fernández, N. Sugishima, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5851–5857, <https://doi.org/10.1021/ac3009516>.
- [26] J. Gong, M.J. Solivio, E.J. Merino, J.A. Caruso, J.A. Landero-Figueroa, Developing ICP-MS/MS for the detection and determination of synthetic DNA-protein crosslink models via phosphorus and sulfur detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2433–2437, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8504-x>.
- [27] J. Nelson, H. Hopfer, F. Silva, S. Wilbur, J. Chen, K. Shiota Ozawa, P.L. Wylie, Evaluation of GC-ICP-MS/MS as a new strategy for specific heteroatom detection of phosphorus, sulfur, and chlorine determination in foods, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 4478–4483, <https://doi.org/10.1021/jf506372e>.
- [28] A. Gauchez, N. Ravel, D. Villemain, F. Brand, D. Pasquier, R. Payan, M. Mousseau, Evaluation of a manual ELISA kit for determination of HER2/neu in serum of breast cancer patients, *Anticancer Res.* 28 (2008) 3067–3073.
- [29] A. Lievens, S. Van Aelst, M. Van den Bulcke, E. Goetghebeur, Simulation of between repeat variability in real time PCR reactions, *PLoS One* 7 (2012) e47112, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047112>.
- [30] T. Iglesias González, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, New strategy to address DNA-methyl transferase activity in ovarian cancer cell cultures by monitoring the formation of 5-methylcytosine using HPLC-UV, *J. Chromatogr. B* 1028 (2016) 16–24, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.038>.



Targeting HER2 protein in individual cells using ICP-MS detection and its potential as prognostic and predictive breast cancer biomarker

A. Fernández Asensio^{a,b}, M. Corte-Rodríguez^a, J. Bettmer^a, L.M. Sierra^b, M. Montes-Bayón^{a,*}, E. Blanco- González^{a,**}

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), C/ Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

^b Department of Functional Biology (Genetic Area), Faculty of Medicine, University of Oviedo, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) and Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), C/ Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

HER2
Cell targeting
Single cell ICP-MS
Antibody labelling
Breast cancer
Biomarkers

ABSTRACT

The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a transmembrane protein that has become one of the most specific prognostic and predictive biomarker of breast cancer. Its early detection is key for optimizing the patient clinical outcome. This work is focused on the detection of HER2 in individual cells using an antibody containing lutetium (Lu) as reporter group that is monitored by introducing the individual cells into the inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS). This Lu-containing antibody probe is used to label different breast cancer cell lines considered HER2 negative (MDA-MB-231) and positive (SKBR-3 and BT-474). Optimizations regarding the amount of the probe necessary to ensure complete labelling reactions are conducted in the different cell models. Concentrations in the range of 0.006 fg Lu/cell and 0.030 fg Lu/cell could be found in the HER2 negative and HER2 positive cells, respectively. In addition, the selectivity of the labelling reaction is tested by using two different metal-containing antibody probes for HER2 (containing Lu) and for transferrin receptor 1 (containing Nd), respectively, within the same cell population. Finally, the methodology is applied to the targeting of HER2 positive cells in complex cell mixtures containing variable amounts of BT-474 and MDA-MB-231 cells. The obtained results showed the excellent capabilities of the proposed strategy to discriminate among cell populations. This finding could help for scoring HER2 positive tumors improving existing technologies.

1. Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease with different intrinsic subtypes affecting women worldwide [1]. One of the subtypes is the so called HER2 positive, which correlates with the overexpression of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in the tumor cells, and accounts for 20–30 % of the diagnosed breast cancers [2]. HER2 is a transmembrane protein with an intracellular tyrosine kinase domain and an extracellular domain that is normally expressed at low levels in the epithelial cells of many tissues. The aberrant expression of HER2, however, plays a crucial role in oncogenic transformation and tumorigenesis in different types of cancer [3]. For instance, breast cancers can have up to 25–50 copies of the *HER2* gene, and up to 40–100 fold increase in HER2 protein levels resulting in more than 2 million receptors

expressed at the tumor cell surface [4]. Such overexpression has been shown to be correlated with the growth and progression of a very aggressive subtype of breast cancer (HER2 positive) [5,6]. Thus, the HER2 status (HER2 positivity) has become a biomarker of poor prognosis, associated with a high rate of recurrence and mortality in patients with breast cancer [7], and, most important, it is the sole marker for stratifying patients to anti-HER2-based therapies [7]. In addition, the diagnosis as HER2 positive breast cancer has also a predictive value as biomarker of response to a variety of therapy regimens including endocrine therapies, chemotherapy with different agents such as anthracyclines and taxanes, and HER2-targeted therapies [8–10]. Therefore, the early detection of HER2 positive breast tumor cells is crucial for optimizing clinical outcomes in the affected patients.

In this regard, two different types of methods are clinically used in

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: montesmaria@uniovi.es (M. Montes-Bayón), eblancog@uniovi.es (E. Blanco- González).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122773>

Received 28 May 2021; Received in revised form 29 July 2021; Accepted 31 July 2021

Available online 8 August 2021

0039-9140/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

the analysis of this prognostic and predictive breast cancer biomarker [11,12]: those based on the detection of HER2 protein overexpression (protein levels), and those based on the detection of *HER2* gene amplification (gene copy numbers) or *HER2* gene expression (messenger RNA levels). Within the first group, the most commonly used technique in clinical practice is immunohistochemistry (IHC), which involves the detection of HER2 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) sections of biopsy specimens using a primary antibody against the HER2 protein. The protein-antibody complex formed in cell membranes is subsequently visualized by adding a secondary antibody with a fluorescent or enzymatic label. Currently, four commercially available IHC testing kits have been approved by the American Food and Drug Administration (FDA) to evaluate HER2 status [13]. However, issues such as tissue fixation, choice of primary antibody, and determination of thresholds for reporting positive results, which is very much influenced by the observer, are critical aspects when using this strategy, as well as, the inability to generate quantitative data [14]. On the other hand, some efforts have been focused on the development of an enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) to quantify the HER2 extracellular domain. This part of the protein can be excised by metalloproteases from the full-length HER2 and circulate freely in serum where the determination is commonly conducted [15]. However, there are still some uncertainties about the utility of HER2 extracellular domain levels in serum as a valid prognostic/predictive tool of HER2-positive breast cancers [16].

Regarding the detection of the *HER2* gene amplification, fluorescence in situ hybridization (FISH) is currently the most widely technique in the clinical setting to assess gene amplification and three different kits have been already approved by the FDA [13,17]. The technique, which is performed on FFPE tissues, uses fluorescent-labelled probes (oligonucleotides) to detect specific DNA fragments in cell nucleus by hybridization of complementary sequences. Although FISH is considered a more accurate and reliable technique than IHC, it is more expensive, time-consuming and technically demanding [12]. Therefore, alternative techniques based on the amplification of target DNA sequences by polymerase chain reaction (PCR) have been developed to assess *HER2* gene amplification, such as quantitative PCR (qPCR) and multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) [11,12]. Finally, the evaluation of HER2 status based on messenger RNA levels by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) [18], or by commercially available microarray-based test [19], has also been proposed. The implementation of all these techniques in clinical routine, however, still needs to be thoroughly examined.

In addition to the previously described methods, nowadays there is an increasing interest in the determination of HER2 status directly in individual cells, in particular in circulating tumor cells (CTCs) [20]. CTCs are defined as the small number of tumor cells spreading through the blood, after detaching from the primary tumor, and can be considered to be responsible for the establishment of distant metastasis [21]. After capture and enrichment from a blood sample, the detection of CTCs is based on the labelling of tumor cell-specific markers at the cell surface using specific antibodies containing fluorophores [21]. Thus, one of the advantages of detecting HER2 in CTCs is that the analysis could be done at the protein level directly on the cell surface. The use of CTCs as a surrogate marker to characterize a tumor eliminates the need for tissue collection, thus minimizing invasive procedures, since the analysis is performed in blood samples, which can be considered as liquid biopsies [22]. However, there is still a lack of clinical data to prove the validity of such measurements due to the instrumental challenges associated to single cell analysis, and to the extremely high sensitivity required to obtain conclusive data in patient samples. In this vein, recently, mass cytometry (MC) has emerged as the technology to allow detection and quantification of dozens of markers simultaneously in a single cell with enlarged sensitivity [23]. MC is therefore uniquely suited for multi-parameter analyses of heterogeneous biological samples, such as tumors. In this case, cells are incubated ("stained") with

antibodies containing metal isotopes as reporter groups (instead of fluorophores used in conventional flow cytometry) that bind targets of interest on and/or within the cell. Cells are then introduced individually into the inductively coupled plasma-time of flight mass spectrometer (ICP-TOF-MS). The fast scanning capabilities of this type of mass analyzer facilitate the detection, almost simultaneously, of different isotopes (and elements) within a fast transient event corresponding to the ionization of a single cell in the plasma. Such features have been exploited for the imaging of HER2 protein levels in cell cultures and also in tissue samples, although not yet in the context of CTCs analysis [24, 25].

This study makes use of an analytical strategy based on the combination of antibody labelled with lanthanide-containing polymeric chelates and single-cell ICP-MS detection, to study HER2 protein cellular targeting in suspensions of complex cell populations for future application in breast cancer prognosis and prediction. For this purpose, HER2 protein is targeted in individual cells using antibodies containing lanthanide probes, in combination with a triple quadrupole ICP-MS fitted with a single cell sample introduction system. The optimization of the recognition procedure is performed in different breast cancer cell models with different levels of HER2 protein (MDA-MB-231, SKBR-3 and BT-474). The selectivity of the labelling process towards HER2 and the sensitivity of the targeting assay to discriminate HER2 positive cells within a mixed cell population with different levels of the protein is critically studied.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

All ICP-MS experiments during this study were performed using the triple quadrupole instrument iCAP TQ-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) using the oxygen-TQ mode for the measurement of phosphorous (mass shift from $^{31}\text{P}^+$ to $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ after reaction with oxygen in the reaction cell), and SQ-mode (single quadrupole-mode) for $^{175}\text{Lu}^+$ and $^{142}\text{Nd}^+$ monitoring. For the single cell experiments, the ICP-MS instrument was fitted with the Single Cell Sample Introduction System (SC-SIS, Glass Expansion, Weilburg, Germany). The cells were pumped using a microflow syringe pump SP101i (Florida, USA) fitted with a 1 mL Hamilton syringe (Nevada, USA) at $10\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. The data were recorded in time-resolved analysis mode during 3 min per analysis using a dwell time of 5 ms. Under these conditions, only a single isotope could be measured in one run due to the sequential nature of the measurements in a quadrupole system. Instrumental conditions are summarized in Table S1.

The studies of the labelled antibody were carried out by connecting on-line the size exclusion chromatography (SEC), using an HPLC system Agilent 1260 equipped with a binary pump (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), to the iCAP TQ ICP-MS instrument as elemental detector. The column for the separation was a Superdex 200 10/300 GL (300 mm \times 10 mm i. d, GE Healthcare Bio-Sciences) that has a fractionation range from 10 to 600 kDa. An aliquot of 100 μL of a water-diluted labelled antibody solution was injected in the column. The chromatographic separation was performed in isocratic mode for 45 min using a mobile phase at a flow rate of $0.7\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$.

For cell counting, a Flow Cytometer Cytoflex S Beckman Coulter (California, USA) was used. The cell number was determined by absolute counting. For this aim, the peristaltic pump of the flow cytometer was calibrated at $60\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. Forward and scattered light from the blue laser (488 nm) was registered in order to determine and count the intact cells according to their size and morphology, and to exclude cell debris.

2.2. Reagents and materials

All solutions were prepared using 18 M Ω cm de-ionized water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Human

HER2 antibody MAB9589 (Research Grade Trastuzumab Biosimilar CyTOF-ready) and the mouse anti-human for transferrin receptor 1 (TfR1) monoclonal antibody were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). The mobile phase for the SEC chromatography used for the characterization of the antibody consisted of a 50 mmol L⁻¹ ammonium acetate (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) solution at pH 7.0, at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. The column was previously calibrated using protein standards (thyroglobulin 660 kDa, ferritin 450 kDa, immunoglobulin G 150 kDa, albumin 66 kDa and alfa-lactalbumin 15 kDa) obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Lutetium standard for calibration was purchased from Merck.

The antibodies were labelled using a Maxpar ×8 Antibody Labelling Kit (Fluidigm, San Francisco, CA, USA), following the instructions of the manufacturer. For the reduction of the antibody, tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) was purchased from Sigma-Aldrich. For the purification steps, centrifugal filter units of 3 kDa and 50 kDa were used (Amicon Ultra 0.5 mL, Merck Millipore). For cell fixation, a buffered aqueous solution of formaldehyde 4 % (v/v) (VWR Chemicals, Pennsylvania, USA) was used. Phosphate buffered saline (PBS), tris buffered saline (TBS) and bovine serum albumin were obtained from Sigma Aldrich.

2.3. Cell cultures

Human breast cancer cell line MDA-MB-231 (HER2 negative) was a kind gift from Dr. Santiago Cal (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Spain). Human breast cancer cell line SKBR-3 (HER2 positive) was kindly provided by Dr. Xose Antón Suárez Puente (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Spain), and human breast cancer cell line BT-474 (HER2 positive) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). MDA-MB-231 and BT-474 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, LabClinics, Barcelona, Spain) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (Gibco, Life technologies, Madrid, Spain) for MDA-MB-231, and with 20 % (v/v) fetal bovine serum and 0.01 mg mL⁻¹ bovine insulin (Invitrogen, Carlsbad, USA) for BT-474. SKBR-3 cells were grown in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640, Invitrogen, Fisher Scientific, Madrid, Spain) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum. Culture medium was always additionally supplemented with 5 µg mL⁻¹ Plasmocin prophylactic (InvivoGen, Nucliber, Madrid, Spain). Cells were grown in T-25 flasks at 37 °C in a 5 % (v/v) CO₂ atmosphere. Then, the cells were washed with PBS (three times) and collected with Corning™ CellStripper Dissociation Reagent (New York, USA).

2.4. Cell fixation and tagging

After collecting the cells with the Corning™ CellStripper Dissociation Reagent, the cell number was determined by flow cytometry and adjusted to 10⁶ cells per aliquot. The cell pellet was re-suspended in 500 µL buffered formaldehyde 4 % (v/v) and incubated for 15 min at room temperature, to fix the cellular structure during the labelling procedure, followed by washing with 3 % (w/v) BSA in PBS. After centrifugation for 5 min at 300 g the pellet was collect and re-suspended in 200 µL of the antibody solution in 3 % (w/v) BSA in PBS. This suspension was incubated for 30 min at room temperature and washed 3 times with 500 µL PBS (up to a total volume of 1500 µL) and 5 more times with 500 µL TBS (up to a total volume of 2500 µL) to minimize the phosphorus background.

2.5. Cell mixtures

Cell mixtures were prepared after collecting the cells from the cultures and determining the cell number by flow cytometry. Mixtures were always done by adding adequate volumes of each cell line in order to obtain a final mixture of 10⁶ cells. After the cell mixture was done, cells

were centrifuged and the cell mix pellet was either fixated and tagged, as previously described for single-cell analysis, or lysed for ELISA determination.

2.6. Analysis by commercial ELISA

HER2 was quantified by a commercial ELISA for comparison using the HER2 Human ELISA kit from Thermo Fisher Scientific. This is a sandwich immunoassay that uses a plate pre-coated with a capture antibody and a biotin-conjugated detection antibody. Streptavidin-horseradish peroxidase (STV-HRP) is added to the plate and bound to the detection antibody after the sandwich formation. Then, a substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) is added, which reacts with the HRP to produce a blue coloration. Afterwards, a stop solution is added and the blue coloration turns into yellow. The intensity of this signal is measured spectrophotometrically at 450 nm and is proportional to the HER2 concentration.

For the ELISA, the cells were lysed using the cell extraction buffer included in the human Transferrin Receptor SimpleStep ELISA kit from Abcam (Cambridge, U.K.). After lysis and centrifugation the supernatant was discarded and the pellet was collected and solubilized in the buffer, incubated on ice for 20 min and centrifuged at 18,000 g for 20 min at 4 °C.

2.7. Data treatment

For data treatment of single cell suspension measurements, an established iterative procedure was followed, based on averaging the entire data set and collecting all data points that are three standard deviations (3σ) above the mean. The resulting data set after removing the selected events is rearranged and the procedure is repeated until no new data points are above the 3σ threshold. After the selection of the single cell signals, those higher than 3σ above their mean were discarded, as reported previously, in order to eliminate multiple-cell events [26].

3. Results and discussion

3.1. Labelling reaction in cell models

The procedure for the labelling of the antibody followed the one provided by the manufacturer, and was previously conducted in our laboratory for detection of transferrin receptor 1 (TfR1) [27]. In summary, the reduction is done under controlled conditions using TCEP in such a way that only the sulfhydryl groups of the hinge region of the antibody were reduced. Subsequently, the polymeric chelate and the metal ion probes (Lu) were introduced to react with the reduced antibody by maleimide-thiol reaction. The evaluation of the labelling reaction was conducted by coupling the SEC column to the ICP-MS to monitor the metal probe, using similar conditions to those published previously [27]. The chromatogram obtained monitoring the ¹⁷⁵Lu⁺ signal in the ICP-MS is shown in Fig. 1. As can be observed, two different peaks are present in the chromatogram corresponding, by comparison to previously obtained data [27], to the labelled antibody (at about 16 min, corresponding to 65 % of the total Lu peak area) and to the excess of the labelling reagents (at about 20 min). The Lu concentration in the injected solution was obtained by ICP-MS, and the antibody concentration was obtained spectrophotometrically, at 280 nm, by using a commercial immunoglobulin G (IgG) protein standard for calibration. Considering that the chromatographic peak corresponding to the Lu-labelled antibody corresponds to 65 % of the total Lu signal, a stoichiometry of 22 Lu per mol of antibody were obtained, similar to previously obtained results using the same labelling kit [27].

The Lu-containing antibody was used to tag the HER2 protein in three different cell cultures (one HER2 negative and two HER2 positive). Single cell events monitoring ¹⁷⁵Lu⁺ and ^{31p}16O⁺ were obtained for the

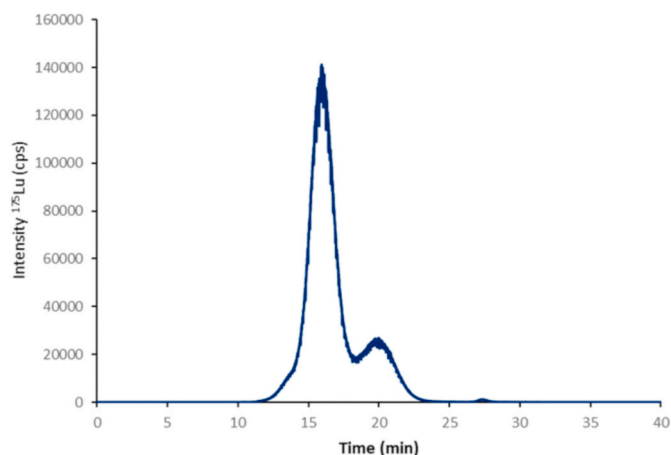


Fig. 1. Chromatogram obtained by SEC-ICP-MS monitoring ^{175}Lu of the anti-HER2 antibody after controlled reduction and labelling with Maxpar $\times 8$ Antibody Labelling Kit, using ^{175}Lu as elemental probe.

three different cell models. As an illustrative example to compare results for HER2 positive and HER2 negative cells, Fig. 2 shows the events detected for the cell line MDA-MB-231 (HER2 negative, panels A and C) and one of the two HER2 positive cell lines, the SKBR-3 (panels B and D). As can be seen, although the phosphorous signals (A and B) are comparable in both plots, the number of events and their heights in the case of Lu (C and D) are significantly different. The detection of some Lu events in the case of the MDA-MB-231 is due to the presence of HER2, at low levels, in most breast cancer cells, and even in normal non-tumor cells. The intensity of these events is very close to the instrumental detection limit, calculated as three times the standard deviation of the continuous background (3σ) that was the criterion selected as the threshold for discrimination of cells events from the background noise.

The next step was the titration of the antibody by optimization of the amount of antibody added to every cell culture to ensure complete tagging of the HER2 molecules present on the cell surface, while keeping low background levels. For this purpose, different dilutions of the labelled antibody were used to tag the HER2, and the Lu per cell was quantified in each case. To select the starting antibody concentration, we considered the data obtained in previously published work [27]. From that point, we increase the concentration until no effect on the efficiency of the labelling reaction (fg Lu/cell) was observed. As usually done when conducting calibration curves, increasing antibody concentrations that double the previous one were used (2 , 4 and $8 \mu\text{g mL}^{-1}$) and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ was used to assure a sufficient excess.

For such quantification, the ICP-MS was calibrated using Lu inorganic standards. The instrumental response per concentration unit, was transformed into the mass of Lu per cell using the previously established equation (see SI). Different results were observed for the different cell cultures analyzed, as can be seen in Fig. 3 where the three panels reveal the mass of Lu per cell observed in BT-474 (A), MDA-MB-231 (B) and SKBR-3 (C) cells, respectively. In the case of MDA-MB-231 cells, there are no significant differences in the mass of Lu per cell among antibody concentrations; since this cell line is considered as HER2 negative, the few receptors present on the cell surface can be tagged using the lowest antibody concentration. Higher antibody concentrations did not provide any changes in the Lu signal per cell, confirming the selectivity of the method towards HER2. In the case of BT-474 and SKBR-3 cells (Fig. 3A and C, respectively), the mass of Lu per cell increases upon increasing the concentration of the antibody and, in both cases, stays constant applying an antibody concentration higher than $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Thus, the antibody concentration of $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ seems to represent sufficient excess to tag all of the HER2 present in the cell surface of all the analyzed cell lines.

It is noteworthy from Fig. 3 that the mass of Lu per cell is about 2-fold higher in the case of the SKBR-3 than in the BT-474, even when both cell lines are considered equally positive with respect to HER2. These

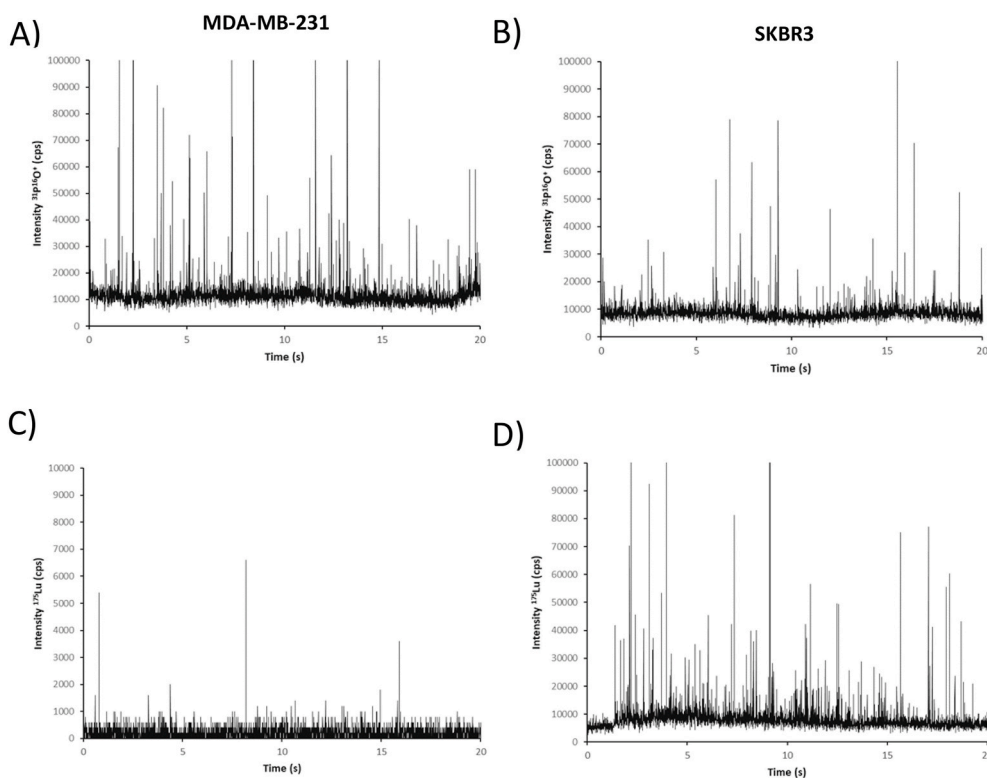


Fig. 2. Single cell events registered for $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ and $^{175}\text{Lu}^+$, using TQ-ICP-MS, after labelling with the anti-HER2 antibody containing ^{175}Lu as elemental probe. A) and C) MDA-MB-231 cell line; B) and D) SKBR-3 cell line.

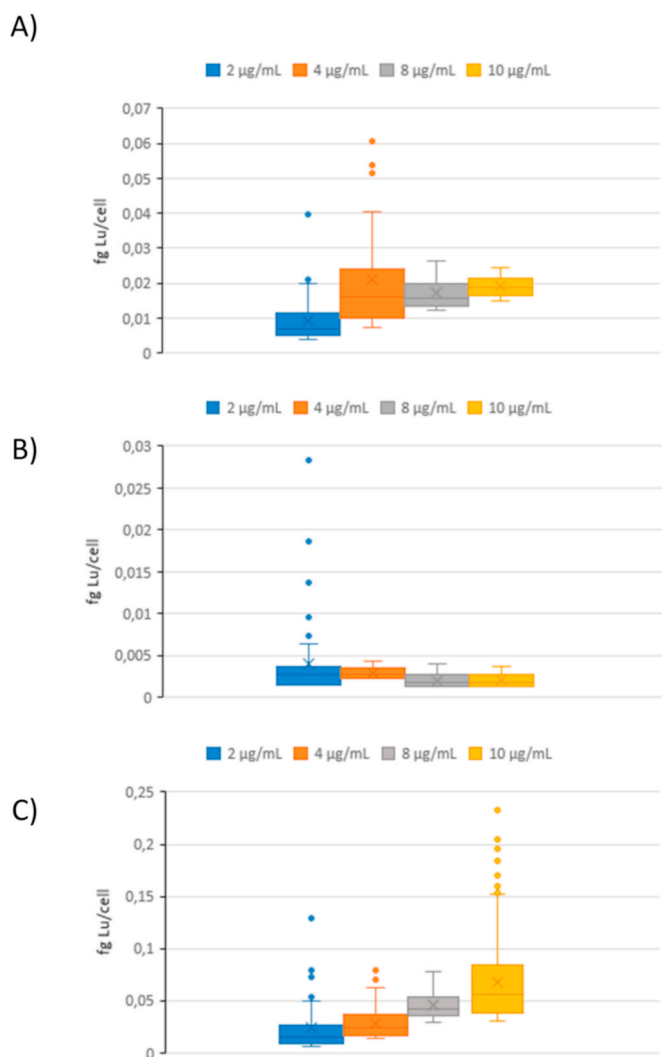


Fig. 3. Box plot corresponding to the optimization of the antibody concentration used for the labelling of HER2 in the different cell lines by quantifying the Lu concentration per cell: A) BT-477, B) MDA-MB-231 and C) SKBR-3.

differences might be ascribed, however, to the cellular morphology exhibited by these two cell lines. The BT-474 cells might be slightly smaller in diameter than the SKBR-3 ones [28] and form colonies exhibiting robust cell to cell adhesion, while SKBR-3 cells are slightly larger [29] and can be distinguished by their grape-like appearance with poor cell to cell contact [30]. Therefore, the number of receptors per active area could be lower in the case of the BT-474 cells and, thus, the detected mass of Lu.

3.2. Analytical figures of merit

To address method sensitivity, a number of Lu standards of different concentrations (from 0 to 2 ng mL⁻¹) were introduced into the system and the intensity obtained for each of them. Equation 1 (see SI) was used to obtain the sensitivity per dwell time to be able to calculate the mass of Lu entering the plasma per dwell time (considering that in every dwell time only one cell enters the system). Using this equation, it is possible to represent the Lu intensity for the standards versus the mass/dwell time of these standards. The slope of this graph is the sensitivity of the single cell method which turned to be 1800 ct/ng per dwell time. Regarding the limit of detection, it has been calculated as three times the standard deviation of the continuous background (3σ) that was the criterion selected as the threshold for discrimination of cells events from the

background. The obtained detection limit turned out to be 0.002 fg Lu/cell.

The selectivity of the methodology towards HER2 was assessed by comparing the results on HER positive and negative cell lines (see Fig. 3). In addition, the selectivity of the labelling procedure using two antibodies tagged with different metals (Lu and Nd) within the same cell culture was also evaluated. For this aim, two different cell lines (MDA-MB-231 and SKBR-3) were labelled using two different antibodies, one of them against HER2 (labelled with Lu as metal probe) and another one against TfR1 (labelled with Nd as metal probe). Since the measurements were conducted with a TQ-ICP-MS, only sequential measurements could be conducted and, thus, monitoring of *m/z* 142 and 175 was carried out in separate runs of 180s. The obtained results can be observed in the box plot of Fig. 4. As can be seen, the Lu intensity in the HER2 negative line (MDA-MB-231, orange box) is very low while in SKBR-3 (HER2 positive, blue box) is significantly higher ($p < 0.001$). This shows the selectivity of the method to discriminate HER2 positive and negative cell lines.

TfR1 is responsible for Fe uptake in cells through the Fe-loaded transferrin/TfR1 association and incorporation into cells. Since Fe is an essential element for cell survival, TfR1 is overexpressed in most tumor cells [27] and, therefore, it should be efficiently labelled in both cell lines (Nd-probe) although with different intensities due to the different expression level. Therefore, the obtained results confirm the selectivity of the labelling procedure for HER2 monitoring.

3.3. Targeting HER2 in cell mixtures

One of the main challenges of single cell experiments is to be able to discriminate among complex cell populations the presence of malignant phenotypes that might affect the future treatment of the disease ("to find a needle in a haystack"). This is currently done in routine clinical practice by IHC (as described before) on tissue specimens. However, the technique presents a few limitations, particularly in the assessment of HER2, regarding data normalization. In fact, several publications compared the data provided with this technique and those obtained by FISH for the same set of samples. Concordances ranging from 65 % to 95 % between both sets of data were obtained depending on the IHC scoring system [31]. Therefore, to prove the feasibility of the proposed methodology for HER2 targeting in mixed cell populations (e.g. extracted from a tissue specimen), different mixtures of HER2 negative (MDA-MB-231) and HER2 positive (BT-474) cells were prepared by mixing adequate volumes of the individual cultures. The mixtures contained approximately 100 %, 80 %, 50 %, 20 % and 0 % HER2 positive (BT-474) cells with respect to the total cell number concentration (1×10^6 cells/mL). After careful counting and mixing, they were further

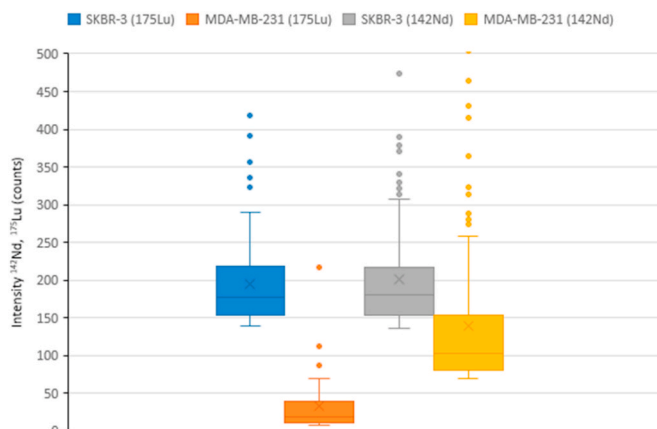


Fig. 4. Box plot of the Lu and Nd signals corresponding to the simultaneous labelling of HER2 and TfR1, respectively, in cell lines MDA-MB-231 and SKBR-3.

fixed and labelled with the Lu-probe. The mixtures were analyzed with the proposed strategy and the results can be seen in Fig. 5, in a box plot corresponding to all the mixtures. The percentage of each of the different cell lines used for the measurements was selected to cover the whole range from 0 % HER2 positive to 100 % HER2 positive and including 5 data points. They should be sufficient to prove the suitability of the proposed strategy to detect HER2 positive cells in mixtures of cells with different amounts of HER2, as can be found in tumoral samples.

As can be observed, the 0 % BT-474 (100 % MDA-MB-231) shows most events in the lower range of fg Lu/cell (<0.01 fg Lu/cell), with the median about 0.006 fg Lu/cell and with a very small interquartile range (0.0028–0.0129 fg Lu/cell). As the percentage of BT-474 cells is increased in the mixture from 0 % to 20, 50, 80 and 100 % respectively, the median of the fg Lu/cell increases to 0.0157, 0.0188, 0.0271 and 0.0297, respectively (see Table 1). By plotting the median versus the % BT-474 (Fig. 6), a correlation coefficient of 0.955 can be obtained, showing the capability of the technique to discriminate among cell populations. Unfortunately, the main limitation of the proposed strategy derives from the fact that the BT-474 qualified as HER2 positive cell line generates Lu signals (and Lu concentrations) with larger dispersion (interquartile range of 100 % BT-474 goes from 0.0217 to 0.0489 fg Lu/cell). This could be ascribed to the presence of phenotypic heterogeneity (higher and lower level of HER2 expression within the same cell population) that can only be detected by conducting single cell experiments [32].

3.4. ELISA measurements

In order to compare the developed strategy with existing quantitative assays, the different cell mixtures were analyzed using a commercial solid-phase sandwich ELISA assay. The results are summarized in Fig. 7 and transformed into number of HER2 receptors per cell obtained by averaging the HER2 concentration found per well by the number of cells. As can be seen, there is a significant increase of the HER2 concentration in the cell lysate upon increasing the percentage of BT-474 in the mixtures (decreasing of MDA-MB-231), similar to what has been observed in Fig. 5. The ELISA sensitivity, however, is slightly worse, as it can be observed in the mixtures containing 100 % and 80 % BT-474 that provide values not being statistically different ($p < 0.05$). In addition, the ELISA assay is applied to cell lysates, and this includes the part of the receptor that has been also endocytosed and is present within the cell cytosol. Therefore, the concentration of HER2 obtained by this method does not only reflect the presence of this biomarker at the cellular

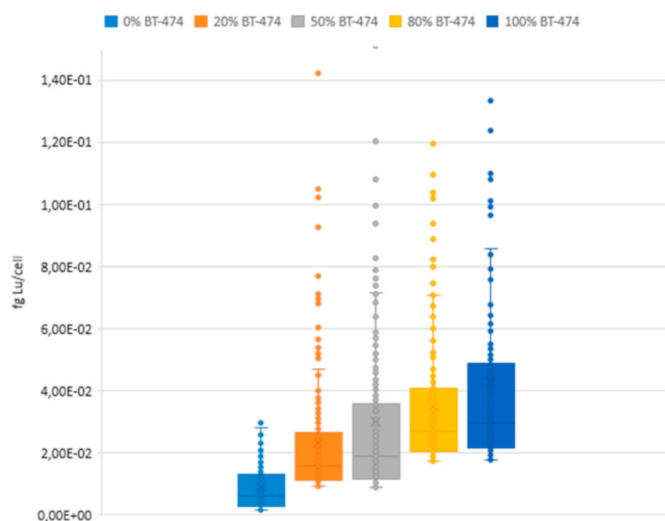


Fig. 5. Box plot of the Lu concentration found in individual cells corresponding to cell mixtures containing 0, 20, 50, 80 and 100 % BT-474 in MDA-MB-231.

Table 1

Extracted data from the box plot (Fig. 5) obtained for the different mixtures of BT-474 and MDA-MB-231 cells.

Sample	Median	Lower-upper quartile	Interquartile range
100 % BT-474	0.0297	0.0217–0.0489	0.0272
80 % BT-474	0.0271	0.0205–0.0408	0.0203
50 % BT-474	0.0188	0.0116–0.0358	0.0242
20 % BT-474	0.0157	0.0113–0.0267	0.0154
0 % BT-474	0.0058	0.0028–0.0129	0.0101

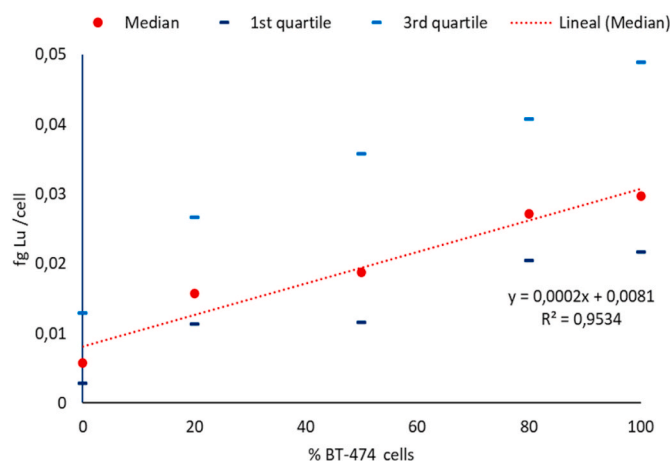


Fig. 6. Calibration graph obtained by plotting the median of every box plot of Fig. 5 and the corresponding 1st and 3rd quartiles versus the percentages of BT-474 cells in MDA-MB-231 cells.

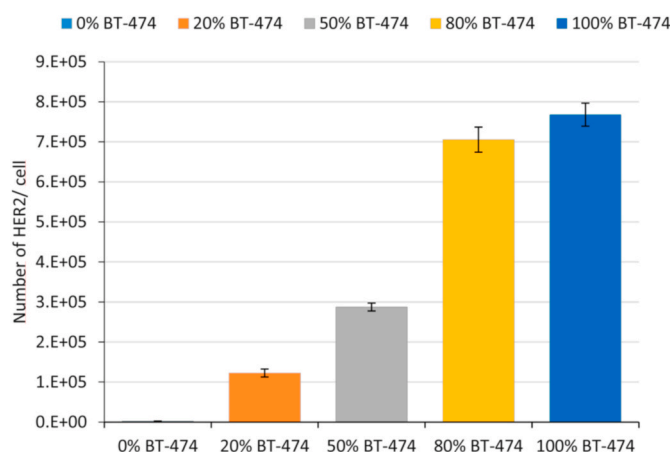


Fig. 7. Number of HER2 receptors per cell found in cell lysates by commercial ELISA and corresponding to cell mixtures containing 0, 20, 50, 80 and 100 % BT-474 cells in MDA-MB-231 cells.

surface, where it is biologically relevant.

4. Conclusions

The present work shows the possibility of targeting HER2 protein in complex cell populations through the complementary use of Lu-labelled antibodies and SC-ICP-MS strategies. The optimization of the amount of the labelled antibody was clearly cell-type dependent, confirming the selectivity of the labelling reaction towards HER2. In addition, two different markers can be sequentially detected within the same cell population, corresponding to two receptors differently expressed on the cell surface using different metal labels. The discrimination among cell types within complex mixtures is possible using the proposed strategy,

allowing the detection of a few HER2 positive cells within a majority of HER2 negative population. In comparison to the ELISA assay, the proposed SC-ICP-MS strategy provides the information about individual cells of the receptor present just at the cell surface, and that will be accessible to the treatment with anti-HER2 agents, which is the most used therapy for HER2 positive subtypes of tumors. The proposed methodology could serve to detect HER2 positive cells excised from biopsies in order to improve existing detection strategies.

Credit author statement

Alejandro Fernandez Asensio: experimental work, revision of the written text. Mario Corte Rodríguez: discussion of results, revision of the written text. Jörg Better: conceptual design, revision of the written text. L. Maria Sierra: revision of the written text. Elisa Blanco: conceptual designed, capture of funding, writing of the manuscript. Maria Montes Bayón: conceptual designed, capture of funding, writing of the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The financial support is gratefully acknowledged for the regional funding from the government of Asturias through the Science, Technology and Innovation Plan (PCTI) co-financed by FEDER funds (ref. FC-GRUPIN-IDI/2018/000242) and the grant of A.F.A. (PA-17-PF-BP16122). The funding from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) through projects PDI2019-104334RB-I00 and RTI2018-094605-B-I00 is also acknowledged. Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) is kindly acknowledged for the instrumental support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122773>.

References

- J.Y.S. Tsang, G.M. Tse, Molecular classification of breast cancer, *Adv. Anat. Pathol.* 27 (2020) 27–35, <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>.
- S. Loibl, L. Gianni, HER2-positive breast cancer, *Lancet* 389 (2017) 2415–2429, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).
- D.J. Slamon, G.M. Clark, S.G. Wong, W.J. Levin, A. Ullrich, W.L. McGuire, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* 235 (1987) 182–191, <https://doi.org/10.1126/science.3798106>.
- O.P. Kallioniemi, A. Kallioniemi, W. Kuisu, A. Thor, L.C. Chen, H.S. Smith, F. M. Waldman, D. Pinkel, J.W. Gray, ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 5321–5325, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5321>.
- S.H. Giordano, S. Temin, J.J. Kirshner, S. Chandrarapaty, J.R. Crews, N. E. Davidson, F.J. Esteva, A.M. Gonzalez-Angulo, I. Krop, J. Levinson, N.U. Lin, S. Modi, D.A. Patt, E.A. Perez, J. Perlmutter, N. Ramakrishna, E.P. Winer, Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 2078–2099, <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.0948>.
- A. Soni, Z. Ren, O. Hameed, D. Chanda, C.J. Morgan, G.P. Siegal, S. Wei, Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases, *Am. J. Clin. Pathol.* 143 (2015) 471–478, <https://doi.org/10.1309/AJCPYO5FSV3UPEXS>.
- S. Ahn, J.W. Woo, K. Lee, S.Y. Park, HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation, *J. Pathol. Transl. Med.* 54 (2020) 34–44, <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.11.03>.
- A. Nicolini, P. Ferrari, M.J. Duffy, Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: past, present and future, *Semin. Canc. Biol.* 52 (2018) 56–73, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.010>.
- C.L. Vogel, M.A. Cobleigh, D. Tripathy, J.C. Gutheil, L.N. Harris, L. Fehrenbacher, D.J. Slamon, M. Murphy, W.F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S.J. Stewart, M. Press, Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 719–726, <https://doi.org/10.1200/jco.2002.20.3.719>.
- N. Patani, L.A. Martin, M. Dowsett, Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective, *Int. J. Canc.* 133 (2013) 1–13, <https://doi.org/10.1002/ijc.27997>.
- C.B. Moelans, R.A. de Weger, E. van der Wall, P.J. van Diest, Current technologies for HER2 testing in breast cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80 (2011) 380–392, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.12.005>.
- D. Furrer, F. Sanschagrin, S. Jacob, C. Diorio, Advantages and disadvantages of technologies for HER2 testing in breast cancer specimens, *Am. J. Clin. Pathol.* 144 (2015) 686–703, <https://doi.org/10.1309/AJCP41TCBUEVDQC>.
- E.A. Perez, J. Cortés, A.M. Gonzalez-Angulo, J.M.S. Bartlett, HER2 testing: current status and future directions, *Canc. Treat Rev.* 40 (2014) 276–284, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.09.001>.
- A.M. Gown, Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer, *Mod. Pathol.* 21 (2008), <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.34>. S8–S15.
- M. Soares, R. Ribeiro, S. Najmudin, A. Gameiro, R. Rodrigues, F. Cardoso, F. Ferreira, Serum HER2 levels are increased in cats with mammary carcinomas and predict tissue HER2 status, *Oncotarget* 7 (2016) 17314–17326, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7551>.
- L. Lam, N. McAndrew, M. Yee, T. Fu, J.C. Tchou, H. Zhang, Challenges in the clinical utility of the serum test for HER2 ECD, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Canc.* 1826 (2012) 199–208, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.012>.
- F. Bahreini, A.R. Soltanian, P. Mehdipour, A meta-analysis on concordance between immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect HER2 gene overexpression in breast cancer, *Breast Cancer* 22 (2015) 615–625, <https://doi.org/10.1007/s12282-014-0528-0>.
- G. Zoppoli, A. Garuti, G. Cirmena, L.V. di Cantogno, C. Botta, M. Gallo, D. Ferraioli, E. Carminati, P. Baccini, M. Curto, P. Fregatti, E. Isnaldi, M. Lia, R. Murialdo, D. Friedman, A. Sapino, A. Ballestrero, Her2 assessment using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction reliably identifies Her2 overexpression without amplification in breast cancer cases, *J. Transl. Med.* 15 (2017) 91, <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1195-7>.
- D. Mouttet, M. Laé, M. Caly, D. Gentien, S. Carpentier, H. Peyro-Saint-Paul, A. Vincent-Salomon, R. Rouzier, B. Sigal-Zafrani, X. Sastre-Garau, F. Reyrol, Estrogen-receptor, progesterone-receptor and HER2 status determination in invasive breast cancer. Concordance between immuno-histochemistry and MapQuantTM microarray based assay, *PLoS One* 11 (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146474>.
- T. Fehm, S. Becker, S. Duerr-Stoerzer, K. Sotlar, V. Mueller, D. Wallwiener, N. Lane, E. Solomayer, J. Uhr, Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status, *Breast Cancer Res.* 9 (2007), <https://doi.org/10.1186/bcr1783>.
- T. Lozar, K. Gersak, M. Cemazar, C.G. Kuhar, T. Jesenko, The biology and clinical potential of circulating tumor cells, *Radiol. Oncol.* 53 (2019) 131–147, <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0024>.
- G. De Rubis, S. Rajeev Krishnan, M. Bebaawy, Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis, *Trends Pharmacol. Sci.* 40 (2019) 172–186, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.006>.
- M.H. Spitzer, G.P. Nolan, Mass cytometry: single cells, many features, *Cell* 165 (2016) 780–791, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>.
- D.E. Carvajal-Hausdorf, J. Patsenker, K.P. Stanton, F. Villarroel-Espindola, A. Esch, R.R. Montgomerly, A. Psyrri, K.T. Kalogeras, V. Kotoula, G. Foutzilas, K.A. Schalper, Y. Kluger, D.L. Rimm, Multiplexed (18-Plex) measurement of signaling targets and cytotoxic T cells in Trastuzumab-treated patients using imaging mass cytometry, *Clin. Canc. Res.* 25 (2019) 3054–3062, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2599>.
- C. Giesen, H.A.O. Wang, D. Schapiro, N. Zivanovic, A. Jacobs, B. Hattendorf, P. J. Schüffler, D. Grolimund, J.M. Buhmann, S. Brandt, Z. Varga, P.J. Wild, D. Günther, B. Bodenmiller, Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry, *Nat. Methods* 11 (2014) 417–422, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2869>.
- M. Corte Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.* 89 (2017) 11491–11497, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02746>.
- M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-González, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TFR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15532–15538, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03438>.
- M.S. Gee, R. Upadhyay, H. Bergquist, H. Alencar, F. Reynolds, M. Maricevich, R. Weissleder, L. Josephson, U. Mahmood, Human breast cancer tumor models: Molecular imaging of drug susceptibility and dosing during HER2/neu-targeted therapy, *Radiology* 248 (2008) 925–935, <https://doi.org/10.1148/radiol.2482071496>.
- Z. Liu, Y. Lee, J.H. Jang, Y. Li, X. Han, K. Yokoi, M. Ferrari, L. Zhou, L. Qin, Microfluidic cytometric analysis of cancer cell transportability and invasiveness, *Sci. Rep.* 5 (2015), <https://doi.org/10.1038/srep14272>.
- P.A. Kenny, G.Y. Lee, C.A. Myers, R.M. Neve, J.R. Semke, P.T. Spellman, K. Lorenz, E.H. Lee, M.H. Barcellos-Hoff, O.W. Petersen, J.W. Gray, M.J. Bissell, The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate

- with their profiles of gene expression, *Mol. Oncol.* 1 (2007) 84–96, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>.
- [31] A.M. Gown, L.C. Goldstein, T.S. Barry, S.J. Kussick, P.L. Kandalaf, P.M. Kim, C. C. Tse, High concordance between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization testing for HER2 status in breast cancer requires a normalized IHC scoring system, *Mod. Pathol.* 21 (2008) 1271–1277, <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.83>.
- [32] N. Takegawa, J. Tsurutani, H. Kawakami, K. Yonesaka, R. Kato, K. Haratani, H. Hayashi, M. Takeda, Y. Nonagase, O. Maenishi, K. Nakagawa, [fam-] trastuzumab deruxtecan, antitumor activity is dependent on HER2 expression level rather than on HER2 amplification, *Int. J. Canc.* 145 (2019) 3414–3424, <https://doi.org/10.1002/ijc.32408>.

