



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**Departamento de Química Física y Analítica**

Programa de Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural, y  
Modelización Computacional

**Estudio a nivel celular y supracelular de  
proteínas relacionadas con enfermedades  
neurodegenerativas empleando nuevos  
nanomarcadores y espectrometría de masas**

**TESIS DOCTORAL**

Ana Lores Padín

*Oviedo*

*2022*





UNIVERSITY OF OVIEDO

**Department of Physical and Analytical Chemistry**

Ph.D. Program: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización  
Computacional

**Study of proteins related to neurodegenerative  
diseases at cellular and supracellular level using new  
nano-labels and mass spectrometry**

**PhD. Thesis**

Ana Lores Padín

*Oviedo*

*2022*





Universidad de Oviedo

## AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2021/2022

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Lores Padín	Nombre: Ana	
DNI/Pasaporte/NIE: 77413682Y	Teléfono: 691608199	Correo electrónico: analorespadin@gmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Departamento de Química Física y Analítica	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio a nivel celular y supracelular de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas empleando nuevos nanomarcadores y espectrometría de masas	Inglés: Study of proteins related to neurodegenerative diseases at cellular and supracellular level using new nano-labels and mass spectrometry
Rama de conocimiento: Química Analítica	

3.- Autorización del Director/es y Tutor de la tesis	
D/D <sup>a</sup> : María Rosario Pereiro García	DNI/Pasaporte/NIE: 9359553-W
Departamento/Instituto: Departamento de Química Física y Analítica	
D/D <sup>a</sup> : Beatriz Fernández García	DNI/Pasaporte/NIE: 71636684-X
Departamento/Instituto/Institución: Departamento de Química Física y Analítica	
Autorización del Tutor de la tesis	
D/D <sup>a</sup> : Elisa Blanco González	DNI/Pasaporte/NIE: 10581314-A
Departamento/Instituto: Departamento de Química Física y Analítica	

Autoriza la presentación de la tesis doctoral en cumplimiento de lo establecido en el Art. 32 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Oviedo, 25 de mayo de 2022

Director/es de la Tesis

PEREIRO GARCIA  
PEREIRO GARCIA MARIA  
ROSARIO - 09359553W  
Fecha: 2022.05.26  
11:17:29 +02'00'

FERNANDEZ  
GARCIA BEATRIZ  
- 71636684X  
Fecha: 2022.05.26  
11:42:13 +02'00'

Tutor de la Tesis

BLANCO  
GONZALEZ ELISA  
- 10581314A  
Fecha: 2022.05.27  
18:31:17 +02'00'

Fdo.: María Rosario Pereiro García y Beatriz Fernández García

Fdo.: Elisa Blanco González

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL





## RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Año Académico: 2021/2022

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Lores Padín	Nombre: Ana	
DNI/Pasaporte/NIE: 77413682Y	Teléfono: 691608199	Correo electrónico: analorespadin@gmail.com

2.- Datos académicos	
Programa de Doctorado cursado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: Departamento de Química Física y Analítica	
Título definitivo de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio a nivel celular y supracelular de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas empleando nuevos nanomarcadores y espectrometría de masas	Inglés: Study of proteins related to neurodegenerative diseases at cellular and supracellular level using new nano-labels and mass spectrometry
Rama de conocimiento: Química Analítica	
Señale si procede: <input checked="" type="checkbox"/> Mención Internacional <input checked="" type="checkbox"/> Idioma de presentación de la Tesis distinto al español <input type="checkbox"/> Presentación como compendio de publicaciones	

3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica	
D/Dª: Elisa Blanco González	DNI/Pasaporte/NIE: 10581314-A
Departamento/Instituto: Departamento de Química Física y Analítica	

**Resolución:** La Comisión Académica del Programa de Doctorado **Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional**/El Departamento **Química Física y Analítica** en su reunión de fecha *30 de mayo*, acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.32.8 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 20 de julio de 2018 (BOPA del 9 de agosto de 2018)

Además, informa:

	Favorable	Desfavorable
• Mención Internacional	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Idioma	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
• Presentación como compendio de publicaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo

## Justificación

< Oviedo, 30 de mayo de 2022 >

Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado

Fdo.: Elisa Blanco González.

Contra la presente Resolución, podrá interponer recurso de alzada ante el Rectorado, en el plazo de un mes, a partir del día siguiente al de la presente notificación, de conformidad con el art. 122 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, de Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

Sra. Ana Lores Padín  
Sra. María Rosario Pereiro García  
Sra. Beatriz Fernández García  
Sr. Director del Centro Internacional de Postgrado



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio a nivel celular y supracelular de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas empleando nuevos nanomarcadores y espectrometría de masas	Inglés: Study of proteins related to neurodegenerative diseases at cellular and supracellular level using new nano-labels and mass spectrometry
2.- Autor	
Nombre: Ana Lores Padín	DNI/Pasaporte/NIE: 77413682-Y
Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

### RESUMEN (en español)

El estudio de proteínas implicadas en procesos biológicos es un campo de gran interés en bioquímica ya que cambios en los niveles de expresión o localización de ciertas biomoléculas puede ayudar a entender el origen y desarrollo de enfermedades. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) caracterizada por la pérdida de visión progresiva debido al deterioro del tejido de la retina, es la causa principal de ceguera en los mayores de 65 años. En este contexto, hay varias proteínas que juegan un papel importante de cara a la protección de la retina y que con el desarrollo de la enfermedad se ven alteradas. Sin embargo, en la actualidad, el estudio de estas biomoléculas está limitado por su baja concentración en las muestras biológicas (suero, tejidos y células) y su elevada variabilidad biológica (célula a célula). En esta línea, las técnicas de análisis tradicionalmente empleadas (i.e. inmunohistoquímica o ensayos ELISA), presentan limitaciones y se crea la necesidad de nuevas estrategias analíticas más sensibles y que permitan la cuantificación absoluta. Por ello, la presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de estrategias analíticas de cuantificación de proteínas relacionadas con la DMAE en diferentes tipos de muestras, empleando nanoclústeres metálicos como etiquetas de los anticuerpos específicos de las biomoléculas y detección mediante espectrometría de masas elemental, ICP-MS.

En el primer capítulo, se lleva a cabo la síntesis de nanoclústeres de platino (PtNCs) y se evalúa su uso como marcas para la detección bimodal de proteínas mediante un inmunoensayo competitivo en placa. Como prueba de concepto, los PtNCs son bioconjugados a anticuerpos específicos para determinar la Inmunoglobulina E (IgE), biomarcador de las enfermedades alérgicas, en muestras de suero humano de personas control. Se comparan los resultados obtenidos para la concentración de IgE empleando dos tipos de detección: fluorescente y elemental (ICP-MS). Finalmente se determina la IgE en 4 muestras de suero humano por MS y se validan los resultados con un kit ELISA comercial.

En el segundo capítulo, se estudia la distribución cuantitativa de tres proteínas relacionadas con la DMAE en secciones de tejidos oculares empleando la técnica de ablación láser (LA) acoplada al ICP-MS. Para la determinación de las proteínas metalotioneína 1/2 (MT1/2), factor H del complemento (CFH) y proteína precursora amiloide (APP) de manera simultánea en la misma sección de tejido, se usa una estrategia de marcaje múltiple empleando 3 nanoclústeres metálicos (AuNCs, AgNCs y PtNCs, respectivamente) como etiquetas elementales de los anticuerpos específicos de cada proteína. Se obtuvieron imaging



cuantitativo (i.e. intensidad) y cuantitativos (i.e. fg proteína) usando patrones de gelatina dopados con los 3 elementos como calibración matrix-matched y tras conocer la estequiometría de las inmunosondas (nº de NCs por Ab).

En el tercer capítulo se desarrolla una estrategia de cuantificación de dos proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en células individuales humanas del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv) empleando LA-ICP-MS. Se investigó una calibración basada en la obtención de patrones de laboratorio usando la misma línea celular que la muestra (HRPEsv) al ser suplementadas con suspensiones de concentraciones crecientes de AuNCs (HRPEsv@AuNCs). Se llevó a cabo un marcaje elemental con anticuerpos específicos etiquetados con AuNCs y fue posible estudiar cuantitativamente las alteraciones en los niveles de expresión de las dos proteínas relacionadas con la DMAE en células individuales sometidas a inflamación con interleuquina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) mediante LA-ICP-MS. Finalmente, los resultados de fg/célula de APOE y MT2A en las células HRPEsv control y tratadas con IL-1 $\alpha$  se corroboraron mediante kits de cuantificación ELISA comerciales y qPCR. Cabe destacar que la síntesis de los AuNCs a emplear con los cultivos celulares fue previamente optimizada con el objetivo de disminuir la desviación asociada a la dispersión de sus diámetros.

En el cuarto capítulo se lleva a cabo la cuantificación de MT2A y APOE en células individuales HRPEsv40 cultivadas y tratadas en las mismas condiciones que las descritas en el Capítulo III pero en este caso se miden células intactas y en suspensión líquida introducidas directamente en el ICP-MS haciendo uso del sistema de introducción de muestra single cell (sc) acoplado al ICP-MS. Conociendo la estequiometría de las inmunosondas fue posible determinar los fg de cada proteína por célula individual. Además, se midió la señal de 56Fe<sup>+</sup> como elemento constitutivo de las células HRPEsv para comprobar su integridad y confirmar el número de eventos celulares detectados. Los resultados se corroboraron con los kits comerciales de ELISA.

### RESUMEN (en Inglés)

The study of proteins involved in biological processes is a field of great interest in biochemistry since changes in the expression levels or localisation of certain biomolecules can help to understand the origin and development of diseases. Age-related macular degeneration (AMD), characterised by progressive vision loss due to the deterioration of retinal tissue, is the main cause of blindness in people over 65 years of age. In this context, several proteins that play an important role in protecting the retina show variations in their concentration levels that are related with the development of the disease. However, this study is not straightforward since is limited by several factors, such as the low concentration of proteins in biological samples (serum, tissues and, particularly, at cellular level) and their high biological variability (cell to cell). In this line, the analysis techniques traditionally used (i.e. immunohistochemistry or ELISA assays) have limitations and there is a need for new, more sensitive analytical strategies that allow absolute quantification. Therefore, this PhD Thesis is focused on the development of analytical strategies for the quantification of proteins related to AMD in different types of samples, using metal nanoclusters as labels for biomolecule-specific antibodies and detection by elemental mass spectrometry, ICP-MS.

**In the first chapter**, the synthesis of platinum nanoclusters (PtNCs) is carried out and their use as tags for the bimodal detection of proteins by means of a competitive plate immunoassay is evaluated. As a proof of concept, PtNCs are bioconjugated to specific antibodies to determine Immunoglobulin E (IgE), a biomarker of allergic diseases, in human serum samples from control individuals. The results obtained for IgE concentration are compared using two types of detection: fluorescent and elemental (ICP-MS). Finally, IgE is determined in 4 human serum samples by MS and the results are validated with a commercial ELISA kit.



**In the second chapter**, the quantitative distribution of three AMD-related proteins in ocular tissue sections is studied using the laser ablation (LA) technique coupled to ICP-MS. For the determination of metallothionein 1/2 (MT1/2), complement factor H (CFH) and amyloid precursor protein (APP) proteins simultaneously in the same tissue section, a multiple labelling strategy using 3 metal nanoclusters (AuNCs, AgNCs and PtNCs, respectively) as elemental labels for the protein-specific antibodies is used. Qualitative (i.e. intensity) and quantitative (i.e. protein fg) imaging were obtained using gelatin standards doped with the 3 elements as matrix-matched calibration and after knowing the stoichiometry of the immunoprobes (number of NCs per Ab).

**In the third chapter an innovative strategy was developed** for the quantification of two cytosolic proteins (APOE and MT2A) in single human retinal pigment epithelium (HRPEsv) cells using LA-ICP-MS. A calibration based on obtaining laboratory standards was investigated using the same cell line as the sample (HRPEsv) when supplemented with suspensions of increasing concentrations of AuNCs (HRPEsv@AuNCs). Elemental tagging with specific antibodies labelled with AuNCs was performed and it was possible to quantitatively study alterations in the expression levels of the two AMD-related proteins in individual cells subjected to interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) inflammation by LA-ICP-MS. Finally, the fg/cell results of APOE and MT2A in control and IL-1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells were corroborated by commercial ELISA quantification kits and qPCR. It should be noted that the synthesis of the AuNCs to be used with the cell cultures was previously optimised in order to reduce the deviation associated with the dispersion of their diameters.

**In the fourth chapter**, the quantification of MT2A and APOE in single HRPsv40 cells cultured and treated under the same conditions as described in Chapter III is carried out, but in this case intact cells in liquid suspension introduced directly into the ICP-MS using the single cell (sc) sample introduction system coupled to the ICP-MS are measured. Knowing the stoichiometry of the immunoprobes it was possible to determine the fg of each protein per individual cell. In addition, the  $^{56}\text{Fe}^+$  signal was measured as a constitutive element of the HRPEsv cells to check their integrity and confirm the number of cellular events detected. The results were corroborated with commercial ELISA kits.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL**



*“No hay barrera, cerradura ni cerrojo que puedas  
imponer a la libertad de mi mente”*

Virginia Woolf



Enfrentarse a un folio en blanco, es difícil. Y lo ha sido. Esa sensación de estar perdida al no saber ni por dónde empezar. Pero así es la vida, ¿no? Abrir una nueva hoja en blanco y comenzar a escribir, aunque sea duro al principio, cuando coges carrerilla y confías en ti, sale sólo. Ahora que toca el momento de cerrar etapas, qué difícil es resumir todo lo que me gustaría decir a todas esas personas que, durante estos años, han estado a mi lado, me han apoyado día tras día y han sabido sacar lo mejor de mí aun cuando yo pensaba que ya no podía más.

Desde que emprendí este camino, lejos -pero no mucho- de mi casa, UniOvi en particular y Asturias en general me han dado personas y momentos que estarán en mi corazón y en mi retina (jeje) para siempre.

No sé el porqué, pero desde el primer día que crucé el “pasillín de la Glow” para entrar en aquel laboratorio escondido, sabía que ese iba a ser mi hogar (y nunca mejor dicho, porque hubo días que solo me faltó poner una cama). Y así fue. Allí encontré a dos personas que me han apoyado incondicionalmente y que han confiado en mí, más que yo algunas veces, durante todo este trayecto. A mis directoras de tesis: Prof. Rosario Pereiro y Dra. Beatriz Fernández. GRACIAS. Sin vosotras y sin vuestra confianza no lo hubiese conseguido. Rosario, gracias por apostar y creer en mí, y por darme la oportunidad de crecer como científica a tu lado. ¡Ah! y por las fotos de cumple y esa vista privilegiada que encuentra una palabra mal escrita a km de distancia. Bea, gracias por estar SIEMPRE independientemente del problema, noticia o cotilleo. Gracias por cada palabra de ánimo y abrazo cuando las cosas se tuercen (no sabes lo que los voy a echar de menos). Y porque “pasito a pasito” se ven los obstáculos desde otra perspectiva. Gracias grillo de la suerte :).

I would also like to thank Prof. Spyros Pergantis for letting me join his research group at the University of Crete. Thank you so much for the kind welcome. I would also like to thank Manos, for introducing me to the single cell world, for his patience and for treating me like one of the others in the lab. To Tzortzina for being sooo nice, helpful, and kind to me and for her positive vibes “*Ana, everything is gonna be great*” when everything seemed hopeless (xD). To my dear Ioanna, my Greek soul mate. We have experienced so many things together in 3 months. Thank you for making Crete my home. How lucky I am to have met you! ευχαριστώ πολύ !

Volviendo a Asturias con un poco menos de sol, lluvia, tormenta eléctrica y 30 grados menos...

En aquel laboratorio escondido de la Glow, encontré al resto del grupo de las Quiminenas, que me acogieron con los brazos abiertos desde el principio: la pareja de la Guardia Civil, Rocío y Lara. María, gracias por haber sido mi guía y mi mentora en mis inicios en el lab. A ver, a mi Samarome, por encontrar siempre el mejor pack ahorro, en puntas, celo o en arroz con bacalao. A Rocío por ser la “titi” del abrazo preciso en el momento exacto. Y a Lara, la reina de los “cojo otro para el camino” ...lo que le gusta un dulce!

Pero ese pasillín no lo crucé sola (esto ya parece operación triunfo). No. Eva aka Longaniza de Avilés, siempre vino de la mano conmigo, y tan de la mano vino que acabamos a la vez (aaay el día del depósito). Gracias Eva por acompañarme, por ser la reina del meme y porque, aunque estos años han sido como una montaña rusa de emociones, al final, lo hemos logrado. Juntas. Sin embargo, con el paso de los años nuevas incorporaciones a la familia han iluminado la glow y mi vida. Martícolis o la niña de los “ay no sé” (jaja), la que con su cariño y su bondad te hace sentir que nunca estás sola. Gracias por aguantar mis “malhumores” y por escuchar todos mis arrebatos de ira jajaja. Paula, mi Pauli, la peque, pero sin lugar a dudas un ejemplo a seguir. No sé si somos gemelas mellizas o qué sé yo, pero ojalá ser tan fuerte y valiente como tú eres. Y mi Lauri (pseudoquiminenena), la culebrilla, la graciosa, la de los steakers inesperados y risilla diabólica. Si pudiese pedir un deseo sería que nuestras aventuras surferas, argayos caídos, vermús hasta las 6, rutas en moto...no se acabaran nunca. Eres el chute de energía cuando salta la alerta de low battery. **Gracias chicas por ser mi grupín.**

En los últimos tiempos, dos chicos rompieron la “traditione” femenina. Alejandro o el devorapuntas oficial del labo (xD). Gracias por alimentarnos a bizcochos cuando empezaste (desde que eres fitness no tres ninguno jaja). Y Jaime, el alma de la fiesta o el que en “cerocoma” se sabe hasta el grupo sanguíneo de Paco el del 3º. Llegaste para darnos alegría, está claro.

Un TUA F2 (siempre que llegues en tiempo a la parada) te lleva directa a la FIO, al laboratorio prometido. Sólo los elegidos y los que cogen bien el bus, llegan a él (jaja). Allí Héctor siempre está con su sonrisa permanente y su ayuda incondicional. No sé cómo te da la vida ni cómo agradecerte todo lo que has hecho por mí estos años, sin duda fuiste uno de mis pilares. Gracias a todo el labo L3, a Montse y todas sus enseñanzas sobre células, a Lydia y sus inmunos, a Enol y su ayuda en...todo, a Ana por su amabilidad y su disponibilidad siempre que la he necesitado y también a Ester, por su cariño.

También, me gustaría agradecer a los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. A la Unidad de Masas, porque fueron muchas las horas las horas vividas allí. Pero en especial a Marta (Unidad de Microscopía Fotónica y Proceso de imágenes) y a Marcos (Unidad de biotecnología y cultivos celulares) por la ayuda experimental y sabios consejos durante toda mi tesis.

A lo largo de estos años, mucha ha sido la gente que ha pasado por el departamento y que de una manera u otra han marcado mi paso por aquí. Los que estáis, los que ya no, y los que acabáis de llegar. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y, sobre todo, por los buenos momentos vividos. Las fiestas de grupo, los cumpleaños, las celebraciones de tesis, los congresos, las quedadas para llorar (jaja es broma), el descenso del sella, la casa rural...GRACIAS DE CORAZÓN sensores, proteómica, electrolatinos, electroquímica...pero, en especial...Borja, gracias por ser bondad y por ser incondicional. Javi, gracias hacer que siempre saque una sonrisa. Luibs por ser el punto clave de la noche ovetense y porque sin ti el Pandora no habrían sido lo mismo. Raquel por aceptarme como lo has hecho y por ser la mejor flatfriendmate ever. A Rober, por ser mi medio gallego favorito. A Clarissa por ser mi cómplice aquí y en la distancia, por hacerme pizza y por estropearme las puestas de sol (xD) pero sin duda, gracias por deleitarme con Pavarotti a las 8 de la mañana. A mi Joni, por ser la persona más cariñosa del mundo, mi apoyo indispensable y por lo afortunada que soy de tenerte a mi lado. A Clara, por ser la otra Tauro pasional (vaya dos jajaja), gracias por regalarme tu alegría. A mi Ali, por ser hogar, por hacer de Asturias mi casa y tu familia mi familia. A Paula Pérez, por aparecer en mi vida y querer quedarte. A Fran por su sabiduría. A Diego por su cariño en la distancia. A Diana, Di-Rex, mi mexicana, por confiar tanto en mi y porque junto con Mario y el diablo de Odín y toda la latin crew, estos años han sido maravillosos.

Si hay una persona a la que quiero agradecer por haber estado a mi lado siempre, aunque ahora me haya abandonado un poquito, es a Ramón. Desde el primer día de universidad allá por el 2012, en la USC se creó el team invencible Lorenzo-Lores. No puedo imaginarme estos años, la tesis y mi vida sino la hubiese compartido contigo. Los agobios, las fiestas, los panic attack, las cerves en PM, las gretas, nevir, los taxis a Gijón, la cuarentena...hemos vivido demasiadas aventuras ¡qué pena no haber podido acabar como se merecía esta etapa juntos! Pero qué bonito es ver crecer a la gente que quieres. Te echaré de menos siempre, pero sé que #siempre inseparables nunca separados, Mary&Moncho forever! Eres y serás siempre mi amigo del alma. Quérote infinito Monchi <3

He tenido mucha suerte de estar rodeada de gente maravillosa (UniOvi, Orquesta, Surf...) y no puedo estar más agradecida por ello. Una parte de mi corazoncito se quedará en Asturias para siempre.

Pero en Galicia teño o resto do meu corazón. Son unha morriñenta que vive fóra da súa terra. Mala combinación. Pero éche ben bonito sentir o cariño e o calor dos teus cada vez que volvo á casa. Teño moito que agradecer a cada unha desas persoas que me esperan sempre cos brazos abertos e cos ollos cheos de ledicia por volver me ver.

Grazas ás miñas nenas, ás Cochos, a Roci, Sonic, Uxía e Adri, porque sempre están e estarán, polo seu apoio e por crer en min. Por, aínda que ás veces é imposible, buscar calquera momento para poder abrazarnos sexa unha tarde enteira ou dous minutos antes de marchar. Á miña pandilla, a Pablo, Chaves, Pedrito, Andrea, Trini, Sara, Agus, Álvaro... á BUMM, á música. Ter amigos como os que eu teño fai que a distancia non sexa limitante. Grazas polos cafés, as cerves, os chiringos no verán, as tardes de Praia, pero sobretudo, obrigadísima polo voso cariño.

Grazas tamén á miña familia, aos padriños, a Ana...

Pero a quen realmente quero agradecer é aos meus pais, ao meu irmán e á miña querida abueliña. Eles, son as persoas que peor o pasan e polas que peor o paso ao estar lonxe. Saben que é por ben, que é por min e que isto me fai feliz (a veces máis que outras), pero tamén sei que eles pagarían millóns porque estivese máis preto. Eu tamén. Botar de menos é un sentimento ao que nunca se acostuma unha. Porque unha videochamada non quita a necesidade dun abrazo cando se necesita, nin dun bico, nin dun Pitufa

Papá, Mamá, Abu, Ro, GRACIAS por apoiarme en tódalas miñas decisións, por quererme como o facedes, porque cada vez que logro algo vai por vós. Esta tesis vai por vós, por todos eses momentos que a distancia non me permitiu comer o cocido do domingo xuntos ao caloriño da cociña de ferro. Quérovos.

Á miña abuela, polos seus abrazos cheos de amor que  
me dan alento para seguir cara adiante.



# ÍNDICE CONTENIDOS

---

ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XVII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XXXI
<b>A. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>A.1. BIOMOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS .....</b>	<b>3</b>
A.1.1. Estructura y fisiología del ojo.....	3
A.1.2. La degeneración macular asociada a la edad.....	7
A.1.2.1. Proteínas de interés y su relación con la DMAE .....	11
<b>A.2. MÉTODOS TRADICIONALMENTE EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>15</b>
A.2.1. Métodos espectrofotométricos .....	15
A.2.2. Métodos basados en el empleo de anticuerpos específicos.....	17
A.2.2.1. Aspectos generales .....	18
A.2.2.2. Inmunoensayos tipo ELISA.....	20
A.2.2.3. Western blot.....	23
A.2.2.4. Metodologías de <i>imaging</i> convencional: Inmunohistoquímica /Immunocitoquímica e inmunofluorescencia .....	25
<b>A.3. ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL .....</b>	<b>31</b>
A.3.1. Detección elemental empleando ICP-MS.....	32
A.3.1.1. Aspectos generales .....	32

A.3.1.2. ICP-MS como herramienta para la detección elemental e isotópica en el estudio de enfermedades .....	34
A.3.2. Determinación de biomoléculas mediante ICP-MS: estrategias de marcaje	36
A.3.2.1. Etiquetas metálicas empleadas para detección de proteínas por ICP-MS .....	39
A.3.2.2. Nanopartículas metálicas como etiquetas elementales.....	42
A.3.2.3. Estrategias de purificación y caracterización de NPs.....	44
A.3.2.4. Estrategias de bioconjugación de NPs .....	45
A.3.2.5. Caracterización de la inmunosonda metálica .....	47
A.3.2.6. Empleo de las NPs como marcas de inmunosondas: aplicaciones para la determinación de proteínas .....	48
A.3.2.7. Los nanoclústeres metálicos.....	50
<b>A.4. ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS EN CÉLULAS INDIVIDUALES Y SECCIONES DE TEJIDOS EMPLEANDO MNCs Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL .....</b>	<b>58</b>
A.4.1. Análisis de células individuales mediante ICP-MS .....	58
A.4.1.1. Influencia de la heterogeneidad celular en el análisis de células individuales .....	59
A.4.1.2. Características generales de la técnica de <i>single cell</i> -ICP-MS .....	60
A.4.1.3. Determinación de proteínas mediante <i>sc</i> -ICP-MS.....	64
A.4.2. Análisis con resolución espacial empleando espectrometría de masas elemental .....	67
A.4.2.1. Estudios de <i>imaging</i> empleando ablación láser ICP-MS .....	70
A.4.2.2. Estrategias de cuantificación por LA-ICP-MS.....	72
<b>B. OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
<b>C. EXPERIMENTAL GENERAL.....</b>	<b>85</b>

<b>C.1. INSTRUMENTACIÓN .....</b>	<b>87</b>
C.1.1. Instrumentación empleada en la caracterización de los MNCs .....	87
C.1.1.1. Dispersión dinámica de la luz .....	87
C.1.1.2. Medidas por espectroscopía.....	89
C.1.1.3. Microscopía electrónica: HR-TEM y EDX.....	90
C.1.2. Instrumentación empleada para la detección de las inmunosondas por MS y fluorescencia.....	91
C.1.2.1. Espectrometría de masas elemental: ICP-MS .....	91
C.1.2.2. Sistemas de ablación laser .....	96
C.1.2.3. Microscopía confocal.....	98
C.1.3. Instrumentación general.....	100
<b>C.2. MATERIALES Y REACTIVOS .....</b>	<b>102</b>
C.2.1. Material general.....	102
C.2.1.1. Material empleado en los cultivos celulares.....	102
C.2.2. Reactivos generales .....	103
C.2.2.1. Reactivos para la síntesis de las inmunosondas metálicas .....	103
C.2.2.2. Reactivos para los análisis por ICP-MS y LA-ICP-MS .....	104
C.2.2.3. Reactivos empleados en los cultivos celulares .....	105
C.2.2.4. Reactivos empleados en inmunoensayos, IHC e ICC .....	106
<b>C.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS .....</b>	<b>106</b>
<b>C.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>108</b>
C.4.1. Síntesis de MNCs solubles en agua mediante una estrategia <i>bottom-up</i> . ...	108
C.4.1.1. Protocolo de purificación de los MNCs por ultracentrifugación .....	111
C.4.1.2. Almacenamiento de los MNCs .....	111
C.4.2. Digestión ácida de los MNCs para su detección por ICP-MS.....	112
C.4.3. Caracterización de los MNCs.....	113
C.4.3.1. Caracterización óptica.....	114
C.4.3.2. Caracterización morfológica y estructural .....	114

C.4.3.3. Análisis por ICP-MS: rendimiento de la síntesis & concentración de los MNCs .....	116
C.4.4. Síntesis de las inmunosondas metálicas: estrategia de bioconjugación mediante el enlace de la carbodiimida .....	117
C.4.5. Caracterización de las inmunosondas metálicas: cálculo del factor de amplificación .....	118
C.4.6. Protocolo de desparafinación de los tejidos FFPE .....	120
C.4.7. Protocolos de cultivo y tratamiento de la línea celular HRPEsv40 .....	121
C.4.7.1. Descongelación y expansión de la línea celular .....	121
C.4.7.2. Conteo celular manual con el hemocitómetro .....	122
C.4.7.3. Tratamiento inflamatorio de las células HRPEsv40 .....	123
C.4.8. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa .....	124
<b>D. CAPÍTULO I .....</b>	<b>125</b>
<b>D.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>127</b>
<b>D.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>135</b>
<b>D.3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>136</b>
D.3.1. Materiales y reactivos .....	136
D.3.2. Instrumentación .....	137
D.3.3. Procedimientos experimentales .....	138
D.3.3.1. Síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs .....	138
D.3.3.2. Optimización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs .....	139
D.3.3.3. Inmunoensayo ELISA competitivo .....	141
D.3.3.4. Determinación de IgE en muestras de suero humano .....	143
<b>D.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>144</b>
D.4.1. Síntesis y caracterización de PtNCs fluorescentes .....	144
D.4.2. Caracterización espectroscópica de los PtNCs .....	145
D.4.3. Optimización de la síntesis de PtNCs .....	147
D.4.4. Caracterización estructural de los PtNCs .....	152

D.4.5. Cálculo de la concentración de PtNCs en disolución .....	155
D.4.6. Estudios de estabilidad de los PtNCs .....	157
D.4.7. Estudio y elección de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs .....	160
D.4.8. Determinación de IgE mediante un inmunoensayo competitivo en placa basado en la detección bimodal de PtNCs.....	164
<b>D.5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>170</b>
<b>E. CAPÍTULO II .....</b>	<b>173</b>
<b>E.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>175</b>
<b>E.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>180</b>
<b>E.3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>181</b>
E.3.1. Materiales y reactivos.....	181
E.3.1.1. Síntesis y caracterización de las inmunosondas metálicas.....	181
E.3.2. Instrumentación .....	183
E.3.3. Procedimientos experimentales .....	185
E.3.3.1. Síntesis de los MNCs (PtNCs, AuNCs, y AgNCs) .....	185
E.3.3.2. Síntesis y bloqueo de las inmunosondas metálicas.....	185
E.3.3.3. Caracterización de las inmunosondas .....	187
E.3.3.4. Protocolos para los inmunoensayos en tejidos empleando las inmunosondas marcadas con MNCs o fluoróforos .....	187
E.3.3.5. <i>Imaging</i> de proteínas en secciones de tejido ocular mediante LA-ICP-MS .....	192
<b>E.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>195</b>
E.4.1. Optimización de los procedimientos de bioconjugación e IHC utilizando PtNCs como marca.....	195
E.4.2. <i>Imaging</i> de proteínas en tejidos oculares por LA-ICP-MS empleando PtNCs como marca elemental.....	197

E.4.3. Microarrays de expresión de las proteínas y estudios por inmunofluorescencia empleando Fluor Alexa® .....	199
E.4.4. Optimización de las condiciones para el <i>imaging</i> múltiple de proteínas por LA-ICP-MS.....	203
E.4.4.1. Optimización del método de adquisición del ICP-MS .....	204
E.4.4.2. Optimización de los parámetros de ablación .....	205
E.4.5. <i>Imaging</i> múltiple de proteínas en secciones de ojo humano .....	210
E.4.5.1. Caracterización de las inmunosondas .....	210
E.4.5.2. Caracterización de los patrones de laboratorio de gelatina .....	214
E.4.5.3. Estudio sobre la penetración de la inmunosonda en las secciones de tejido .....	216
E.4.5.4. <i>Imaging</i> en concentración de proteína por LA-ICP-MS .....	218
<b>E.5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>222</b>
<b>F. CAPÍTULO III .....</b>	<b>225</b>
<b>F.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>227</b>
<b>F.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>231</b>
<b>F.3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>233</b>
F.3.1. Materiales y reactivos .....	233
F.3.1.1. Síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas.....	233
F.3.1.2. Cultivo y expansión de la línea celular y tratamientos inflamatorios de las células.....	234
F.3.1.3. Protocolos de inmunocitoquímica.....	234
F.3.1.4. Análisis mediante RT-qPCR.....	234
F.3.1.5. Kits ELISA cuantitativos para la MT2A y APOE.....	235
F.3.2. Instrumentación.....	235
F.3.3. Procedimientos experimentales.....	237
F.3.3.1. Protocolo para la síntesis de AuNCs monodispersos .....	237
F.3.3.2. Síntesis y caracterización de las inmunosondas .....	238

F.3.3.3. Cultivo de células HRPEsv40 y tratamientos inflamatorios .....	239
F.3.3.4. Preparación de las células HRPEsv40 para RT-qPCR .....	241
F.3.3.5. Preparación de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante inmunoensayo ELISA.....	242
F.3.3.6. Preparación de las células HRPEsv40 para ICC.....	243
F.3.3.7. Protocolo de ICC para la inmunolocalización de APOE y MT2A en células HRPEsv40 fijadas.....	244
F.3.3.8. <i>Imaging</i> de proteínas en células individuales mediante LA-ICP-MS.....	247
F.3.3.9. Preparación de los patrones de calibración unicelulares (HRPEsv40@AuNCs) .....	248
<b>F.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>251</b>
F.4.1. Síntesis de AuNCs monodispersos .....	251
F.4.1.1. Evaluación del índice de polidispersidad (PDI).....	251
F.4.1.2. Caracterización estructural de los AuNCs@LA y AuNCs@DHHLA ....	253
F.4.1.3. Caracterización elemental de los AuNCs@LA y AuNCs@DHHLA por ICP-MS .....	254
F.4.2. Elección del tratamiento inflamatorio para las células HRPEsv40: análisis RT-qPCR y ELISA .....	255
F.4.2.1. Análisis de la expresión genética por RT-qPCR (APOE y MT2A) .....	256
F.4.2.2. Determinación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 por ELISA.	258
F.4.3. Optimizaciones previas del ensayo ICC para la detección de APOE y MT2A .....	260
F.4.3.1. Caracterización de las inmunosondas Anti-h-APOE: AuNCs y Anti-h- MT2A: AuNCs .....	260
F.4.3.2. Optimización la concentración de los anticuerpos primarios.....	261
F.4.3.3. Evaluación de la penetración de la inmunosonda en las células por microscopía confocal.....	264
F.4.4. Inmunolocalización de las proteínas citosólicas en células HRPEsv40 individuales mediante LA-ICP-MS.....	268

F.4.5. Desarrollo de una nueva estrategia de cuantificación <i>matrix-matched</i> para determinar proteínas en células por LA-ICP-MS .....	273
F.4.6. Cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 mediante LA-ICP-MS utilizando patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs .....	279
<b>F.5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>285</b>
<b>G. CAPÍTULO IV .....</b>	<b>289</b>
<b>G.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>291</b>
<b>G.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>295</b>
<b>G.3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>297</b>
G.3.1. Materiales y reactivos .....	297
G.3.1.1. Síntesis de las inmunosondas metálicas: Anti-h-APOE: AuNCs y Anti-h-MT2A: AuNCs .....	297
G.3.1.2. Expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular e inmunoensayo de las células en suspensión .....	297
G.3.1.3. Reactivos para el análisis por <i>single cell</i> -ICP-MS.....	298
G.3.2. Instrumentación.....	298
G.3.3. Procedimientos experimentales.....	299
G.3.3.1. Preparación de las células HRPEsv40 en suspensión .....	299
G.3.3.2. Protocolo de inmunoensayo en células HRPEsv40 en suspensión empleando inmunosondas con AuNCs .....	302
G.3.3.3. Análisis por sc-ICP-MS y procesamiento de los datos.....	303
<b>G.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>307</b>
G.4.1. Preparación de la muestra para la detección de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS .....	307
G.4.1.1. Monitorización de un elemento intrínseco de las células HRPEsv40.	307
G.4.1.2. Protocolo para la fijación de las células HRPEsv40 .....	309

G.4.1.3. Optimización del inmunoensayo para la detección de proteínas empleando AuNCs como marca elemental .....	310
G.4.1.4. Configuración del sistema de introducción de muestra.....	313
G.4.2. Selección del tiempo de adquisición en el ICP-MS .....	315
G.4.3. Optimización de la dilución de la muestra para el análisis de células HRPEsc40 por sc-ICP-MS.....	316
G.4.4. Tratamiento de los datos: criterios para la discriminación de eventos celulares siguiendo las señales de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ .....	319
G.4.5. Determinación de APOE y MT2A en células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs: células CT y tratadas con IL1 $\alpha$ .....	322
G.4.5.1. Determinación de MT2A en células HRPEsv40 .....	322
G.4.5.2. Determinación de APOE en células HRPEsv40.....	326
<b>G.5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>331</b>
<b>H. CONCLUSIONES GENERALES/ <i>GENERAL</i></b>	
<b><i>CONCLUSIONS</i>.....</b>	<b>333</b>
<b>I. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS/ SUGGESTIONS FOR FURTHER RESEARCH .....</b>	
	<b>343</b>
<b>J. ANEXO 1: PUBLICACIONES DERIVADAS .....</b>	
	<b>349</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

### A

---

**Ab:** Anticuerpo, *antibody*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AEC:** 3-Amino-9-etilcarbazol

**AF4:** Fraccionamiento asimétrico por campo de flujo, *asymetric flow field flow fractionation*

**AgNCs:** Nanoclústeres de plata, *silver nanoclusters*

**AL:** Ácido lipoico

**AP:** Fosfatasa alcalina, *alkaline phosphatase*

**APP:** Proteína precursora del amiloide, *amyloid precursor protein*

**APOE:** Apolipoproteína E, *apolipoprotein E*

**ARN:** Ácido ribonucleico

**AuNCs:** Nanoclústeres de oro, *gold nanoclusters*

### B

---

**BCA:** Ácido bicincóninico

**BSA:** Albúmina de suero bovino, *Bovine serum albumin*

**BrM:** Membrana de Bruch

### C

---

**CB:** Cuerpos ciliares, *ciliary bodies*

**CFH:** Factor H del complemento

**Cps:** Cuentas por segundo

**CT:** Control celular (i.e. células sin tratamiento)

## D

---

**DAB:** Diaminobencidina

**DCI:** *Dual concentric injection*

**DHLA:** Ácido dihidrolipoico, *dihydrolipoic acid*

**DMAE:** Degeneración macular asociada a la edad

**DMENF12:** Medio de cultivo celular rico en suero: Dulbecco's modified eagle medium con mezcla de nutrientes F-12

**DLS:** Dispersión de luz dinámica, *Dynamic lighth scattering*

**DOTA:** Ácido 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano-tetraacético, *1,4,7,10-Tetraaza-cyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid*

**DTPA:** Ácido dietilentriaminopentaacético, *Diethylenetriaminepentaacetic acid*

## E

---

**EDC:** 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

**EDX:** Espectroscopía de rayos X, *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*

**ELISA:** Ensayo inmunoenzimático, *enzyme-linked immunosorbent assay*.

**EPR:** Epitelio pigmentario de la retina

**ESI:** *Electrospray*

## F

---

**FBSi:** Suero fetal bovino (inactivado), *Fetal Bovine Serum (inactivated)*

**FCC:** Cúbica centrada en las caras, *face-centered cubic*

**FR:** Fotorreceptores

**FFPE:** Muestra fijada con formandehído y embebida en parafina, *Formalin-fixed paraffin-embedded*

## G

---

**GC:** Células ganglionares, *ganglionar cells*

**GSH:** Glutación

## H

---

**HRP:** Peroxidasa de rábano picante, *horse radish peroxidase*.

**HRPEsv40:** Línea celular *human retinal pigmented epithelium* inmortalizada con el virus sv40.

**HRPEsv40@AuNCs:** Patrones de calibración unicelulares para cuantificación por LA-ICP-MS; línea celular HRPEsv40 suplementada con disoluciones de AuNCs

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución, *high performance liquid chromatography*

## I

---

**ICC:** Inmunocitoquímica

**ICP-MS:** Plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (*Inductively coupled plasma mass spectrometry*)

**ICP-MS/MS:** Plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas en tándem

**IF:** Inmunofluorescencia

**Ig:** Inmunoglobulina

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IHC:** Inmunohistoquímica

**IL1 $\alpha$ :** Interleuquina-1 $\alpha$

**IMS:** *Imaging* por espectrometría de masas (*imaging mass spectrometry*)

**INL:** Capa nuclear interna, *inner nuclear layer*

**IPL:** Capa plexiforme interna, *inner plexiform layer*.

**IVA:** Modo circular de haz de ablación, *infinitely variable aperture*

## L

---

**LA:** Ablación láser, *laser ablation*.

**Ln:** Lantánidos

**LOD:** Límite de detección

## M

---

**MALDI:** Ionización por desorción láser asistida por matriz (*Matrix assisted laser desorption ionization*)

**MNCs:** Nanoclústeres metálicos, *metal nanoclusters*.

**MNPs:** Nanopartícula(s) metálica(s)

**MT1/2:** Metalotioneína isoformas 1 y 2

**MT2A:** Metalotioneína isoforma 2, denominada 2A

## N

---

**NBT/BCIP:** Cloruro de nitroazul de tetrazolio /5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

**NCs:** Nanoclústeres

**NPs:** Nanopartículas

## O

---

**ONL:** Capa nuclear externa, *outer nuclear layer*

**OPL:** Capa plexiforme externa, *outer plexiform layer*

## P

---

**PDI:** Índice de polidispersidad

**PEI:** Polietilimina

**PFA:** Paraformaldehído

**PtNCs:** Nanoclústeres de platino

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno

**PSA:** Antígeno prostático específico

## Q

---

**QDs:** Puntos cuánticos, *quantum dots*

## R

---

**R:** Radio

**RT-qPCR:** Análisis cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción inversa.

## S

---

**SA:** Estreptavidina

**SAED:** Difracción electrónica de área seleccionada

**sc-ICP-MS:** *single cell-ICP-MS*

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

**SIMS:** *Secondary ion mass spectrometry*

**sp-ICP-MS:** *single particle-ICP-MS*

## T

---

**TEM:** Microscopía de transmisión electrónica

**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**TOF:** Tiempo de vuelo, *time of flight*

**TSH:** Hormona estimulante de la tiroides

## U

---

**UCNPs:** Nanopartículas de conversión ascendente

**UV/Vis:** Ultravioleta visible

## V

---

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

## W

---

**WB:** *Western blot*

## X

---

**XYR:** Modo de ablación rectangular del haz láser, *rotating XY*

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1:** Esquema de la anatomía del ojo humano donde se muestra un corte transversal del globo ocular y una ampliación de la zona anterior del ojo (esquema hecho con Biorender.com)..... 4
- Figura 2:** Estructura de las capas celulares de la retina (esquema hecho con BioRender.com)..... 5
- Figura 3:** Campo visual de una persona sin patologías oculares (imagen izquierda) y visión de los pacientes con DMAE (imagen derecha)..... 7
- Figura 4:** Esquema resumen de las manifestaciones y tipos de DMAE resultantes del avance de la enfermedad que implica el deterioro y muerte celular de la región fotorreceptores-EPR-MBr-coroides (esquema hecho con BioRender.com)..... 9
- Figura 5:** Esquema de la patogénesis de la DMAE y su relación con las proteínas APOE, MT2, APP y CFH. Esquema adaptado de la ref.16 ..... 13
- Figura 6:** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia tras el etiquetado inmunohistoquímico con anticuerpos específicos de proteínas que identifican acumulación en las drusas (círculos de hidroxapatita en violeta) de: a) proteína APP (rojo) y CFH (verde), c) mezcla de las imágenes: rojo (APP), verde (CFH) y amarillo que corresponde a otra proteína, la vitronectina. (Barras de escala: 2  $\mu$ m). Imagen adaptada de la ref 24. .... 15
- Figura 7:** Estructura de una inmunoglobulina G, anticuerpo típicamente empleado en estrategias basadas en la reacción antígeno-anticuerpo. .... 19
- Figura 8:** Esquemas de los diferentes tipos de inmunoensayos ELISA. a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA tipo sándwich, y d) ELISA competitivo (esquema hecho con Biorender.com). .... 21
- Figura 9:** Esquemas de los protocolos habitualmente empleados en IHC según el tipo de marcaje. a) IHC convencional empleando cromógenos, y b) inmunofluorescencia. .... 26
- Figura 10:** Fluoróforos empleados en IHC por IF. a) Línea temporal de los distintos fluoróforos empleados en IF (y citometría de flujo). Abreviaturas de las moléculas orgánicas de gran tamaño que poseen varios fluorocromos: phycoerytrin (PE), allophycocyanin (AP) – imagen adaptada de la ref , y b) Espectros de emisión de los fluoróforos Alexa Fluor® - imagen adaptada de la ref ..... 29
- Figura 11:** Ejemplos de imaging empleando etiquetas fluorescentes para la identificación de proteínas en células mediante inmunofluorescencia. En la imagen a) adaptada de la ref. se emplean dos marcas Alexa Fluor® 488 y 647 para detectar un biomarcador cis-golgi (GM130) en células HeLa (en rojo, Alexa® 647) y la  $\alpha$ -tubulina (en verde, Alexa® 488). En la imagen b) adaptada de la ref.52 se emplean diferentes QDs (emisión a 565, 605, y 655 nm siendo la detección verde, amarilla y roja,

respectivamente) para identificar 3 biomarcadores diferentes en linfoblastos (fosfo TDP, TDP-43 y  $\alpha$ -tubulina). .....30

**Figura 12:** Esquema de las etapas de la estrategia analítica de marcaje a seguir con una inmunosonda para la determinación de biomoléculas por ICP-MS: (I) preparación de la inmunosonda metálica, (II) reacción de reconocimiento de la proteína, y (III) posibilidades de detección por ICP-MS.....38

**Figura 13:** Estructuras de los compuestos quelantes de metales más comúnmente empleados en aplicaciones de detección de biomoléculas por ICP-MS: a) DTPA, b) polímero formado por unidades de DTPA comercialmente distribuido como MAXPAR® y c) DOTA.....42

**Figura 14:** Resumen de diferentes aproximaciones de etiquetado de anticuerpos con NPs metálicas. ....46

**Figura 15:** Esquema de las bandas de energía típicas en NPs metálicas y NCs, donde se observa cómo al reducir su tamaño se produce la creación de los niveles de energía discretos. ....51

**Figura 16:** Esquema resumen donde se muestran las diferentes estrategias que se pueden seguir para la síntesis de MNCs. ....54

**Figura 17:** Tipos de moléculas empleadas como agentes estabilizantes en la síntesis de MNCs.....55

**Figura 18:** Esquema de los dos tipos de estrategias que se pueden realizar para determinar el contenido de un analito en un cultivo celular mediante ICP-MS. En la parte superior se indica el procedimiento a seguir para conocer el contenido total promedio del analito en la población celular, mientras que en la parte inferior se muestra el tipo de información que se obtiene célula a célula. ....59

**Figura 19:** Esquema general donde se muestra comparativamente cómo son los análisis por ICP-MS con nebulización convencional y single cell-ICP-MS. En la imagen superior se muestra la intensidad obtenida al analizar una disolución homogénea del analito (Neb. conv.-ICP-MS) frente al análisis mediante sc-ICP-MS de células individuales de una suspensión celular que se muestra en la imagen inferior. ....62

**Figura 20:** Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al.<sup>171</sup> .....67

**Figura 21:** Esquema de la configuración de un sistema láser acoplado a ICP-MS.....70

**Figura 22:** Flujo de trabajo de la técnica de imaging empleando LA-CyTOF™. Imagen adaptada de la referencia Giensen et al.<sup>199</sup> .....79

**Figura 23:** Sistema de introducción de muestra para sc-ICP-MS. En la imagen se muestra el nebulizador de bajo volumen de Meinhard®, y una cámara de nebulización concéntrica Asperon® de consumo total de Perkin-Elmer. ....94

<b>Figura 24:</b> Esquema de un sistema ICP-MS de sector magnético.....	95
<b>Figura 25:</b> Esquema general de la síntesis de MNCs siguiendo la estrategia bottom-up. En el ejemplo se emplea el ácido lipoico como ligando tiolado y agente estabilizante.....	109
<b>Figura 26:</b> Esquema de las etapas requeridas para la síntesis de AuNCs, AgNCs y PtNCs.....	111
<b>Figura 27:</b> Esquema general de la reacción de la carbodiimida para establecer un enlace amida entre el grupo carboxílico de los MNCs y el grupo amino del Ab (esquema modificado de la ref. 16).....	117
<b>Figura 28:</b> Esquema donde se resumen las diferentes etapas del inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo diseñado para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas metálicas (Anti-h-Ab:MNCs).....	120
<b>Figura 29:</b> Esquema de los cuadrantes de la cámara Neubauer y explicación del cálculo de la concentración celular. ....	123
<b>Figura 30:</b> Esquema del mecanismo de hipersensibilidad tipo I por el que se desencadena una reacción alérgica mediada por la IgE, siendo este el biomarcador. Cuando un individuo está en presencia del alérgeno se produce un aumento en la producción (concentración) de IgE.....	132
<b>Figura 31:</b> Estudio para optimizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs. Esquema de las etapas del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto para evaluar la pérdida de funcionalidad del Ab específico al ser bioconjugado con diferentes relaciones molares de PtNCs.....	140
<b>Figura 32:</b> Esquema de las etapas del inmunoensayo competitivo empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs para la detección directa de la IgE por microscopía de fluorescencia láser confocal. ....	142
<b>Figura 33:</b> Esquema donde se recoge cómo es la última etapa del protocolo experimental para el inmunoensayo con detección por MS elemental. En la imagen se muestra cómo es la recogida y digestión de la muestra para su análisis por ICP-MS con nebulización convencional. ....	143
<b>Figura 34:</b> Caracterización espectroscópica de la síntesis de PtNCs. a) Espectros de absorbancia de los reactivos utilizados para la síntesis de los PtNCs, así como de la suspensión de PtNCs sintetiza (línea negra continua: PtNCs, línea negra punteada: $H_2PtCl_6$ , y línea gris continua: ácido lipoico). Todos los reactivos han sido diluidos 1:6 en agua desionizada para llevar a cabo las medidas, b) Espectros de fluorescencia molecular característicos obtenidos para los PtNCs, y c) Fotografía de las disoluciones de síntesis tras 15 h de reacción, al inicio de la síntesis (0 h), y blanco de síntesis. ....	147
<b>Figura 35:</b> Efecto del tiempo de síntesis en la señal de fluorescencia de los PtNCs para una relación molar Pt:AL:NaBH <sub>4</sub> de 1:5:1 (intensidades normalizadas; dando el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima obtenida para 13 h). Las	

incertidumbres representan la desviación estándar de la media de tres medidas de tres síntesis diferentes de PtNCs. .... 149

**Figura 36:** Emisión fluorescente de los PtNCs sintetizados con diferentes volúmenes de NaOH (2 M) añadido a la mezcla de síntesis. Para fines comparativos, la fluorescencia se midió al mismo pH (pH final 3) para las tres síntesis.  $\lambda_{\text{ex}}=455$  nm. .... 150

**Figura 37:** Histogramas obtenidos a partir de las imágenes por HR-TEM de las suspensiones coloidales de PtNCs sintetizados donde se muestra la distribución del diámetro empleando: (a) 20  $\mu\text{L}$  de NaOH, y (b) 30  $\mu\text{L}$  de NaOH. Los diámetros han sido medidos con el software Fiji-ImageJ. .... 153

**Figura 38:** Imágenes obtenidas para la caracterización estructural de los PtNCs sintetizados empleando 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2M, a) imagen de HR-TEM (10 nm de escala), b) Imagen de HR-TEM (5 nm de escala), c) gráfico EDX con la composición elemental, d) patrón SAED, e) zoom de la imagen de HR-TEM donde se observan los planos atómicos de la estructura cristalina (d-spacing), y f) representación teórica de la estructura cristalina FCC y cálculo del número de átomos por celda unidad. .... 155

**Figura 39:** Gráficas donde se puede observar la influencia del pH en la emisión fluorescente y estabilidad de los PtNCs sintetizados y purificados. a) Influencia del pH en la fluorescencia de los PtNCs, y b) Medidas del potencial-Z (medida indirecta de la estabilidad de los PtNCs) a los diferentes valores de pH. Las barras de error en la figura a) representan la desviación estándar de tres medidas de fluorescencia para tres síntesis de PtNCs diferentes. .... 158

**Figura 40:** Gráfico comparativo de la fluorescencia medida a 620 nm para las suspensiones de PtNCs purificadas y almacenadas en diferentes condiciones a lo largo de tres meses. TA= temperatura ambiente. .... 159

**Figura 41:** Gráfico de la evolución de la emisión fluorescente de los PtNCs (620 nm) monitorizada durante 2 h (7200 s) con excitación constante a 455 nm. 160

**Figura 42:** Estudio de la funcionalidad de la inmunosonda con las diferentes relaciones molares ensayadas Ab:PtNCs (1:0-1:50) mediante la medida de la absorbancia a 450 nm para el producto resultante tras el revelado colorimétrico del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de medida para cada relación molar. .... 161

**Figura 43:** Caracterización fluorescente de los PtNCs libres y los bioconjugados Ab:PtNCs con tres relaciones molares diferentes (1:1, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs). La medida de la fluorescencia se realiza a 620 nm. .... 162

**Figura 44:** Estudio de la inmunosonda Ab:PtNCs empleando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs mediante medidas por fluorescencia e ICP-MS. a) Relación lineal observada entre la fluorescencia detectada en los bioconjugados en disolución y la relación molar real Ab:PtNCs, y b) Relación entre la masa de Pt detectada por ICP-MS en los pocillos ELISA de los experimentos recogidos en la

Fig. 44a y la relación molar real Ab:PtNCs. Las desviaciones corresponden a la desviación de n=3 pocillos (réplicas del inmunoensayo). ..... 164

**Figura 45:** Curvas de calibración obtenidas para la determinación de IgE empleando un inmunoensayo con formato competitivo en el que se utiliza la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs (relación molar promedio 1:11,13 Ab:PtNCs). (a) Gráfico de calibración por detección de fluorescencia con microscopía láser confocal ( $\lambda_{ex}=470$  nm, rango  $\lambda_{em}=610-650$  nm). El eje Y de la gráfica corresponde a la densidad integrada normalizada de la señal de fluorescencia de los PtNCs en cada pocillo empleando el programa Fiji-ImageJ. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de dos medidas independientes, (b) Gráfico de calibración por ICP-MS (isótopo medido  $^{195}\text{Pt}$ ). El eje Y corresponde a la concentración de Pt, calculada mediante una curva de calibración externa con patrón interno ( $^{193}\text{Ir}$ ). Las marcas negras circulares corresponden a los estándares de proteína IgE en solución PBS para construir la curva de calibración, mientras que las marcas con forma de rombo corresponden a los sueros enriquecidos (con diferentes concentraciones de estándar IgE). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de tres medidas independientes. .... 167

**Figura 46:** Factor de amplificación de la detección de IgE: representación de los moles de Pt determinados por ICP-MS por pocillo de la placa ELISA frente a los moles de IgE incubados durante el inmunoensayo competitivo ..... 168

**Figura 47:** Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión para una sección de tejido ocular procedente de un donante que padece DMAE donde se pueden visualizar las acumulaciones de drusas en la región del EPR. a) Drusas individuales (señaladas con una flecha) y acumulación grupal de drusas (cuadrado) - zoom 20x, y b) Zoom 40x del grupo de drusas marcado en la imagen a)..... 175

**Figura 48:** Esquema del protocolo IHC empleado con las inmunosondas metálicas para detección de las proteínas de interés por LA-ICP-MS (se monitorizan las señales  $^{195}\text{Pt}^+$ ,  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{107}\text{Ag}^+$ ). a) Imaging individual empleando los PtNCs bioconjugados a cada uno de los anticuerpos primarios, y b) Imaging múltiple empleando AuNCs, AgNCs, y PtNCs para crear tres inmunosondas independientes para cada proteína (Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs)..... 189

**Figura 49:** Esquema del protocolo de IHC seguido con los tejidos oculares para la detección fluorescente de las proteínas. a) Empleando un fluoróforo Alexa® 594, y b) Empleando la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs donde se realiza la detección directa de la fluorescencia de los AuNCs. TA = temperatura ambiente. .... 191

**Figura 50:** Protocolo llevado a cabo para preparar los patrones de gelatina para realizar la calibración por LA-ICP-MS. La gelatina es suplementada con los metales (Au, Pt y Ag) que ha sido empleados como marcas en las inmunosondas con MNCs. .... 194

**Figura 51:** Perfil obtenido para la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$  en el análisis por LA-ICP-MS de una línea de ablación a lo largo de las capas de la retina en secciones consecutivas de tejido ocular humano control tras el protocolo de IHC empleando la inmunosonda Anti-h-APP:PtMCs y utilizando diferentes relaciones molares PtNCs:hidroxilamina: a) 1:0, b) 1:20, c) 1:50, y d) 1:100. .... 197

**Figura 52:** Distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las capas de la retina en tres secciones consecutivas de tejido ocular humano de un donante control empleando los PtNCs como etiqueta en la inmunosonda y detección por LA-ICP-MS. La columna 1 muestra en todos los casos las imágenes ópticas de la región analizada obtenidas con la cámara del sistema láser. La columna 2 muestra la imagen elemental de  $^{195}\text{Pt}^+$  (señal de intensidad en cps) obtenida por LA-ICP-MS para la detección individual de tres proteínas (14 líneas ablación): a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. Abreviaturas, GC: células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; OPL: capa plexiforme externa; PR: fotorreceptores. .... 198

**Figura 53:** Perfil de expresión génica de las isoformas MT1/2 (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M Y MT1X, y MT2A), CFH, y APP en diferentes regiones de tejidos oculares humanos [cuerpo ciliar (CB), retina, EPR, y esclera]. La señal de hibridación relativa obtenida para cada gen se normalizó con los controles internos y se expresó como unidades arbitrarias (u.a.). La barra de escala de MT1/2 corresponde al eje secundario. .... 200

**Figura 54:** Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia para MT1/2, APP, y CFH en diferentes regiones de tejidos oculares humanos (donante control) donde se ha llevado a cabo IHC empleando anticuerpos secundarios de cada suero primario marcados con Alexa® 594 (emisión roja) y tinción DAPI de los núcleos celulares (emisión azul). Las imágenes a) y b) muestran la región de la retina neurosensorial, mientras que las imágenes c-f muestran la zona de los cuerpos ciliares (zona pars plicata). a) CFH, b) APP, c) APP, d) CFH, e) MT1/2, y f) Control negativo donde se ven zonas con autofluorescencia (zonas pigmentadas). Abreviaturas, CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado. .... 202

**Figura 55:** Imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, APP, y CFH en la región de la retina de un donante control obtenidas por LA-ICP-MS empleando los MNCs como marca elemental. Las imágenes de la fila superior han sido obtenidas con el método de ICP-MS de adquisición individual (tres secciones de retina adyacentes, monitorizando sólo 1 isótopo por región; tiempo de adquisición = 0.23 s). Las imágenes de la fila inferior fueron obtenidas empleado el método del ICP-MS de adquisición múltiple (una sola región en un solo tejido, monitorizando 3 isótopos secuencialmente; tiempo de adquisición = 1,74s). .... 205

**Figura 56:** Estudio del efecto que tiene el flujo de He (gas portador) en la intensidad de las señales ( $^{107}\text{Ag}^+$ ,  $^{195}\text{Pt}^+$ , y  $^{197}\text{Au}^+$ ) para el análisis en un patrón de gelatina ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por LA-ICP-MS. Las intensidades representan la señal promedio obtenida para la señal neta de cada isótopo al ablacionar una línea en la gelatina con una duración de 250 s. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar del valor promedio de la intensidad a lo largo de una línea de ablación. 206

**Figura 57:** Imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las regiones adyacentes de la pars plicata del cuerpo ciliar de un donante humano control tras el protocolo de IHC con inmunosondas marcadas con MNCs (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). La primera columna recoge en todos los casos la imagen óptica de la región analizada. La fila superior corresponde a las condiciones a baja temperatura de ablación (-20°C) con una velocidad de barrido de 5  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , la fila intermedia corresponde a los análisis a temperatura ambiente (25°C) con una velocidad de 5  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , y la fila inferior a condiciones criogénicas (-20 °C) y velocidad de 2,5  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado.....208

**Figura 58:** Esquema de las etapas experimentales llevadas a cabo para obtener el imaging cuantitativo de proteínas en secciones de tejidos biológicos empleando LA-ICP-MS y MNCs como marca elemental. Como se muestra en la parte de la izquierda del esquema, previamente al análisis por ICP-MS es necesario realizar la caracterización de las inmunosondas marcadas para conocer el factor de amplificación de cada inmunosonda.....210

**Figura 59:** Curva de calibrado empleada para la caracterización de las inmunosondas Anti-h-CFH: AgNCs y Anti-h-APP: PtNCs. La representación muestra la curva de calibrado de patrón IgG de conejo para la cuantificación del Ab disponible en las inmunosondas.....212

**Figura 60:** Curvas de calibrado obtenidas por ICP-MS para determinar la concentración de Au, Pt, y Ag en las Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.....213

**Figura 61:** a) Perfil de ablación obtenido para el análisis de un patrón de gelatina por LA-ICP-MS empleando las condiciones optimizadas para el imaging de proteínas, y b) Curvas de calibración obtenidas para el Au, Pt, y Ag obtenidas tras el análisis por LA-ICP-MS de los patrones de gelatina dopados con los tres metales (la concentración metálica en la gelatina fue determinada previamente por ICP-MS con nebulización convencional – **Tabla 10**). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.....215

**Figura 62:** Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para la región de la retina neurosensorial en un tejido ocular (donante control) para estudiar la penetración de la inmunosonda Anti-h-MT1/2: AuNCs en todo el espesor del tejido. La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de MT1/2) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). a) Imagen de máxima intensidad construida a partir de las 45 secciones realizadas cada de 0,4  $\mu\text{m}$  de profundidad, b) y c) Imágenes en profundidad de 10  $\mu\text{m}$  de espesor justo en la INL de la retina (región marcada con línea amarilla), d) y e) Imágenes de una sección transversal yz donde se observa la distribución de la MT1/2 a lo largo de las diferentes capas de la retina (corte marcado con línea naranja). .....217

**Figura 63:** Imaging cuantitativo de proteínas obtenido por LA-ICP-MS para un tejido ocular en la región del EPR de un donante control tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs) (60 líneas de ablación). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. Las imágenes 2D se construyeron con el software Image J después de convertir las señales de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  y  $^{195}\text{Pt}^+$  en concentración de proteínas (con el programa Excel). ..... 219

**Figura 64:** Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (60 líneas de ablación). .. 220

**Figura 65:** Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (30 líneas de ablación). .. 221

**Figura 66:** Esquema resumen de las diferentes estrategias ensayadas para la síntesis (bottom-up) de AuNCs monodispersos. .... 238

**Figura 67:** Etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección de los AuNCs por LA-ICP-MS o fluorescencia empleando las inmunosondas Anti-h-APOE: AuNCs o Anti-h-MT2A: AuNCs. .... 245

**Figura 68:** Esquema de las etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección indirecta empleando anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa®. .... 247

**Figura 69:** Resumen de las etapas necesarias para llevar a cabo la determinación de proteínas (APOE y MT2A) en células HRPEsv40 empleando LA-ICP-MS y marcaje de las células con AuNCs. La estrategia de calibración propuesta está basada en la síntesis y caracterización de patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs con la misma matriz de la muestra. A la izquierda (en naranja) se resumen las etapas necesarias para preparar y caracterizar los patrones de calibración unicelulares, y a la derecha (en azul) los pasos seguidos para obtener el imaging con la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40. .... 248

**Figura 70:** Caracterización de la síntesis de AuNCs empleando diferentes tiempos de reacción (temperatura ambiente). a) Índice de polidispersidad (PDI) en función del tiempo de síntesis, y b) Emisión fluorescente a 720 nm. La raya discontinua horizontal en la gráfica a, denota el nivel máximo al cual se considera una disolución coloidal moderadamente polidispersa (valores más altos de 0.25 no son aceptados). .... 252

**Figura 71:** Micrografías obtenidas por HR-TEM para la caracterización estructural de las síntesis de AuNCs. a-c) AuNCs @DHLA, y d-f) AuNCs@LA-aging. Las imágenes e y f se corresponden con las imágenes obtenidas para el patrón SAED. .... 254

**Figura 72:** Resultados de RT-qPCR para los genes de APOE y MT2A tras varios tratamientos inflamatorios: TGFB1, IL1 $\alpha$  y DEX empleando diferentes concentraciones y tiempo de incubación. Empleo del gen GUSB como control endógeno para la normalización. Las barras de error corresponden a los números de ciclos de expresión obtenidos para RQ máximo y RQ mínimo. RQ: cuantificación relativa. .... 258

**Figura 73:** Concentración de proteína (expresada en fg de proteína por célula) obtenida mediante un ensayo ELISA (kit comercial) para las células HRPEsv40 CT y sometidas a un tratamiento inflamatorio con IL-1 $\alpha$  (24 h y 48 h). a) APOE, y b) MT2A. Las barras de error corresponden a la desviación propagada para la cuantificación de 3 muestras y las desviaciones asociadas al conteo del número de células para cada suspensión celular (conteo manual 3 veces). .... 259

**Figura 74:** Imágenes de fluorescencia obtenidas para el ensayo de inmunofluorescencia indirecto en células HRPEsv40 utilizando Fluor Alexa<sup>®</sup> (el color verde se debe al Fluor Alexa<sup>®</sup> 488, mientras que el color rojo se debe al Fluor Alexa<sup>®</sup> 594). Estos estudios se han realizado para la optimización de la concentración de los anticuerpos primarios en las inmunosondas Anti-h-APOE: AuNCs y Anti-h-MT2A: AuNCs. a) Anti-h-APOE, control negativo (sin Ab primario), b) Dilución 1:50 Anti-h-APOE, c) Dilución 1:100 Anti-h-APOE, d) Dilución 1:200 Anti-h-APOE, e) Anti-h-MT2A, control negativo (sin Ab primario), f) Dilución 1:23 Anti-h-MT2A, g) Dilución 1:46 Anti-h-MT2A, y h) Dilución 1:115 Anti-h-MT2A. .... 263

**Figura 75:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 $\alpha$  (c y d). La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de APOE: inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). Las imágenes a y c corresponden con la superposición de la emisión de DAPI y la inmunosonda, y las imágenes b y d sólo muestran la emisión de la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. Las imágenes de plano XZ corresponden al estudio de penetración de la inmunosonda y son las imágenes en profundidad de las células marcadas con línea blanca discontinua en a y c. (AuNCs (rojo):  $\lambda_{ex}$ =405 y  $\lambda_{em}$ =680-730 nm y DAPI (azul):  $\lambda_{ex}$ =405 y  $\lambda_{em}$ =450-470 nm) .... 265

**Figura 76:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 $\alpha$  (c y d). Las imágenes a y c corresponden con la superposición del canal DAPI (azul) y del canal verde correspondiente a la emisión del Ab secundario fluor Alexa<sup>®</sup>488 (distribución de APOE en verde), y las imágenes b y d corresponden con la distribución de APOE (Ab secundario fluor Alexa<sup>®</sup>488). Las imágenes XZ de la

derecha corresponden a los perfiles en profundidad en las células marcadas con las líneas blancas discontinuas en las imágenes a y c. (Alexa®488 (verde):  $\lambda_{ex}=488$  y  $\lambda_{em}=500-520$  nm y DAPI (azul):  $\lambda_{ex}=405$  y  $\lambda_{em}=450-470$  nm..... 266

**Figura 77:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal de los controles negativos del inmunoensayo empleando AuNCs como etiqueta de fluorescencia. Para realizar estas medidas se añadieron AuNCs libres (i.e., no conjugados) a las células HRPEsv40. a y b) Células HRPEsv40 CT y, c y d) Células HRPEsv40 tratadas con IL-1 $\alpha$ . Las imágenes a y d presentan la superposición de los canales rojo (AuNCs) y azul (DAPI), y las imágenes c y d además superponen el canal de contraste de fase (gris)..... 267

**Figura 78:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. a) Distribución de APOE en células CT, b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de APOE en células tratadas con IL1 $\alpha$ , b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células tratadas con IL1 $\alpha$  antes del muestreo por LA. .... 269

**Figura 79:** Histogramas (frecuencia de pixeles frente a intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ , en cps) obtenidos para el análisis de APOE en células HRPEsv40 CT (células #1 y #2) y tratadas con IL1a (células #4 y #5) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína APOE. .... 270

**Figura 80:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. a) Distribución de MT2A en células CT, b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de MT2A en células tratadas con IL1 $\alpha$ , b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células tratadas con IL1 $\alpha$  antes del muestreo por LA. .... 272

**Figura 81:** Histogramas (frecuencia de pixeles frente a intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ , en cps) obtenidos para el análisis de MT2A en células HRPEsv40 CT (células #1, #2, y #3) y tratadas con IL-1a (células #5, #8, y #11) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-h-MT2a:AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína MT2A. .... 273

**Figura 82:** Estudios de viabilidad celular para preparar los patrones HRPEsv40@AuNCs unicelulares. En la gráfica y la figura se muestran los valores obtenidos para el número de células al con concentraciones de AuNCs en el rango entre 0-350  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las desviaciones estándar corresponden a tres conteos de alícuotas diferentes de la misma suplementación..... 275

**Figura 83:** Representación gráfica de la relación observada entre las concentraciones de AuNCs empleadas para la suplementación de las células HRPEsv40 (0-100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y los fg de Au por célula para los patrones

HRPEsv40@AuNCs tras análisis por ICP-MS. Las desviaciones estándar corresponden a 3 réplicas de la suplementadas con la misma concentración.....275

**Figura 84:** Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv40@AuNCs empleando el imaging de 3 células (suplementadas con  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs) analizadas por LA-ICP-MS. ....277

**Figura 85:** Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv40@AuNCs empleando el imaging de 2 células analizadas por LA-ICP-MS. Imágenes de la izquierda a-d) Suplementación de las células con  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs, e imágenes de la derecha a-d) Suplementación de las células con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs.....277

**Figura 86:** Gráfico de cajas que representa el promedio de las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  por célula (determinada por LA-ICP-MS) para los diferentes patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs obtenidos tras la suplementación de las HRPEsv40 con diferentes concentraciones de AuNCs ( $0-200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las barras de error corresponden a la desviación calculada tras el análisis de 30 células por condición.....278

**Figura 87:** Gráfica de calibración obtenida empleando los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs que es empleada para la determinación de la concentración de proteínas en las células HRPEsv40 tras su análisis por LA-ICP-MS (se utilizan las inmunosonda con AuNCs como etiqueta específica de cada proteína). La intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  por píxel para cada célula (determinada por LA-ICP-MS) se representó frente a la concentración de Au de los patrones HRPEsv40@AuNCs para cada condición de suplementación con AuNCs (determinada por ICP-MS). Las barras de error del eje x corresponden a la desviación estándar del análisis de 30 células, mientras que las barras de error del eje Y corresponden a la desviación estándar calculada para el análisis de las  $1\cdot 10^6$  células digeridas por condición. ....279

**Figura 88:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. La escala de color en unidades de cps y fg APOE/píxel ejemplifica cómo se puede hacer la cuantificación de las imágenes cualitativas obtenidas por LA-ICP-MS empleando la metodología propuesta. En la imagen de la izquierda se muestra la distribución de APOE en células CT<sup>1</sup> y en la de la derecha la superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT<sup>1</sup> antes del muestreo por LA. ....282

**Figura 89:** Diagrama de las etapas llevadas a cabo para el tratamiento de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante análisis por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs. ....300

**Figura 90:** Esquema de las etapas experimentales para realizar el inmunoensayo en suspensión con las células HRPEsv40. Las incubaciones con las inmunosondas se realizan por separado y paralelamente para detectar MT2A o

APOE (Anti-h-MT2A:AuNCs o Anti-h-APOE, respectivamente). TA: temperatura ambiente. .... 303

**Figura 91:** Esquema de los cálculos necesarios para transformar la señal de las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  en cps detectada en el ICP-MS (i.e., detección de los eventos celulares) en masa de proteína por célula (expresada como fg de proteínas por célula). .... 305

**Figura 92:** Perfiles de tiempo resuelto para  $^{56}\text{Fe}^+$  y  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 CT tras realizar el inmunoensayo para la determinación de APOE utilizando una incubación con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs durante toda la noche. a) Perfil para el  $^{56}\text{Fe}^+$ , y b) Perfil para el  $^{197}\text{Au}^+$ . El perfil ampliado en la imagen b) muestra un zoom del nivel de fondo para la señal de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ . .... 312

**Figura 93:** Fotografías de los montajes experimentales empleados para la introducción de muestra (suspensión celular) en el ICP-MS. a) flujo de introducción de muestra controlado por una bomba peristáltica externa (flujo de  $20\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ), y b) sistema de autoaspiración (flujo de  $40\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). .... 314

**Figura 94:** Ejemplo del perfil obtenido para un evento celular adquirido monitorizando la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y empleando 10 ms como tiempo de integración ( $1\cdot 10^5\ \text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$  y un flujo de  $40\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). .... 316

**Figura 95:** Ensayo de dilución para células HRPEsv40 CT donde se muestran los perfiles resueltos en el tiempo para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de las células (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). Se aplicaron diluciones en serie empleando el tampón TRIZMA 0,1% NaCl (pH 7,4). a) 0 células  $\text{mL}^{-1}$ , b)  $1\cdot 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , c)  $1\cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , d)  $2,5\cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , e)  $5\cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , y f)  $1\cdot 10^6$  células  $\cdot\text{mL}^{-1}$ . .... 317

**Figura 96:** Resultados obtenidos para el ensayo de dilución de la suspensión de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). En el gráfico se representa en forma de barras la intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  para la población celular medida por sc-ICP-MS, así como el número de células detectadas en 175 s de tiempo de adquisición, frente a la concentración de la suspensión celular (i.e., número de células por muestra tras contarlas con el hemocitómetro). .... 318

**Figura 97:** Perfil resuelto en el tiempo para el análisis de células individuales empleando sc-ICP-MS donde se monitoriza la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs) para una muestra con una concentración de células HRPEsv40 CT de  $1\cdot 10^6$  célula  $\cdot\text{mL}^{-1}$ . .... 319

**Figura 98:** Estudio que ilustra cómo afecta el tratamiento de los datos con los criterios  $5\sigma$  y  $3\sigma$  a la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  para el análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando AuNCs como etiqueta metálica en la detección de proteínas. a) Gráfico donde se observa una relación lineal entre el número de eventos celulares detectados frente a la concentración celular aplicando el mismo criterio de discriminación para el tratamiento de los datos:  $5\sigma + X$  para el  $^{197}\text{Au}^+$  y el  $^{56}\text{Fe}^+$ , y b)

Perfil resuelto en el tiempo para la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$  ( $1 \cdot 10^5$  células  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) obtenido para el análisis de células HRPEsv40 CT por sc-ICP-MS donde se marcan con una línea los umbrales calculados aplicando los criterios  $3\sigma$  y  $5\sigma$  (línea roja y gris, respectivamente). Las flechas rojas marcan los eventos celulares que no se tienen en cuenta en caso de aplicar el criterio  $5\sigma + X$ .....321

**Figura 99:** Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos para el análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$  por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL1 $\alpha$ . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio  $5\sigma + X$ .....323

**Figura 100:** Histograma de frecuencia de masa para la MT2A en células HRPEsv40 CT (CT2-R2; línea gris) y células tratadas con IL1 $\alpha$  (IL3-R2; línea negra) tras su análisis por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A: AuNCs). .....326

**Figura 101:** Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos para el análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$  por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-APOE: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL1 $\alpha$ . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio  $5\sigma + X$ .....327

**Figura 102:** Histograma de frecuencias de masa para la APOE en células HRPEsv40 CT (CT2-R1; línea gris) y células tratadas con IL1 $\alpha$  (IL3-R3; línea negra) tras su análisis sc-ICP-MS (inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs). .....329



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1:</b> Cantidades y relaciones molares de los reactivos empleados, así como condiciones de síntesis y almacenamiento, para la formación de AuNCs, AgNCs, y PtNCs. Abreviatura: TA: temperatura ambiente. ....	112
<b>Tabla 2:</b> Resumen de las características de los diferentes MNCs empleados en la Tesis Doctoral. En la tabla se incluye su concentración, tamaño promedio, la relación molar óptima para la bioconjugación a anticuerpos IgG (Anti-h-Ab:MNCs), y los volúmenes de cada síntesis necesarios para la reacción. ....	118
<b>Tabla 3:</b> Protocolo de desparafinación e hidratación empleada para secciones de tejido ocular de bloques FFPE.....	121
<b>Tabla 4:</b> Resumen de estrategias basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación serológica de IgE. En la Tabla se muestra el método y los materiales empleados, así como el límite de detección (LOD) alcanzado para cada uno de ellos. ....	133
<b>Tabla 5:</b> Tabla resumen donde se indica el volumen de síntesis de PtNCs empleado para llevar a cabo las diferentes bioconjugaciones con diferentes relaciones molares Ab:PtNCs.....	139
<b>Tabla 6:</b> Rendimiento del etiquetado del Ab con los PtNCs durante la síntesis de la inmunosonda mediante análisis de los bioconjugados una vez purificados por ICP-MS.....	163
<b>Tabla 7:</b> Resultados obtenidos para la cuantificación de IgE en muestras de suero humano empleando la metodología desarrollada basada en el empleo de una inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por ICP-MS. Además, se incluye en la Tabla la concentración de IgE obtenida con un kit ELISA comercial. En ambos casos los valores de la desviación estándar corresponden a la incertidumbre asociada a la medida de tres réplicas independientes de la misma muestra.....	169
<b>Tabla 8:</b> Condiciones de operación de los sistemas de ablación láser e ICP-MS para el análisis de proteínas en secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS utilizando inmunosondas con MNCs (AuNCs, PtNCs, y AgNCs).....	184
<b>Tabla 9:</b> Resultados obtenidos para la caracterización de las inmunosondas metálicas, en términos de concentración de Ab disponible en la inmunosonda determinada por un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo, concentración del metal determinada por ICP-MS, factor de amplificación (N), y relación molar Ab:MNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.....	212
<b>Tabla 10:</b> Concentraciones de Au, Pt, y Ag encontradas en los patrones de laboratorio de gelatina analizados por ICP-MS tras su digestión ácida. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes. ....	214

<b>Tabla 11:</b> Límites de detección del método de análisis expresados en concentración de metal, en número de NCs por g de gelatina y en número de NCs por volumen de pulso, teniendo en cuenta que se tienen una resolución lateral de 5 $\mu\text{m}$ .	216
<b>Tabla 12:</b> Condiciones seleccionadas para el análisis por nebulización convencional ICP-MS (lisados celulares e inmunosondas metálicas) y para los estudios de imaging por LA-ICP-MS con las células HRPEsv40 (control y tratadas con IL1 $\alpha$ ) y los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs.	236
<b>Tabla 13:</b> Resumen de los diferentes experimentos llevados a cabo con las células HRPEsv40. En la Tabla se recoge el soporte empleado para el crecimiento celular, el número de células, y las etapas de procesamiento celular necesarias para realizar los diferentes experimentos. Trip.: tripsinización (tripsina-EDTA al 0,25%), Extr.: extracción.	240
<b>Tabla 14:</b> Resumen de los diferentes tratamientos inflamatorios ensayados con las células HRPEsv40. TGF $\beta$ 1: Factor de crecimiento transformante beta humana recombinante, DEX: Dexametasona, IL-1 $\alpha$ : Interleuquina-1 $\alpha$ humana recombinante.	241
<b>Tabla 15:</b> Resultados obtenidos por ICP-MS para la determinación de la concentración de Au en las síntesis de AuNCs: AuNCs@LA-aging y AuNCs@DHLA. Rend.: rendimiento de la reacción. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar de tres digestiones ácidas de cada síntesis medida por ICP-MS.	255
<b>Tabla 16:</b> Resultados obtenidos para la masa de APOE en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs.	281
<b>Tabla 17:</b> Resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPEsv40 (CT & tratadas con IL-1 <sup>a</sup> ) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs.	283
<b>Tabla 18:</b> Parámetros optimizados para los análisis de células HRPEs40 por sc-ICP-MS	299
<b>Tabla 19:</b> Protocolos de fijación empleados con las células HRPEsv40 en suspensión: fijación tradicional vs fijación suave.	302
<b>Tabla 20:</b> Resultados experimentales obtenidos por sc-ICP-MS para el análisis de diferentes elementos constituyentes de las células HRPEsv40 en una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL1 $\alpha$ ).	308
<b>Tabla 21:</b> Resultados obtenidos para la optimización del protocolo de fijación celular (fijación tradicional y fijación suave) en el que se realiza el recuento de células HRPEsv40 empleando la cámara de Neubauer.	310

**Tabla 22:** Resultados obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 (CT e IL-1 $\alpha$ ) tratadas con la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs empleando dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos: 5 $\sigma$  para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y 3 $\sigma$  y 5  $\sigma$  para la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$ . Eventos detectados durante una adquisición de 90 s (n=3 réplicas instrumentales para  $^{197}\text{Au}^+$  y n=2 para  $^{56}\text{Fe}^+$ )...320

**Tabla 23:** Resultados experimentales obtenidos para la determinación de MT2A en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A: AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (rep. bio.) para cada condición (CT e IL1 $\alpha$ ) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3).  
.....325

**Tabla 24:** Resultados experimentales obtenidos para la determinación de APOE en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (rep. bio.) para cada condición (CT e IL-1 $\alpha$ ) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3)..... 328



---

# A. INTRODUCCIÓN

---



La presente Tesis Doctoral intenta abordar la carencia de metodologías suficientemente sensibles y robustas para la cuantificación de biomoléculas, en particular, de proteínas. Las proteínas suelen ser pieza clave en la mayoría de los procesos biológicos implicados en el inicio y avance de un amplio abanico de enfermedades. En esta Introducción se intentará dar una visión general del problema biológico planteado, las proteínas involucradas, así como de las metodologías utilizadas en química analítica. Se hará especial hincapié en las estrategias de cuantificación de proteínas basadas en la espectrometría de masas elemental.

## **A.1. BIOMOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**

El cómo, qué, y por qué se desarrollan muchas enfermedades sigue siendo un enigma aún sin resolver. Uno de los principales objetivos de la investigación biomédica actual en enfermedades neurodegenerativas es mejorar su detección temprana, así como la detección presintomática de la disfunción neuronal<sup>1</sup>.

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de proteínas implicadas en la enfermedad ocular denominada Degeneración macular asociada a la edad (DMAE), relacionada con la disfunción del sentido de la visión. Con el objetivo de contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la génesis y evolución de esta enfermedad se investigará el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para el estudio de las proteínas implicadas a nivel celular y supracelular. A fin de conocer mejor la DMAE, y siendo esta una patología ocular, a continuación, se describe brevemente la estructura y fisiología del sistema visual.

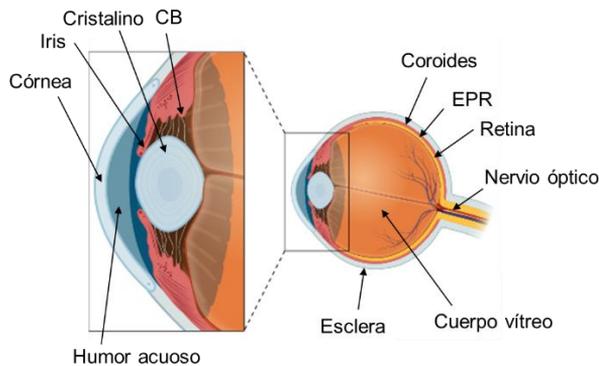
### **A.1.1. Estructura y fisiología del ojo**

El ojo es el principal órgano que compone el sistema visual. Este es responsable de captar y enfocar la luz sobre las capas neurosensoriales de la retina con el

---

<sup>1</sup> M.D.S. Henley, P.G. Bates, J.S. Tabrizi. Biomarkers for neurodegenerative diseases, *Curr. Opin. Neurol.* 18, (2005), 698-705

objetivo de transformar la energía luminosa en estímulos nerviosos que son transportados a través del nervio óptico hasta la corteza visual del cerebro. Es ahí donde se procesan y se perciben conscientemente las imágenes<sup>2</sup>. Anatómicamente, el ojo humano está formado por tres capas primarias que rodean el globo ocular (**Figura 1**). La túnica fibrosa constituida por la esclera y la córnea (capa más externa), la úvea o túnica vascular compuesta por el iris, los cuerpos ciliares (CB, *ciliary bodies*) y la coroides (capa intermedia), y la túnica neurosensorial (la más interna) formada por la retina y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Estas capas rodean el cristalino, el humor acuoso y el cuerpo vítreo.



**Figura 1:** Esquema de la anatomía del ojo humano donde se muestra un corte transversal del globo ocular y una ampliación de la zona anterior del ojo (esquema hecho con Biorender.com).

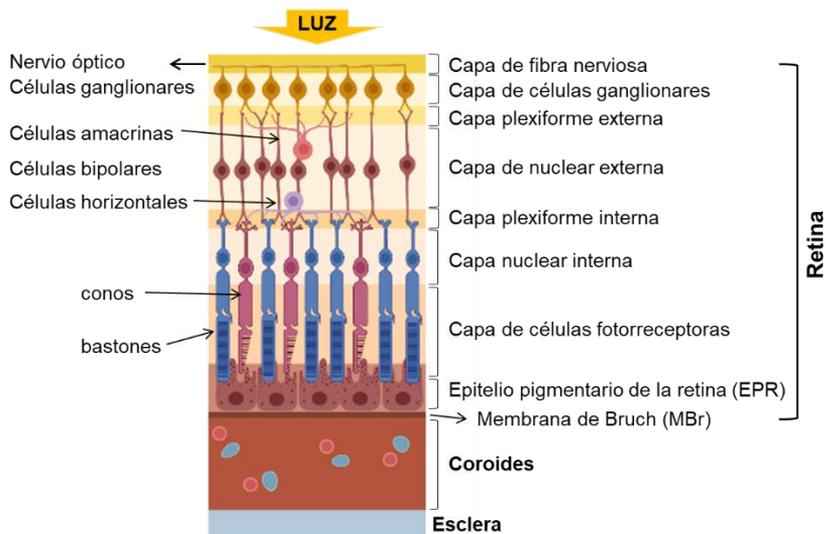
Cada uno de los tejidos y estructuras celulares que conforman el ojo tienen funciones específicas que permiten un buen funcionamiento del sistema visual. Sin embargo, son la retina neurosensorial y el EPR, las estructuras directamente relacionadas con el desarrollo de la DMAE y por ello, a continuación, se dará una descripción más detallada de las mismas.

La retina está organizada en capas de células diferenciadas encargadas del proceso de fotorrecepción y transducción de la luz, incluyendo: células fotorreceptoras

---

<sup>2</sup> I. S. Fox, Fisiología humana, séptima edición. McGraw Hill Interamericana, Madrid (2003). Capítulo 10. Fisiología sensorial.

(conos y bastones), interneuronas (células horizontales, bipolares y amacrinas) y células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico (**Figura 2**). La luz incidente atraviesa las capas de células neuronales hasta alcanzar los fotorreceptores. Éstos son activados mediante una cadena de reacciones enzimáticas y fotoquímicas entre la luz y ciertas moléculas localizadas en los fotopigmentos de los conos y bastones, transformando la energía luminosa en potenciales eléctricos que son transmitidos a las células ganglionares mediante las células bipolares a través de múltiples sinapsis directas o indirectas con las células horizontales y amacrinas. Finalmente, estos impulsos nerviosos son enviados a la corteza cerebral donde se elaboran las imágenes<sup>3,4</sup>.



**Figura 2:** Estructura de las capas celulares de la retina (esquema hecho con BioRender.com).

El EPR es una monocapa continua de células pigmentadas que se sitúa entre los vasos sanguíneos del coroides y los segmentos externos sensibles a la luz de los fotorreceptores. Sus funciones están estrechamente ligadas con el mantenimiento y viabilidad de las células fotorreceptoras y consiguiente mantenimiento de la retina. De manera resumida, entre sus funciones se encuentran: (1) la absorción de la energía

<sup>3</sup> M.J. Tovée, An introduction to the visual system, second edition. Cambridge University Press, Cambridge (2008). Capítulo 2: The eye and forming the image.

<sup>4</sup> T. Vanderah, D.J. Gould, Nolte's human brain. Seventh Edition. Elsevier, Ámsterdam (2016). Capítulo 17: The visual system.

luminosa enfocada por el cristalino en la retina, (2) el transporte de iones, agua y productos metabólicos finales desde el espacio subretiniano a la sangre, (3) la absorción de nutrientes de la sangre (p.ej., glucosa, retinol y ácidos grasos) para ser entregados a los fotorreceptores, y (4) mantener la excitabilidad de los fotorreceptores por medio de la reisomerización del retinol, asegurar la composición iónica en el espacio subretiniano, fagocitar y digerir los segmentos externos de los fotorreceptores desprendidos o secretar factores de crecimiento como objetivo estructural<sup>5</sup>.

A la vista de sus múltiples funciones, el EPR es esencial para mantener una función visual normal. De ahí que cualquier alteración en sus funciones puede provocar la disfunción de los fotorreceptores y la subsecuente degeneración de la retina, causando pérdida o perturbaciones en la visión que pueden desembocar en ceguera<sup>5</sup>.

A medida que envejecemos, las células, tejidos y órganos de nuestro organismo sufren un deterioro inevitable, afectando este envejecimiento a los tejidos y células del ojo. Esto provoca una pérdida progresiva de su eficacia y funcionalidad, lo que juega un papel fundamental en la aparición de patologías oculares relacionadas con el envejecimiento como son las cataratas<sup>6</sup>, el glaucoma<sup>7</sup> o la DMAE<sup>8</sup>, entre otras.

---

<sup>5</sup> O. Strauss. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 85, (2005), 845-81.

<sup>6</sup> F.J. Alañón Fernández, J. Fernández Pérez, S. Ferreiro López. *Oftalmología en atención primaria. Formación Alcalá, Jaén* (2003). Capítulo XI: Patologías del cristalino: cataratas.

<sup>7</sup> F.J. Alañón Fernández, J. Fernández Pérez, S. Ferreiro López. *Oftalmología en atención primaria. Formación Alcalá, Jaén* (2003). Capítulo X: Glaucoma

<sup>8</sup> M. Yanoff, J.S. Duker, *Ophthalmology*, fourth edition. Elsevier, Ámsterdam (2014). Part 6: Retina and vitreous. Section 6: macular disorders.

### A.1.2. La degeneración macular asociada a la edad

La DMAE es la principal causa de ceguera irreversible en la población envejecida (> 60 años) del mundo desarrollado<sup>8</sup>, representando el 6-9% de la ceguera por causa legal a nivel mundial. De hecho, se estima que, en el año 2040, 280 millones de personas padezcan esta enfermedad<sup>9</sup>. La DMAE se caracteriza por un deterioro visual progresivo debido a la neurodegeneración de la región fotorreceptora-EPR, especialmente notable en la región retiniana de la mácula, zona con mayor densidad de células fotorreceptoras. Este hecho implica una pérdida de la agudeza visual en el campo central de la visión<sup>8</sup>. Como ejemplo, en la **Figura 3** se ilustra la percepción visual de una persona sin la patología (imagen de la izquierda) y la percepción visual de un paciente con DMAE en fase avanzada (imagen de la derecha).

El desarrollo de la DMAE está estrechamente relacionado con la edad, aunque es una patología multifactorial donde el tabaquismo, la dieta y factores genéticos son también factores de riesgo. Además, debido a que la retina está continuamente expuesta a radiación solar directa y a un alto consumo de oxígeno, el estrés oxidativo y la inflamación crónica juegan un papel fundamental en la aparición y desarrollo de esta enfermedad<sup>10</sup>.



**Figura 3:** Campo visual de una persona sin patologías oculares (imagen izquierda) y visión de los pacientes con DMAE (imagen derecha).

<sup>9</sup> G.B.D. 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*. 9, (2021), 144-160.

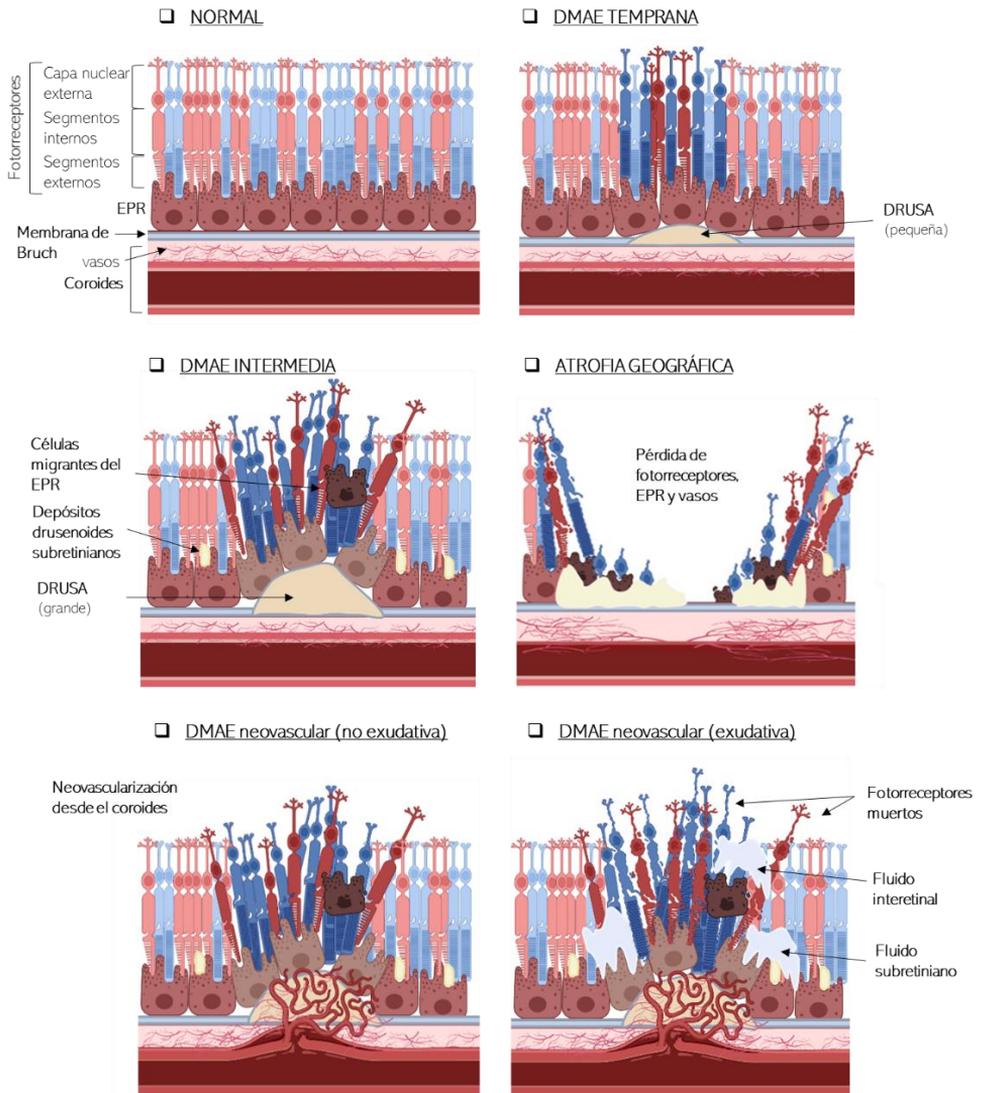
<sup>10</sup> H. B. Juel, C. Faber, S.G. Svendsen, A.N. Vallejo, M.H. Nissen. Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *PLoS One*. 21, (2013), 64619.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el EPR es una barrera celular con funciones vitales para el mantenimiento de los conos y bastones y de la retina neurosensorial. Entre el EPR y los vasos sanguíneos del coroides se encuentra una barrera de intercambio metabólico semipermeable conocida como membrana de Bruch, BrM (**Figura 4**, normal). Esta, junto con el epitelio, el coroides y los fotorreceptores, forman el complejo celular que sufre cambios, disfunción y muerte con la evolución de la DMAE.

Clínicamente la DMAE se clasifica en dos estadios clínicos diferenciados, el temprano que evoluciona progresivamente hasta su fase tardía en el cual, la DMAE se puede manifestar en dos fenotipos patológicos<sup>11</sup>: DMAE seca (atrofia geográfica) o húmeda (neovascularización). A continuación, y apoyándonos en la **Figura 4**, se explica de manera más detallada cómo es la evolución y los fenotipos patológicos en los que se puede manifestar la enfermedad en su fase tardía.

---

<sup>11</sup> M. Fleckenstein, T.D.L. Keenan, R.H. Guymer, et al. Age-related macular degeneration. Nat Rev Dis Primers 7, (2021), 31.



**Figura 4:** Esquema resumen de las manifestaciones y tipos de DMAE resultantes del avance de la enfermedad que implica el deterioro y muerte celular de la región fotoreceptores-EPR-MBr-coroides (esquema hecho con BioRender.com).

#### □ La DMAE temprana e intermedia

Se identifica clínicamente con la aparición de depósitos extracelulares de tamaño pequeño/medio (denominados drusas) localizados específicamente entre el EPR y la BrM o como manifestaciones pigmentarias anómalas en el EPR (**Figura 4** DMAE temprana e intermedia). De hecho, en estas primeras etapas la gravedad de

la enfermedad se puede estimar atendiendo al tamaño y número de las drusas. Las drusas son depósitos con alta concentración de proteínas, lípidos y minerales que provocan una deficiencia o dificultad en el intercambio metabólico al bloquear la entrada de nutrientes y el flujo de salida de fluidos desde el EPR al coroides.

Los pacientes que evolucionan a la DMAE intermedia presentan al menos una drusa de gran tamaño ( $>124\ \mu\text{m}$ ) y numerosas drusas más pequeñas, así como depósitos drusenoides subretinianos. En este caso se produce una atrofia geográfica que no llega a extenderse al centro de la mácula. La aparición de numerosas drusas o de tamaño mayor que obstaculizan el flujo metabólico normal, provoca la inducción de estrés en las células del EPR desencadenando una respuesta inflamatoria crónica que ocasiona la atrofia y muerte de las células fotorreceptoras (DMAE a sus estadios tardíos) y por ende a la pérdida irreversible de la visión<sup>11</sup>.

### ❑ La DMAE tardía (DMAE seca o húmeda)

En sus etapas tardías, la DMAE puede manifestarse como una atrofia geográfica, conocida como el fenotipo de DMAE seca. Este es el más común entre los pacientes con DMAE (85-90% del total) y se caracteriza por la degeneración lenta de las células neuroepiteliales por el bloqueo metabólico de las drusas, conllevando a la disfunción y a la consecuente muerte de las células fotorreceptoras.

Alternativamente, se puede manifestar como el fenotipo de DMAE húmeda (neovascular), la cual es la forma más agresiva de la enfermedad y se caracteriza por una neovascularización coroidal, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos bajo el EPR que provocan un flujo subretinal, causando la degeneración y muerte del EPR. Esto da lugar a la producción de sustancias angiogénicas (p.ej., el factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF) que estimulan el crecimiento progresivo de los neovasos, provocando la pérdida de los fotorreceptores y la formación de cicatrices.

En cuanto al fenotipo DMAE húmeda (neovascular), existen tratamientos que pueden frenar, disminuir e incluso recuperar la pérdida de visión en aquellos pacientes que la sufren. De hecho, puede tratarse eficazmente gracias al desarrollo de nuevos fármacos antiangiogénicos, que se inyectan en el interior del ojo (inyecciones intravítreas) y actúan inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) para impedir la formación de nuevos vasos sanguíneos anómalos<sup>12</sup>. A mayor rapidez del tratamiento y siempre y cuando se intercepte en sus estadios más iniciales, por lo general mejor será el pronóstico visual. Sin embargo, respecto al fenotipo DMAE seca (atrófica), si bien es el más frecuente, no se conoce más tratamiento que el de intentar evitar factores de riesgo (p.ej., hipertensión arterial, tabaquismo o colesterol) y adoptar hábitos saludables, de modo que sigue sin existir una terapéutica efectiva a día de hoy. Por el momento, una opción es la prescripción por parte del oftalmólogo de determinados suplementos de vitaminas antioxidantes, como manera de protección de la retina<sup>13</sup>.

#### **A.1.2.1. Proteínas de interés y su relación con la DMAE**

La formación de drusas parece estar asociada a eventos inflamatorios e inmunitarios locales crónicos en las interfaces entre el EPR y la MBr, y entre el EPR y los fotorreceptores, lo que conduce a la degeneración de la retina.

Existen estudios que relacionan varias proteínas con el desarrollo y avance de la DMAE, sea por su implicación directa en procesos biológicos de protección frente al estrés oxidativo o inflamación, en la activación de la cascada del complemento, o por la formación y acumulación directa en los depósitos subretinianos (drusas y drusenoides). Algunas de las proteínas previamente estudiadas en enfermedades oculares y neurodegenerativas son las metalotioneínas (MTs), la proteína precursora amiloide

---

<sup>12</sup> S.D. Solomon, K. Lindsley, S.S. Vedula, M.G. Krzystalik, B.S. Hawkins, Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev.* 3, (2019), CD005139.

<sup>13</sup> H.M. Zając-Pytrus, A. Pilecka, A. Turno-Kręcicka, J. Adamiec-Mroczek, M. Misiuk-Hojło The dry form of age-related macular degeneration (AMD): The current concepts of pathogenesis and prospects for treatment. *Adv Clin Exp Med.* 6, (2015), 1099-104.

(APP), el factor de crecimiento H (CFH), o la apolipoproteína E (APOE)<sup>14,15,16</sup>. A continuación, se dará una visión general, su función y su implicación en el desarrollo de la DMAE.

En la **Figura 5** se esquematiza un modelo de patogénesis de DMAE que integra factores de riesgo clave (externos y genéticos) y la implicación de varias proteínas. Por una parte, el intercambio desequilibrado de lipoproteínas (p.ej., APOE) debido a factores de riesgo como el alto consumo de grasas y el tabaquismo, puede dar lugar a la formación de depósitos de drusenoides, que a su vez actúan como focos de inflamación a través de las interacciones entre APOE,  $\beta$ -amiloide (APP) y la consecuente activación de la cascada del complemento<sup>17</sup>. Esta activación provoca a su vez la activación microglía y la actividad de los macrófagos infiltrados que promueven un entorno de inflamación crónica bajo la influencia de los polimorfismos genéticos (p.ej. variantes de la CFH). Paralelamente, factores externos como la luz solar provoca estrés oxidativo (aumento de ROS en la región ocular), el cual induce directamente ciclos de inflamación crónica (donde las MTs juegan un papel clave). De manera general, todos estos factores conducen a la degeneración del EPR y de los fotorreceptores, desencadenando una DMAE avanzada (atrofia geográfica o neovascularización)<sup>16</sup>.

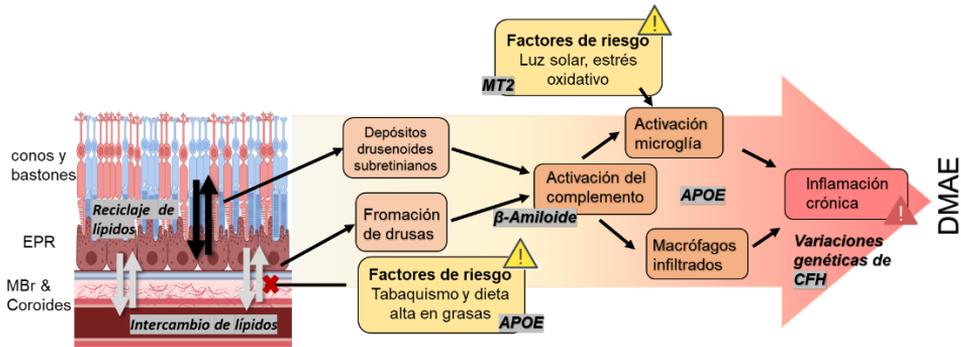
---

<sup>14</sup> T. Dentchev, A.H. Milam, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, J.L. Dunaief. Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. *Mol Vis.* 9, (2003), 184-190.

<sup>15</sup> H. González-Iglesias, L. Alvarez, M. García, C. Petrash, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados. Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics* 6, (2014), 201-208.

<sup>16</sup> M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration. *Life* 11, (2011), 635.

<sup>17</sup> J. Wang, K. Ohno-Matsui, T. Yoshida, N. Shimada, S. Ichinose, T. Sato, M. Mochizuki, I. Morita. Amyloid-beta up-regulates complement factor B in retinal pigment epithelial cells through cytokines released from recruited macrophages/microglia: Another mechanism of complement activation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol* 220, (2009), 119-28.



**Figura 5:** Esquema de la patogénesis de la DMAE y su relación con las proteínas APOE, MT2, APP y CFH. Esquema adaptado de la ref.16

Las **metalotioneínas (MT)** son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) que constan de 4 isoformas, MT1, MT2, MT3 y MT4 (en humanos), estando las MT1, 2 y 3 presentes en los tejidos oculares. Tal y como se encuentra recogido en el trabajo de González-Iglesias et al.<sup>15</sup> las MT's presentan elevada abundancia a lo largo de las diferentes regiones oculares y esto parece indicar su relación directa con la neuroprotección y equilibrio de procesos biológicos para mantener un buen funcionamiento del órgano de la visión. De hecho, esta familia de proteínas participa en procesos de homeostasis y transporte de metales (Zn o Cu). En este contexto, el complejo Zn-MT está estrechamente relacionado con la protección frente al estrés oxidativo y la inflamación, ambas situaciones críticas en el desarrollo de la DMAE. El ciclo redox del complejo Zn-MT es capaz de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibiendo su toxicidad y genotoxicidad cuando se producen etapas de estrés oxidativo. Además, también están implicadas en la eliminación de las citoquinas proinflamatorias liberadas durante procesos inflamatorios<sup>18</sup>.

Por su parte, la **APOE** es una de las isoformas de las apolipoproteínas y está encargada del transporte de lípidos. Este hecho hace que esté estrechamente relacionada con la formación de las drusas puesto que suelen acumular gran cantidad de lípidos. El desajuste en el transporte entre el coroides y las células del EPR (**Figura**

<sup>18</sup> X.B. Ling, H.W. Wei, J. Wang, Y.Q. Kong, Y.Y. Wu, J.L. Guo, T.F. Li, J.K. Li, Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 17, (2016), 1483.

5) provoca acumulación lipídica en la zona subretinal<sup>14,19</sup>. De hecho, la APOE es una de las proteínas más abundantes en la composición de drusas de ojos humanos<sup>16</sup>. Además, se sabe que está involucrada en la activación de la cascada del complemento, la cual provoca inflamación crónica y que está ligada al avance de la DMAE hacia sus etapas más agresivas. También, la activación del complemento induce una acumulación de APOE dependiente del tiempo en las células del EPR<sup>20</sup>.

Alteraciones genéticas en el gen que codifican **el factor del complemento H (CFH)**, localizadas en el locus CFH-to-F13B, están asociados con mayores niveles de activación del complemento en la interfase EPR-coroides (**Figura 5**)<sup>21</sup>. Paralelamente, la proteína CFH ha sido localizada de manera abundante a lo largo de la región de la retina (células del EPR, fotorreceptores y las células ganglionares)<sup>22</sup>. Por tanto, también se postula como una proteína implicada en procesos relacionados con el sentido de la vista. Estudios inmunohistoquímicos sugieren que la insuficiencia de CFH en la interfase retina/coroides puede conducir a una activación incontrolada del complemento que provoca inflamación y consiguiente daño celular y tisular<sup>23</sup>. Además, la CFH ha sido identificada como proteína de formación de las drusas y los depósitos laminares basales (**Figura 6**)<sup>14,24</sup>. En cuanto a la **proteína precursora del**

---

<sup>19</sup> C.A. Curcio, J. B. Presley, G. Malek, N.E. Medeiros, D.V. Avery, H.S. Kruth, Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Exp Eye Res.* 81, (2005), 731–741.

<sup>20</sup> P. Yang, N.P. Skiba, G.M. Tewkesbury, V.M. Treboschi, P. Baci, G.J. Jaffe, Complement-mediated regulation of apolipoprotein E in cultured human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58, (2017), 3073–3085.

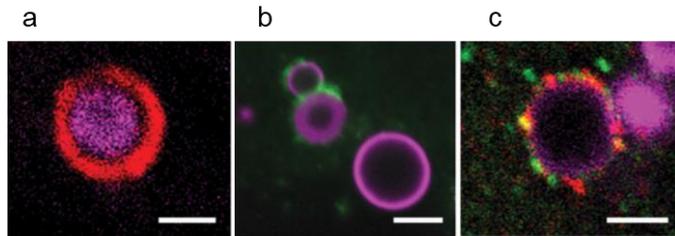
<sup>21</sup> T.D.L. Keenan, M. Toso, C. Pappas, L. Nichols, P.N. Bishop, G.S. Hageman, Assessment of proteins associated with complement activation and inflammation in maculae of human donors homozygous risk at chromosome 1CFH-to-F13B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 56, (2015), 4870.

<sup>22</sup> S.D. Martin, E. Bodek, L. Geng, S. Schaal, H.J. Kaplan, T.H. Tezel, Complement factor H (CFH) expression in mammalian retinal pigment epithelial cells, *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 49, (2008), 206.

<sup>23</sup> I.A. Bhutto, T. Baba, C. Merges, V. Juriasinghani, D.S. McLeod, G.A. Luty, C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 95, (2011), 1323–1330.

<sup>24</sup> R.B. Thompson, V. Reffatto, J.G. Bundy, E. Kortvely, J.M. Flinn, A. Lanzirrotti, I. Lengyel, Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proc Natl Acad Sci.* 112, (2015), 1565–1570.

$\beta$ -amiloide (APP), esta se ha relacionado con funciones de señalización en la activación del complemento<sup>18</sup> a la vez que se ha inmunolocalizado de manera abundante en las drusas (**Figura 6**).



**Figura 6:** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia tras el etiquetado inmunohistoquímico con anticuerpos específicos de proteínas que identifican acumulación en las drusas (círculos de hidroxapatita en violeta) de: a) proteína APP (rojo) y CFH (verde), c) mezcla de las imágenes: rojo (APP), verde (CFH) y amarillo que corresponde a otra proteína, la vitronectina. (Barras de escala: 2  $\mu$ m). Imagen adaptada de la ref 24.

## A.2. MÉTODOS TRADICIONALMENTE EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La identificación y cuantificación exacta y precisa de proteínas en muestras biológicas es una tarea compleja debido a factores como la baja concentración del analito en las muestras, así como la complejidad de las matrices en las que se encuentran (p.ej., tejidos, suero, células, etc.). Por ello, todavía existe una demanda de técnicas analíticas sensibles, robustas y cuantitativas para llevar a cabo esta tarea<sup>25</sup>. A continuación, se describen los métodos típicamente empleados en los laboratorios bioquímicos para la identificación y cuantificación de estas biomoléculas.

### A.2.1. Métodos espectrofotométricos

Tradicionalmente, los métodos espectroscópicos han sido los más utilizados en laboratorios análisis bioquímico. Estos métodos aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas para generar una señal detectable en la región ultravioleta-visible (UV/Vis) del espectro electromagnético. Dicha señal permite realizar la cuantificación de las proteínas, siendo la señal proporcional a la concentración de proteína

en la muestra bajo estudio (señal detectable  $\sim$  [proteína] o señal detectable  $\sim$  1/[proteína])<sup>25</sup>. En este tipo de estrategias se realiza un calibrado externo con un estándar de proteína genérico (p.ej., albúmina de suero bovino, BSA) con el que se calcula la concentración de proteína en la muestra problema. En este contexto se encuentran diferentes métodos:

- ❑ Métodos basados en la absorción intrínseca de los residuos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) del péptido o proteína (p.ej., longitudes de onda a 280 o 260 nm, o relación entre las longitudes de onda)<sup>25</sup>.
- ❑ Métodos basados en la medida óptica de las especies absorbentes generadas por la unión de un reactivo a la proteína al ser añadido a la muestra (o patrón). En este apartado se encuentran métodos ampliamente conocidos como: (1) el método Bradford<sup>26</sup>, basado en la unión no covalente entre el tinte *Coomassie blue* G-250 a la proteína, el cual genera un compuesto que absorbe a 590 nm, y (2) los métodos que se basan en la formación de un complejo de Cu<sup>+</sup> con la proteína. Aprovechando la oxidación del complejo es posible la reducción de sustancias colorimétricas que absorben a longitudes de onda específicas. Aquí se pueden mencionar, el método Lowry<sup>27</sup> en el que el reactivo de Folin, tras su reducción, se transforma en una especie que absorbe a 720 nm (o 500 nm), o el basado en el ácido bicinónico BCA<sup>28</sup> que, tras su reducción, absorbe a 562 nm.
- ❑ Cabe mencionar también aquellas aproximaciones basadas en la unión de fluoróforos, es decir, en la adición de moléculas que reaccionan con péptidos/proteínas generando un compuesto detectable por emisión

---

<sup>25</sup> Simonian MH. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr Protoc Cell Biol.* (2002) Appendix 3:Appendix 3B.

<sup>26</sup> M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 72, (1976), 248-254.

<sup>27</sup> O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, (1951), 265–275.

<sup>28</sup> J. Cortés-Ríos, A.M. Zárate, J.D. Figueroa, J. Medina, E. Fuentes-Lemus, M. Rodríguez-Fernández, M. Aliaga, C. López-Alarcón, Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Anal Biochem.* 608, (2020), 113904.

fluorescente<sup>29</sup>. Este tipo de métodos presentan generalmente una mayor sensibilidad que los métodos basados en la absorción de radiación.

Sin embargo, estas metodologías de cuantificación de compuestos proteicos presentan serias limitaciones debido a su baja o nula especificidad, reproducibilidad y sensibilidad (rango  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ - $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Los reactivos usados durante los ensayos o incluso la propia matriz de la muestra pueden interferir en la detección óptica. Además, la elevada variabilidad presente en las uniones establecidas entre las proteínas y los reactivos colorimétricos provoca en general baja fiabilidad en los resultados<sup>25</sup>.

Actualmente, dichos métodos se emplean de manera rutinaria para cuantificar la cantidad de proteína total en muestras biológicas previamente lisadas y homogeneizadas. En ocasiones este tipo de análisis se llevan a cabo con el objetivo de normalizar la concentración de una proteína específica en la muestra, determinada por otra técnica/metodología alternativa<sup>30</sup>. Sin embargo, en el caso de desear la cuantificación de una única proteína mediante detección por espectrofotometría, esta ha de ser aislada y purificada previamente empleando alguna técnica de separación (p.ej., la electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)).

### **A.2.2. Métodos basados en el empleo de anticuerpos específicos**

Convencionalmente los métodos que hacen uso de anticuerpos específicos para la determinación de una determinada proteína emplean una detección espectroscópica, realizando la medida de la absorbancia o la fluorescencia dependiendo del compuesto empleado como marca detectable (una especie cromógena o un fluoróforo, respectivamente). La molécula que genera una señal detectable es unida covalentemente mediante estrategias de bioconjugación (o afinidad biotina-estreptavi-

---

<sup>29</sup> A. Chopra, W.G. Willmore, K.K. Biggar, Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol. *Sci Rep.* 26, (2019), 13923.

<sup>30</sup> J.M. Collins, D. Wang, Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) protein quantification using capillary western blot technology and total protein normalization. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 112, (2021), 107117.

dina) a una de las biomoléculas que participan en dicho método (anticuerpo o antígeno) y su señal se relaciona con la concentración de analito (proteína). Sin embargo, a diferencia de los métodos anteriormente descritos en la **Sección A.2.1.**, presentan una elevada especificidad y afinidad debido a que se basan en la reacción inmunológica antígeno-anticuerpo. Esto hace que estas estrategias sean muy atractivas para la identificación y cuantificación de una proteína (o biomolécula) diana, sin necesidad de una etapa de purificación o aislamiento previa. A continuación, se explicarán brevemente las bases de este tipo de estrategias, las biomoléculas implicadas, así como los métodos comúnmente empleados para la identificación y/o determinación de proteínas: *western blot* (WB), los inmunoensayos y los métodos inmunohistoquímicos (IHC).

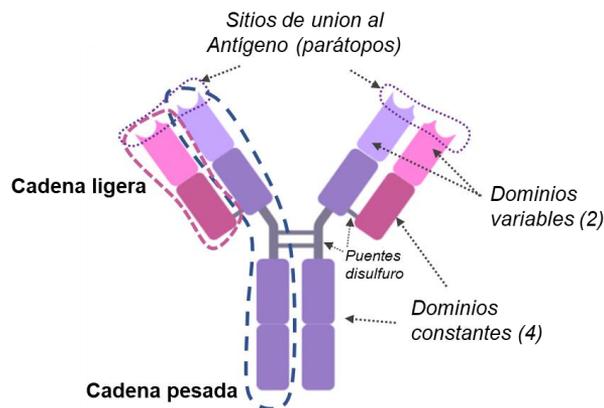
### A.2.2.1. Aspectos generales

En una reacción inmunológica, el anticuerpo (Ab, *antibody*) reconoce específicamente a un antígeno, que suele ser una biomolécula diana (u otro Ab). Los anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas producidas por los linfocitos B (un tipo de glóbulo blanco) de organismos vivos superiores como consecuencia de la activación de una respuesta inmune al entrar en contacto con un inmunógeno (el antígeno).

Los anticuerpos más abundantes (80% del total) y los que se emplean en mayor medida en técnicas de análisis inmunoquímico, son las inmunoglobulinas G o IgG (**Figura 7**). Tienen un peso molecular en torno a 150 kDa, y poseen una estructura en forma de Y, donde dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (~ 50 kDa) y dos ligeras (~ 25 kDa) se unen mediante puentes disulfuro. Además, las cadenas de aminoácidos poseen una región constante formada por 4 dominios y una región variable formada por 2. En la región variable se encuentran los sitios de unión al antígeno,

conocidos como parátomos. De forma general los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales según reaccionen con uno o con varios sitios de reconocimiento de sus antígenos (epítomos), respectivamente<sup>31,32</sup>.

Durante la reacción inmunológica el sitio de reconocimiento del Ab detecta específicamente el epítomo de su antígeno y se establecen enlaces no covalentes entre ambos sitios de reconocimiento. Dichos enlaces pueden ser a través de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Todas ellas tienen carácter cooperativo por lo que la existencia de múltiples interacciones débiles genera una considerable energía de enlace<sup>32</sup>. Este reconocimiento es la base de los métodos inmunoquímicos y, debido a su gran sensibilidad y especificidad, permite la determinación de antígenos presentes en diferentes tipos de muestras biológicas en concentraciones muy bajas (del orden de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  –  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A continuación, se describen brevemente los métodos basados en esta aproximación que se consideran de importancia actual en laboratorios bioquímicos para la identificación y cuantificación de proteínas.



**Figura 7:** Estructura de una inmunoglobulina G, anticuerpo típicamente empleado en estrategias basadas en la reacción antígeno-anticuerpo.

<sup>31</sup> S.R. Mikkelsen, E. Cortón, (2016). “Capítulo 5: Antibodies”. Bioanalytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 86-98.

<sup>32</sup> J. A. Owen, J. Punt, S.A. Stranford, (2013). “Capítulo 4: Antigens and Antibodies”. Kuby immunology, New York: WH Freeman, New York, 76-106.

### A.2.2.2. Inmunoensayos tipo ELISA

Los inmunoensayos se pueden clasificar de diferentes maneras: (1) dependiendo si necesitan o no un marcador para la detección de la reacción inmunológica, (2) atendiendo al formato del ensayo: competitivo o no competitivo, y (3) en función de si necesitan una etapa de separación para detectar la señal de la reacción: homogéneos (no es necesaria) o heterogéneos (sí es necesaria).

Por una parte, los inmunoensayos que son capaces por sí mismos de indicar la reacción antígeno-anticuerpo son las denominadas técnicas inmunoquímicas sin marcadores. En este grupo se incluyen la inmunoprecipitación, inmunoelectroforesis, ensayos de aglutinación, medidas de turbidez y ensayos de fijación del complemento. Sin embargo, estas técnicas sólo dan información cualitativa (i.e., si hay o no hay antígeno). Por el contrario, los métodos cuantitativos requieren de una estrategia que emplea marcadores, es decir, una molécula que se une covalentemente ya sea al Ab o al antígeno (siendo esta última menos frecuente) para poder visualizar la reacción inmunológica. Como marcadores en los inmunoensayos se emplean tradicionalmente fluoróforos, que generan una señal detectable medible por fluorescencia (fluoroimmunoensayo), o enzimas (enzimoinmunoensayo), las cuales catalizan reacciones que generan un producto coloreado que puede ser detectado espectrofotométricamente (región del UV/Vis).

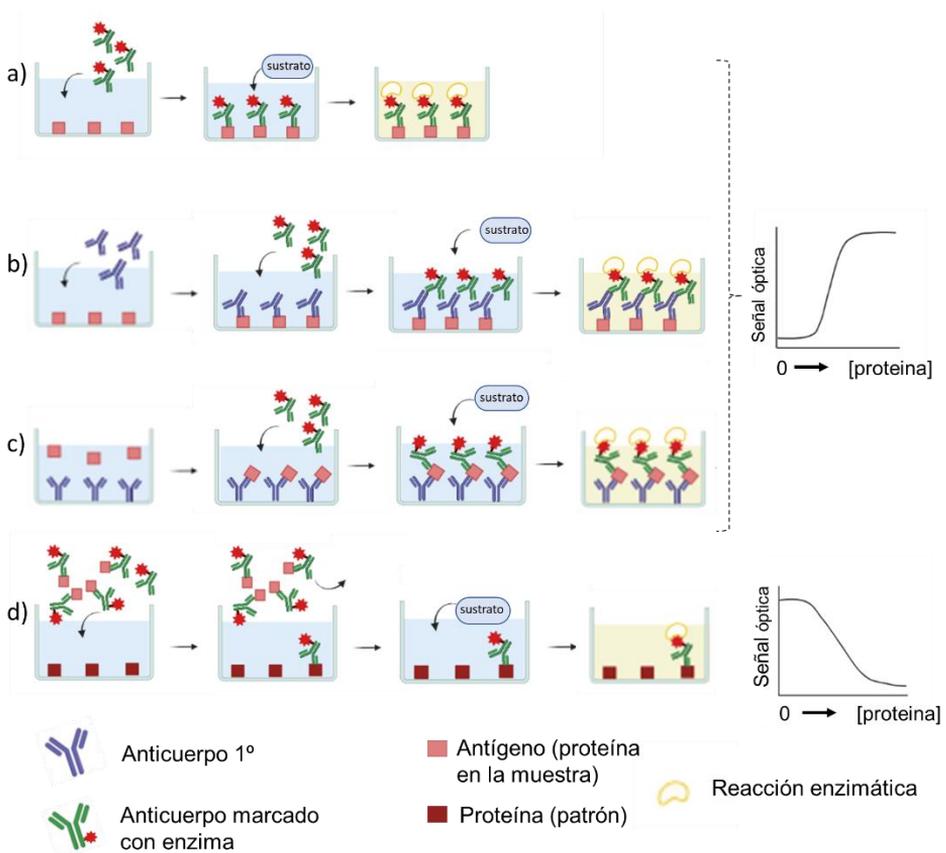
En este contexto se encuentra el ensayo inmunoenzimático (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), ampliamente utilizado y comercializado para la cuantificación de proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos específicos en una amplia variedad de fluidos y muestras biológicas lisadas y homogeneizadas<sup>33</sup>. En este caso, las enzimas más empleadas son la fosfatasa alcalina (AP, *alkaline phosphatase*) o la peroxidasa de rábano picante (HRP, *horse radish peroxidase*). Al añadir el sustrato de cada enzima, estas catalizan una reacción que genera un producto coloreado, el cual puede

---

<sup>33</sup> S.D. Gan, K.R. Patel, Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol.* 133, (2013), 1-3.

ser detectado espectrofotométricamente (p.ej., se mide la absorbancia a una determinada longitud de onda en un lector de placas). La señal se puede relacionar con la concentración del analito, por lo que es una técnica adecuada para fines cuantitativos.

Dependiendo de la combinación antígeno-anticuerpo, el inmunoensayo puede plantearse de distintas maneras, las cuales están resumidas en la **Figura 8**. Indicar que, en los ejemplos explicativos, el antígeno es el analito (proteína diana), y la marca (enzima) está enlazada covalentemente al Ab (sea este primario o secundario según el tipo de inmunoensayo).



**Figura 8:** Esquemas de los diferentes tipos de inmunoensayos ELISA. a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA tipo sándwich, y d) ELISA competitivo (esquema hecho con Biorender.com).

- a) **ELISA directo:** una proteína diana (patrón o analito presente en la muestra problema) se inmoviliza en la superficie de los pocillos de la placa y se incuba con un exceso de Ab específico marcado con la enzima. Tras un lavado (para eliminar el Ab en exceso), se añade el sustrato de la enzima y se detecta espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia del producto resultante. La señal es proporcional a la concentración de proteína inmovilizada.
- b) **ELISA indirecto:** el esquema es prácticamente igual al de un ELISA directo, pero es un Ab secundario el que está marcado con la enzima y se añade posteriormente al Ab primario. En este caso el Ab secundario ha de ser específico al animal huésped del Ab primario. La señal resultante es proporcional a la concentración de proteína.
- c) **ELISA tipo sándwich:** Un Ab específico (monoclonal) de una proteína diana se inmoviliza en la superficie de los pocillos de la placa (Ab de captura) y se incuba primero con la proteína diana (muestra o estándar). Posteriormente, se incuba con otro Ab específico de la proteína diana etiquetado con la enzima (Ab de detección, policlonal). Tras el lavado para eliminar el Ab en exceso y la adición del sustrato, se mide por espectrofotometría la señal resultante del producto que es proporcional a la concentración de proteína. Como se muestra en la **Figura 8**, el Ab inmovilizado (azul) y el Ab marcado con enzima (verde) deben reconocer diferentes epítomos de la proteína diana. Por tanto, en comparación con el ELISA directo o indirecto, este tipo de ensayo tiene una mayor especificidad.
- d) **ELISA competitivo** (competición por los sitios de unión antígeno-anticuerpo): Un estándar de la proteína diana se inmoviliza en la superficie de los pocillos de la placa y se incuba con muestras que contienen la proteína diana y una cantidad conocida de Ab específico marcado con la enzima. Tras la reacción inmunológica, lavado y adición del sustrato, se mide la señal resultante. Cuando la concentración de antígeno en la muestra es elevada, la cantidad de Ab-enzima libre que se une a la proteína estándar (pocillo) es baja

y, por lo tanto, el color es claro (p. ej., la señal detectada es pequeña). Por el contrario, cuando la concentración de antígeno en la muestra es menor, la cantidad de Ab-enzima unido a la proteína inmovilizada en el pocillo es mayor y el color que se observa es más oscuro, por lo que la señal detectada por espectrofotometría será también mayor. En este caso, la señal es inversamente proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

Aunque en estos ejemplos se describen enzimoensayos, la marca enzimática puede ser sustituida por otro tipo de molécula con propiedades fluorescentes (p.ej., fluoróforos) o incluso nanoestructuras. En la actualidad con el desarrollo de la nanociencia, el empleo de nanopartículas (con propiedades ópticas) en sustitución de las clásicas enzimas es un campo en un gran auge. Ejemplos del empleo de nanopartículas (NPs) se describen más adelante en la **Sección A.3.2.2** de la Tesis Doctoral. En particular, en dicha sección se describe el empleo de NPs como marcas para la detección elemental por espectrometría de masas. Sin embargo, algunas nanoestructuras poseen propiedades ópticas (p. ej. *quantum dots* o los nanoclústeres) que las hacen adecuadas para ser empleadas como marcas en inmunoensayos tipo ELISA.

### **A.2.2.3. Western blot**

La técnica de WB sigue siendo un ensayo muy utilizado para la identificación y cuantificación de proteínas de interés dentro de una muestra biológica compleja y está basada en el uso de anticuerpos específicos. La utilidad, el bajo coste y la accesibilidad del WB sumada a los avances en la especificidad de los anticuerpos y las nuevas estrategias de detección de la señal (p.ej., fluorescencia frente a las tinciones colorimétricas convencionales o quimioluminiscencia) permiten mejorar en sensibilidad, rango dinámico y facilidad de uso<sup>34</sup>.

El método tradicional de cuantificación de proteínas por WB implica: (1) lisado de las muestras (en el caso de tejidos, o células) con tampones adecuados con

---

<sup>34</sup> K. Oh, Technical considerations for contemporary western blot techniques. *Methods Mol Biol.* 2261, (2021), 457-479.

los que poder extraer las proteínas manteniendo sus sitios de reconocimiento intactos, (2) separación electroforética de las proteínas en función de su peso molecular, (3) transferencia de las proteínas estratificadas a una membrana de nitrocelulosa (NC) o fluoruro de polivinilideno (PVDF), y (4) inmunotinción empleando anticuerpos específicos marcados con enzimas o fluoróforos que permitan llevar a cabo la detección de la proteína diana (analito) mediante técnicas espectroscópicas (p.ej., absorbancia o fluorescencia). Sin embargo, la principal desventaja del WB es la necesidad de una normalización de los datos para dar valores cuantitativos fiables. Por lo general, la normalización de la señal de la proteína diana se puede realizar en base a proteínas “*housekeeping*” (proteínas que se expresan en el mismo nivel independientemente del experimento) o en base a la cantidad de proteína total. Con esta segunda opción se consigue aumentar la precisión de la determinación<sup>30,34</sup>.

Cabe mencionar los últimos avances alcanzados en la técnica de WB debido al gran interés que presentan actualmente los estudios a nivel celular. Con el auge de la miniaturización y el desarrollo de los sistemas de microfluídica se han conseguido miniaturizar el WB a nivel celular: *single cell*-Western blot. En este tipo de sistemas, se cargan células en una placa con micropocillos (1 célula por pocillo) o en sistemas de microfluídica donde las células son dispersadas por el sistema. De esta manera, se realiza la lisis, separación electroforética, inmunotinción y detección de cada célula de manera individual<sup>35</sup>. Con estas estrategias se intentan resolver los problemas de inespecificidad que presentan técnicas más establecidas para la visualización de proteínas a nivel celular como son la citometría de flujo o la inmunocitoquímica (ICC).

---

<sup>35</sup> C.C. Kang, K. Yamauchi, K., J. Vlassakis et al. Single cell-resolution western blotting. Nat Protoc. 11, (2016), 1508–1530.

---

#### A.2.2.4. Metodologías de *imaging* convencional: Inmunohistoquímica /Immunocitoquímica e inmunofluorescencia

En los apartados anteriores se han descrito metodologías de detección y determinación de biomoléculas diana en muestras biológicas lisadas y homogeneizadas. Es decir, estudios en los que se pierde información relevante al entorno biológico (i.e., resolución espacial). Los tejidos biológicos son conjuntos complejos compuestos por múltiples tipos de células que interactúan entre sí, por ello, para comprender la participación de biomoléculas diana en un determinado proceso, y por ende en el desarrollo de una enfermedad, es importante emplear herramientas de visualización que permitan la obtención de imágenes de los tejidos o poblaciones celulares con una elevada resolución espacial (nivel supracelular y nivel celular)<sup>36</sup>.

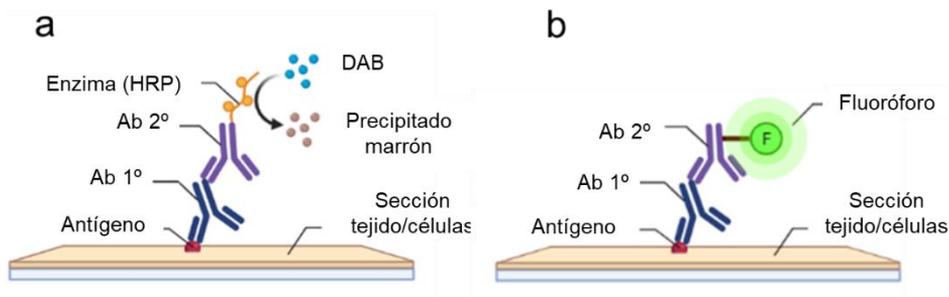
Tradicionalmente, los métodos más comunes y ampliamente utilizados en clínica son los métodos de inmunohistoquímica (IHC) convencional (con revelado por deposición cromogénica) e IHC con detección fluorescente, este último frecuentemente denominado como inmunofluorescencia (IF). Ambos métodos son específicos ya que se basan en la reacción de alta afinidad antígeno-anticuerpo. El antígeno suele ser una proteína o glicoproteína localizada en uno o más compartimentos subcelulares, como es la membrana celular, el citosol, las mitocondrias y/o el núcleo. Típicamente el protocolo general de ambos métodos es el siguiente (**Figura 9**): (1) un Ab primario reacciona específicamente con el antígeno (biomolécula diana localizada en un tejido o célula), y (2) un Ab secundario se emplea para visualizar la distribución de la molécula diana en el tejido o célula por medio de la detección de la señal resultante, la cual es diferente dependiendo del método. Por una parte, la molécula diana en IHC convencional es visualizada gracias al empleo de tintes cromogénicos tras reacciones enzimáticas. Es decir, en este caso el Ab secundario está marcado con una enzima. Por ejemplo, la diaminobencidina (DAB) y el 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) son los sustratos de la HRP, y *Fast Red* (sal sódica del ácido 4-amino-9,10-

---

<sup>36</sup> A.R. Kherlopian, T. Song, Q. Duan, M.A. Neimark, M.J. Po, J.K. Gohagan, A.F. Laine, A review of imaging techniques for systems biology. *BMC Syst Biol.* 2, (2008), 74.

dihidro-1,3-dihidroxi-9,10-dioxo-2-antracenosulfónico) y NBT/BCIP (cloruro de nitroazul de tetrazolio /5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) para la enzima AP. La imagen de la tinción resultante se puede observar fácilmente a través de un microscopio óptico<sup>37</sup>.

Por otro lado, el marcaje para medidas por IF utiliza moléculas que emiten fluorescencia (fluoróforos) bioconjugadas al Ab primario o secundario. En este caso, la señal se puede detectar con un microscopio de epifluorescencia convencional o empleando microscopía confocal (esta última permite obtener imágenes con mejor resolución)<sup>38,39</sup>.



**Figura 9:** Esquemas de los protocolos habitualmente empleados en IHC según el tipo de marcaje. a) IHC convencional empleando cromógenos, y b) inmunofluorescencia.

Se debe tener en cuenta que la aplicación final de cada una de las metodologías suele ser distinta dependiendo principalmente de la especificidad y resolución de imagen requerida en cada caso. Por una parte, la IHC convencional es adecuada para analizar la distribución de las células positivas a los marcadores en un área relativamente grande de las muestras de tejidos, mientras que el análisis con detección fluorescente es más adecuado para la localización subcelular de las moléculas diana<sup>38</sup>. Los métodos IHC e ICC son metodologías similares que se diferencian en el tipo de

<sup>37</sup> C.M. van der Loos. Chromogens in multiple immunohistochemical staining used for visual assessment and spectral imaging: the colorful future. *J Histotechnol.* 33, (2010), 31–40.

<sup>38</sup> H. Mori, R.D. Cardiff. Methods of immunohistochemistry and immunofluorescence: converting invisible to visible. In: J. Ursini-Siegel, N. Beauchemin, (eds) *The tumor microenvironment. methods in molecular biology.* Humana Press, New York, NY. 1458, (2016).

<sup>39</sup> J.W. Lichtman, J.A. Conchello, Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2 (2005), 910–919.

muestra. Mientras que en el caso de IHC se emplean secciones de tejido embebidos en parafina o congelados, en ICC lo que se miden son células intactas aisladas o en cultivos. Sin embargo, salvo algunas diferencias en el procesamiento de los tejidos (los cuales serán detallados más adelante en esta sección), las etapas experimentales son similares. Por ello, las diferencias de IHC convencional e IF son también aplicables a ICC (convencional e IF) y se hará referencia siempre a IHC (para poder seguir la explicación).

Ambas metodologías presentan sus pros y contras, los cuales están brevemente recogidos a continuación.

**IHC convencional:** La ventaja que presenta frente a la IF es que la señal es permanente y puede observarse mediante microscopía óptica convencional (instrumentación más sencilla). Sin embargo, diferencias en el tiempo de reacción enzimática para la deposición cromogénica (del sustrato) a menudo produce resultados de falsos positivos o negativos, lo que requiere controles estrictos para los procedimientos de la reacción enzimática. Además, es una estrategia de detección e identificación que depende en gran medida del operario.

**IHC con detección fluorescente:** Los enfoques basados en inmunofluorescencia presentan la ventaja de ser más selectivos y pueden detectar más de dos antígenos simultáneamente, además de que la resolución de las imágenes es claramente mejor debido en gran medida a los microscopios empleados (epifluorescencia o confocal). Sin embargo, aun sobreponiéndose a las desventajas de la IHC convencional, presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, la imposibilidad de detección simultánea (generalmente no más de siete parámetros por medida) debido a la superposición de las bandas de emisión de los fluoróforos empleados. Es decir, los amplios espectros de absorción y emisión limitan el rango dinámico y el número de moléculas

que se pueden visualizar simultáneamente<sup>40,41</sup>. En segundo lugar, las señales de fluorescencia pueden fotodegradarse (efecto *bleaching*) ya sea por un exceso de exposición a la fuente de luz de alta energía o por un almacenamiento prolongado. Por otro lado, algunos fluoróforos pueden provocar toxicidad, lo que limita su empleo en estudios *in vivo*. Además de esto, la detección fluorescente en muestras biológicas se ve fuertemente limitada por la autofluorescencia de la muestra que puede afectar a la detección selectiva de las marcas y por tanto imposibilitar la cuantificación<sup>42</sup>.

Cabe destacar que el gran auge y la necesidad de detección múltiple para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, ha hecho que se desarrollen estrategias de detección múltiple por IHC con detección fluorescente tanto para tejidos<sup>41</sup> como para células individuales (empleando la citometría de flujo), basadas en ciclos de tinción de anticuerpos, lo que permite aumentar ligeramente el número de moléculas detectables<sup>43</sup>. Sin embargo, este tipo de estrategias se ven limitadas a su vez por factores como la eliminación involuntaria de anticuerpos (provocada por los ciclos de tinción consecutivos), que dichos ciclos de tinción sean incompletos, o que puedan afectar a la antigenicidad de la biomolécula diana en la muestra<sup>44,45</sup>.

### □ Etiquetas fluorescentes empleadas en IF

En cuanto a los fluoróforos más empleados hoy en día en IF (**Figura 10**), las moléculas orgánicas de pequeño tamaño denominadas Alexa Fluor® (comercializadas por la casa comercial Thermo Fisher Scientific) son frecuentemente utilizadas

---

<sup>40</sup> J.C.T. Lim, J.P.S. Yeong, C.J.L. Lim, C.C.H. Ong, S.C. Wong, V.S.P. Chew, S.S. Ahmed, P.H.T., J. Iqbal, An automated staining protocol for seven-colour immunofluorescence of human tissue sections for diagnostic and prognostic use. *Pathology*, 50, (2018), 333-341.

<sup>41</sup> J.M. Taube, G. Akturk, M. Angelo, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer*. 8, (2020), 155.

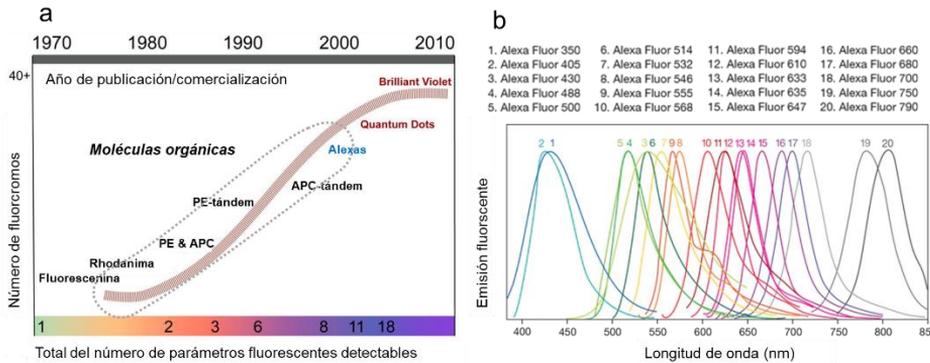
<sup>42</sup> D. Robertson, K. Savage, J.S. Reis-Filho, C.M. Isacke, Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. *BMC Cell Biol*. 9, (2008), 13.

<sup>43</sup> E. C. Stack, C. Wang, K.A. Roman, C.C. Hoyt, Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* 70, (2014), 46–58.

<sup>44</sup> M. J. Gerdes, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci*. 110, (2013), 11982–11987.

<sup>45</sup> W. Schubert, et al. Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol*. 24, (2006), 1270–1278.

como marcadores en células y tejidos. Los espectros de excitación y emisión de la serie Alexa Fluor® cubren el espectro visible y se extienden al infrarrojo, estando cada uno de ellos numerado según su máximo de excitación (en nm)<sup>46</sup>.



**Figura 10:** Fluoróforos empleados en IHC por IF. a) Línea temporal de los distintos fluoróforos empleados en IF (y citometría de flujo). Abreviaturas de las moléculas orgánicas de gran tamaño que poseen varios fluorocromos: phycoerythrin (PE), allophycocyanin (AP) – imagen adaptada de la ref 47, y b) Espectros de emisión de los fluoróforos Alexa Fluor® - imagen adaptada de la ref 48.

Hay numerosas aplicaciones de esta familia de moléculas fluorescentes para el marcaje de biomoléculas en tejidos y células. A modo de ejemplo, en la **Figura 11a** se muestra una aplicación para detección simultánea donde dos Alexa Fluor® diferentes (Alexa Fluor® 488 y 647) permiten la visualización de los antígenos GM130 y terbutalina en células HeLa.

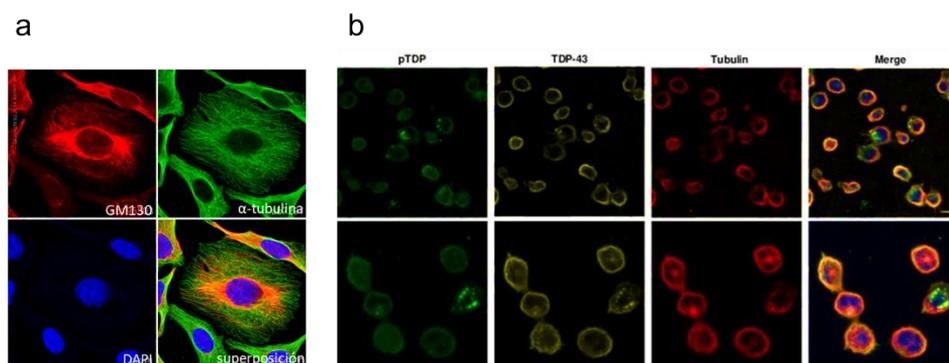
Por otra parte, con el desarrollo de la nanotecnología, se han introducido como marcas alternativas a los fluoróforos convencionales algunas nanoestructuras fluorescentes como los *quantum dots* (QDs). Desde sus primeras aplicaciones en este campo a principios de los años dos mil (**Figura 10**), el número de publicaciones ha

<sup>46</sup> J.E. Berlier, et al. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. *J Histochem Cytochem.* 51, (2003), 1699–1712.

<sup>47</sup> S.C. Bendall, G.P. Nolan, M. Roederer, P.K. Chattopadhyay. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* 33, (2012), 323-32.

<sup>48</sup> Thermo Fisher Scientific: Alexa Fluor dyes <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor/alexa-fluor-dyes-across-the-spectrum.html> (última consulta 02/05/2022)

crecido exponencialmente corroborando el enorme interés que presentan<sup>49,50</sup>. Los QDs son un tipo de nanomaterial semiconductor, con un tamaño entre 2-10 nm que ofrecen una serie de ventajas frente a las moléculas fluorescentes, como una alta emisión fotoluminiscente sintonizable, así como, una gran estabilidad. Sin embargo, una limitación es la posibilidad de producirse intermitencia en su emisión fluorescente<sup>51</sup>. Un ejemplo de *imaging* multiparamétrico con detección por fluorescencia empleando QDs se describe en el trabajo de Tosat-Bitrián et al.<sup>52</sup> donde se utilizan tres QDs bioconjugados con anticuerpos secundarios, los cuales emiten en la región del visible a 565, 605 y 655 nm (rojo, amarillo y verde, respectivamente), para la determinación de tres moléculas citoplasmáticas de linfoblastos (**Figura 11b**).



**Figura 11:** Ejemplos de *imaging* empleando etiquetas fluorescentes para la identificación de proteínas en células mediante inmunofluorescencia. En la imagen a) adaptada de la ref.53 se emplean dos marcas Alexa Fluor® 488 y 647 para detectar un biomarcador cis-golgi (GM130) en células HeLa (en rojo, Alexa® 647) y la  $\alpha$ -tubulina (en verde, Alexa® 488). En la imagen b) adaptada de la ref.52 se emplean diferentes QDs (emisión a 565, 605, y 655 nm siendo la detección verde, amarilla y roja, respectivamente) para identificar 3 biomarcadores diferentes en linfoblastos (fosfo TDP, TDP-43 y  $\alpha$ -tubulina).

<sup>49</sup> A.P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng.* 7, (2005), 55-76.

<sup>50</sup> R.D. Misra. Quantum dots for tumor-targeted drug delivery and cell imaging. *Nanomedicine* 3, (2008), 271-274.

<sup>51</sup> P.K. Chattopadhyay et al., Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med.* 12, (2006), 972-977.

<sup>52</sup> C. Tosat-Bitrián, A. Avis-Bodas, G. Porras, D. Borrego-Hernández, A. García-Redondo, A. Martín-Requero, V. Palomo. CdSe quantum dots in human models derived from ALS patients: characterization, nuclear penetration studies and multiplexing. *Nanomaterials* 11, (2021), 671.

<sup>53</sup> Abcam <https://www.abcam.com/alexa-fluor-647-gm130-antibody-ep892y-cis-golgi-marker-ab195303.html#lb> (última consulta: 02/05/2022)

### □ Procesamiento de las muestras para IHC e IF

Para realizar estudios de *imaging* de biomoléculas de manera correcta se requiere un procesamiento adecuado de la muestra. De este modo, en las secciones de tejido o los cultivos celulares se debe asegurar la integridad de su estructura (i.e., deben conservar las mismas propiedades que presentan en su estado nativo). Con este propósito se puede trabajar con muestras congeladas o fijadas en formaldehído y embebidas en parafina (FFPE, *formalin-fixed paraffin embedded*). Las muestras de tejidos así preparadas son posteriormente seccionadas, empleando instrumentos de corte en frío como el criotomo o a temperatura ambiente con un microtomo. Ambos realizan cortes de secciones de tejido de entre 5-30  $\mu\text{m}$  los cuales son depositados sobre portaobjetos donde posteriormente se lleva a cabo el protocolo de IHC. Adicionalmente, y debido a esta etapa previa de preparación de la muestra, se deben evaluar etapas de desenmascaramiento antigénico, para asegurar que los antígenos (biomoléculas diana) no se han visto afectados por los reactivos utilizados durante las etapas de preparación previas. Es decir, es necesario evaluar que los epítomos se encuentren disponibles e inalterados para ser detectados.

### **A.3. ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL**

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas de referencia para la identificación y cuantificación de proteínas. Sin embargo, la posibilidad de cuantificación puede estar limitada por la influencia de la matriz de la muestra durante la medida (i.e., efectos de matriz). De este modo, aunque técnicas de espectrometría de masas tan conocidas como el *Electrospray* (ESI-MS) o *Matrix-assisted laser dissociation/ionization* (MALDI-MS) se asocian habitualmente con la identificación y determinación de biomoléculas (aportan información estructural y molecular muy valiosa), no son

intrínsecamente cuantitativas<sup>54,55</sup>. Esto se debe a que en ambos casos se emplean fuentes de ionización “suaves” que no llegan a atomizar las muestras por completo. Este hecho, las hacen dependientes de la naturaleza química del analito y sobre todo de la matriz donde se encuentra<sup>56</sup>.

Sin embargo, en este contexto, la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se ha empleado ampliamente como una técnica de cuantificación de elementos traza y ultratrazas en matrices muy variadas en los últimos años. Esto se debe, entre otras características particulares que son detalladas más adelante, a su fuente de ionización “dura” que atomiza por completo los diferentes componentes de la muestra. En los siguientes apartados de la Tesis Doctoral, se da una visión general de la técnica ICP-MS, el porqué de su importancia en el campo clínico y biomédico, así como algunos ejemplos de aplicaciones relacionadas con el estudio de enfermedades. Posteriormente, se hará hincapié en las diferentes estrategias empleadas para la cuantificación de proteínas y biomoléculas en muestras biológicas.

### **A.3.1. Detección elemental empleando ICP-MS**

#### **A.3.1.1. Aspectos generales**

En el análisis por nebulización convencional mediante ICP-MS, la muestra en disolución es transformada en un aerosol líquido mediante un sistema de nebulización (nebulizador y cámara de nebulización). El aerosol es arrastrado por un flujo de gas portador (Ar) hasta alcanzar el plasma, a través del tubo central de la antorcha de cuarzo, donde se genera el plasma de Ar. La generación del plasma se produce cuando un flujo de gas es sometido a un campo electromagnético oscilante inducido por una corriente de radiofrecuencias. En el interior del plasma se alcanzan temperaturas de

---

<sup>54</sup> H. Bin, Y. Zhong-Ping, Detection of native proteins using solid-substrate electrospray ionization mass spectrometry with nonpolar solvents. *Anal Chim Acta* 1004, (2018), 51-57.

<sup>55</sup> D.J. Ryan, J.M. Spraggins, R.M. Caprioli. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. *Curr Opin Chem Biol.* 48, (2019) 64-72.

<sup>56</sup> F. Calderón-Celis, J. Ruiz-Enzinar. A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: Update and future perspective. *J of Proteom.* 198, (2019), 11-17.

5000-10000 K y, por ello, cuando el aerosol alcanza el plasma, este posee energía suficiente para provocar la: desolvatación, vaporización, atomización, e ionización de 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<sup>58,57</sup>. Los iones formados son conducidos hacia el 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 que mide su señal, la cual es proporcional a su abundancia en la muestra<sup>58</sup>.

Una de las características y ventajas principales que presenta el análisis por ICP-MS es el hecho de que la ionización del elemento/isótopo se puede considerar independiente de la estructura química del compuesto y a su vez independiente de la matriz de la muestra. Para fines cuantitativos es muy ventajoso puesto que no es necesario utilizar estándares específicos para cada analito, ya que cualquier compuesto que contenga el elemento detectable objetivo (a excepción de C, H, N y O, puesto que es una fuente de ionización a presión atmosférica) sería adecuado como estándar de cuantificación (p.ej., sales inorgánicas). Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta ventaja que presenta la técnica ICP-MS puede llegar a ser también una limitación en ciertas aplicaciones, ya que al atomizar por completo la muestra se pierde la información estructural de los analitos (importante en el caso de biomoléculas)<sup>56,58</sup>.

El uso del ICP-MS como una potente técnica analítica para la determinación de trazas y ultratrazas de elementos metálicos en muestras biológicas (de amplia naturaleza) no radica sólo en su posibilidad de cuantificación, sino también en otras excepcionales características analíticas, como son: su elevada especificidad y sensibilidad, tanto elemental como isotópica; sus bajos límites de detección en el rango de

---

<sup>57</sup> 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.

<sup>58</sup> J.R. Dean, *Practical Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Wiley, (2019).

los  $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$  -  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para la mayoría de los elementos de la tabla periódica; su capacidad multielemental y multiisotópica; su amplio rango dinámico lineal (6-8 órdenes de magnitud); y su gran robustez, ya que la señal obtenida es prácticamente independiente de la estructura del analito y la composición de la matriz<sup>58</sup>.

Adicionalmente, los avances llevados a cabo a lo largo de los años en cuanto al desarrollo de diferentes analizadores de masa, por ejemplo, el ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción, el ICP-MS de doble enfoque, o el ICP-MS/MS (en tándem), permiten reducir las interferencias espectrales, mientras que el ICP-MS con un analizador de masas tipo tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) permite el análisis multielemental casi simultáneo. Por otra parte, las mejoras en la electrónica para la adquisición rápida de datos hacen que el ICP-MS permita realizar análisis con resolución temporal, para aplicaciones como la detección de partículas individuales (*single particle*, sp) o de células individuales (*single-cell*, sc)<sup>59</sup>. Adicionalmente, los instrumentos con detección simultánea como es el ICP-MS tipo multicolector permiten obtener información de relaciones isotópicas de los elementos bajo estudio<sup>60</sup>.

Todos estos avances en la técnica ICP-MS han contribuido a mejorar la comprensión del papel de los elementos traza y ultratrazas en diferentes procesos biológicos, así como bajo diferentes condiciones médicas<sup>61</sup>.

### **A.3.1.2. ICP-MS como herramienta para la detección elemental e isotópica en el estudio de enfermedades**

Es bien sabido que el metabolismo de algunos elementos esenciales puede verse afectado por ciertas enfermedades, lo que provoca alteraciones en los niveles

---

<sup>58</sup>S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger L. Mueller, N. Jakubowski. Single-cell analysis by use of ICP-MS Check for updates. *J Anal At Spectrom.* 35, (2020), 1784-1813.

<sup>60</sup>K. Sullivan, J.A. Kidder, T. Junqueira, F. Vanhaecke, M. I. Leybourne, Emerging applications of high-precision Cu isotopic analysis by MC-ICP-MS. *Sci. Total Environ.* 45, (2022), 156084.

<sup>61</sup>K. Planeta, A. Kubala-Kukus, A. Drozd, A. et al. The assessment of the usability of selected instrumental techniques for the elemental analysis of biomedical samples. *Sci Rep* 11, (2021), 3704.

de concentración de los elementos. Por ello, su determinación en los fluidos biológicos puede proporcionar información sobre el estado de salud de los individuos<sup>62,63</sup>. Han sido numerosas las publicaciones que se centran en el estudio de alteraciones en la composición elemental de ciertos minerales esenciales para relacionarlos con enfermedades degenerativas, en especial centradas en el análisis de muestras de suero<sup>62,64</sup>. Sin embargo, otros fluidos como el líquido cefalorraquídeo, sinovial, peritoneal, los fluidos intraoculares o aquellos fluidos que no requieren una toma de muestra invasiva, como el líquido lagrimal, el líquido seminal, el sudor, la orina y la saliva han sido empleados en aplicaciones centradas en el análisis de fluidos cercanos al órgano concreto en el que se desarrolla la enfermedad<sup>65</sup>. Por ejemplo, Jünemann et al.<sup>66</sup> investigaron los niveles de Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Mn y Se en muestras de humor acuoso de pacientes con DMAE (DMAE seca *vs* controles) mostrando que pacientes con DMAE presentaban concentraciones significativamente mayores de Cd, Co, Fe y Zn, y menores de Cu al comparlas con muestras control (no diferencias para Se). Por otro lado, Aranaz et al.<sup>67</sup> han relacionado recientemente una concentración significativamente elevada de Mg y P en muestras de humor acuoso con una patología ocular como el glaucoma (pacientes con dos tipos de glaucoma *vs* pacientes control).

Paralelamente, resulta interesante también en este campo el análisis isotópico de alta precisión empleando ICP-MS tipo multicolector para la determinación de elementos minerales esenciales (p.ej., Ca, Mg, Cu, Fe, y Zn). En este caso los análisis

---

<sup>62</sup> P. Zatta, R. Lucchini, S.J. Van Rensburg, A. Taylor. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull.* 62, (2003), 15–28.

<sup>63</sup> G. Perry, L.M. Sayre, C.S. Atwood, R.J. Castellani, A.D. Cash, C.A. Rottkamp, et al. Copper in the aetiology of neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* 16, (2002), 339–52.

<sup>64</sup> T.N. Abduljabbar, B.L. Sharp, H.J. Reid, N. Barzegar-Befroeid, T. Peto, I. Lengye, Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro-sampling ICP-MS and sample dilution. *Talanta* 204, (2019), 663–666.

<sup>65</sup> M. Aranaz, E. Valencia-Agudo, L. Lobo, R. Pereiro, Microsampling of biological fluids for elemental and isotopic analysis by ICP-MS: strategies and applications for disease diagnosis. *J Anal At Spectrom.* 37, (2022), 50–68.

<sup>66</sup> A.G.M. Jünemann, P. Stopa, B. Michalke, A. Chaudhri, U. Reulbach, C. Huchzermeyer, U. Schlötzer-Schrehardt, F.E. Kruse, E. Zrenner, R. Rejdak Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exudative age-related macular degeneration: a case-control study. *PLoS One*, 8 (2013), 56734.

<sup>67</sup> M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, F. Vanhaecke. Homeostatic alterations related to total antioxidant capacity, elemental concentrations and isotopic compositions in aqueous humor of glaucoma patients. *Anal Bioanal Chem* 414, (2022), 515–524.

proporcionan otro enfoque para evaluar la influencia de las enfermedades en la homeostasis de los metales<sup>68</sup>. Varios estudios muestran que enfermedades como la cirrosis hepática y el cáncer hepatocelular, colorrectal y de mama dan lugar a variaciones isotópicas en las abundancias del Cu (<sup>63</sup>Cu y <sup>65</sup>Cu) al ser comparadas con las muestras de suero de un grupo control<sup>69-71</sup>.

Por tanto, la determinación tanto de elementos minerales esenciales como la medida precisa de las relaciones isotópicas en diferentes tipos de muestras biológicas puede contribuir a una mejor interpretación de los procesos bioquímicos dentro de nuestro cuerpo y servir como potenciales marcadores de diagnóstico/pronóstico de enfermedades.

### **A.3.2. Determinación de biomoléculas mediante ICP-MS: estrategias de marcaje**

En el apartado anterior se ha mostrado el potencial del ICP-MS como técnica de análisis elemental, sin embargo, también es posible obtener información sobre diferentes biomoléculas presentes en matrices biológicas. Por ejemplo, midiendo heteroátomos presentes de forma natural en las biomoléculas como el azufre, el fósforo (en proteínas fosforiladas), el selenio (en las selenoproteínas) y otros metales como el cobre, el zinc y el hierro (en las metaloproteínas)<sup>72</sup>. También se puede realizar un etiquetado elemental (o isotópico) exógeno con un metal o metaloide para que la

---

<sup>68</sup> M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, H. González-Iglesias, F. Vanhaecke, R. Pereiro, Pilot study of homeostatic alterations of mineral elements in serum of patients with age-related macular degeneration via elemental and isotopic analysis using ICP-mass spectrometry. *J Pharma Biomed* 177, (2020), 112857.

<sup>69</sup> M. Costas-Rodríguez, Y. Anoshkina, S. Lauwens, H. van Vlierberghe, J. Delanghe, F. Vanhaecke. Isotopic analysis of Cu in blood serum by multi-collector ICP-mass spectrometry: a new approach for the diagnosis and prognosis of liver cirrhosis? *Metallomics* 7, (2015), 491-498.

<sup>70</sup> V. Balter, A. Nogueira da Costa, V.P. Bondanese, K. Jaouen, A. Lamboux, S. Sangrajang, N. Vicent, F. Fourel, P. Télouk, M. Gigou, C. Lécuyer, P. Srivatanakul, C. Bréchet, F. Albarède, P. Hainaut Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proc Nat Acad Sci USA*. 112, (2015), 982-985.

<sup>71</sup> P. Télouk, A. Puisieux, T. Fujii, V. Balter, V.P. Bondanese, A.P. Morel, G. Clapisson, A. Lamboux, F. Albarède Copper isotope effect in serum of cancer patients: A pilot study. *Metallomics* 7, (2015), 299-308.

<sup>72</sup> A. Tholey, D. Schaumlöffel, Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *TrAC Trends Analyt Chem*. 29, (2010), 399-408.

molécula o moléculas de interés sean más fácilmente detectables por ICP-MS<sup>56</sup>. Sin embargo, la complejidad intrínseca de las muestras biológicas (fluidos, células, y tejidos) hace que la determinación de biomoléculas mediante la medición de elementos, tanto endógenos como exógenos, requiera del aislamiento riguroso del analito mediante técnicas cromatográficas o electroforéticas previamente a la detección por ICP-MS.

Alternativamente, como estrategia para la cuantificación de biomoléculas por ICP-MS, se presenta el empleo de las reacciones antígeno-anticuerpo para detectar específicamente la biomolécula diana. Para ello se requiere del etiquetado de un Ab de reconocimiento con un elemento metálico o con un nucleído estable detectable directamente por ICP-MS<sup>73,74</sup>. Este tipo de metodologías son conocidas como las estrategias basadas en el uso de inmunosondas metálicas específicas de proteínas diana.

Para entender este tipo de estrategias de marcaje, en la **Figura 12** se representa a modo de resumen las principales etapas a realizar. Estas engloban en una primera etapa (i) la selección/construcción de la inmunosonda metálica (p.ej., un Ab) etiquetada con una molécula que contiene uno o varios átomos de un metal determinado (p.ej., un complejo metálico, un polímero que contiene varios complejos metálicos o una nanopartícula), así como su correcta purificación y caracterización; (ii) a continuación tiene lugar el inmunoensayo para reconocer el analito por la inmunosonda (reacción antígeno-anticuerpo), y finalmente (iii) se realiza la detección del metal de la marca por ICP-MS. Este último paso dependerá de la naturaleza de la muestra (p.ej., fluido, digerido de una muestra biológica, suspensión celular, sección de tejido, células fijadas, etc.) así como del tipo de información requerida. Por ejemplo, un cultivo celular puede ser digerido y homogeneizado para su detección por nebulización

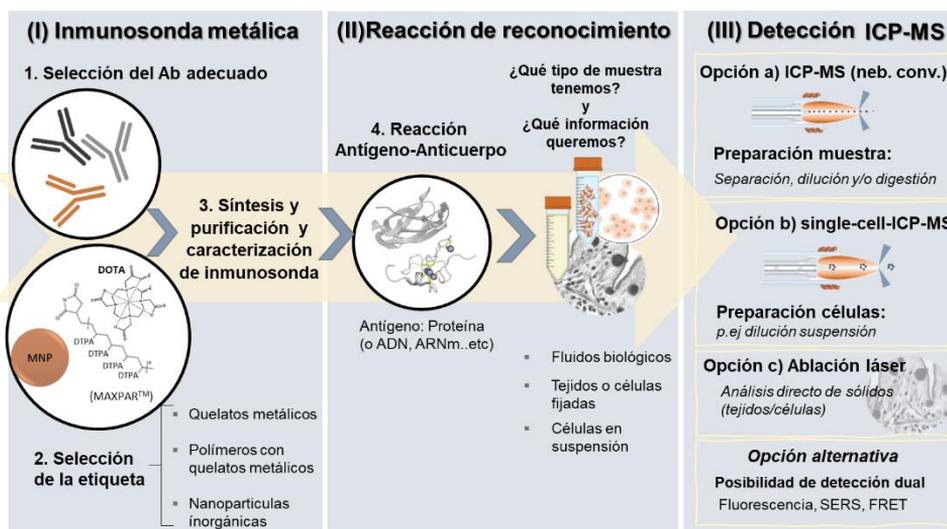
---

<sup>73</sup> R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou, Y. Liv, Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review. *Mass Spectrom Rev.* 33, (2014), 373-393.

<sup>74</sup> C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays. *Spectrochim Acta B* 76, (2012), 27-39.

convencional-ICP-MS. Por otro lado, las células pueden ser suspendidas en un tampón salino para introducirlas de manera intacta en un sistema de *single cell*-ICP-MS para su detección individual, o bien las células pueden ser fijadas en un porta muestras y medidas con un sistema de ablación láser (LA) acoplado al ICP-MS para determinar la distribución de las proteínas en las células. En todos los casos (ICP-MS, sc-ICP-MS, y LA-ICP-MS), la identificación de la proteína diana en las células se lleva a cabo detectando el metal empleado en la etiqueta de la inmunosonda.

Adicionalmente, existen ciertas etiquetas metálicas que poseen marcas con diferentes propiedades fisicoquímicas que permiten llevar a cabo una detección multi-modal de las proteínas; por ejemplo, hay marcas con propiedades fluorescentes y electroquímica que permiten una detección por MS, fluorescencia y voltamperometría cíclica.



**Figura 12:** Esquema de las etapas de la estrategia analítica de marcaje a seguir con una inmunosonda para la determinación de biomoléculas por ICP-MS: (I) preparación de la inmunosonda metálica, (II) reacción de reconocimiento de la proteína, y (III) posibilidades de detección por ICP-MS.

### A.3.2.1. Etiquetas metálicas empleadas para detección de proteínas por ICP-MS

El primer trabajo utilizando una etiqueta metálica para la detección de biomoléculas por ICP-MS fue publicado en 2001 por Zhang et al. para la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero humano<sup>75</sup>. En dicho trabajo se hizo uso de la estreptavidina (SA) marcada con un átomo de europio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) para generar la inmunosonda metálica [Ab biotinilado anti-TSH]-[ $\text{Eu}^{3+}$ -SA]. En esta aplicación, el analito fue capturado por el Ab anti-TSH inmovilizado en un soporte. A continuación, se añadieron el Ab anti-TSH biotinilado y la estreptavidina (SA) marcada con  $\text{Eu}^{3+}$  para formar el inmunocomplejo “[Ab de captura]-[TSH<sub>analito</sub>]-[Ab biotinilado anti-TSH]-[ $\text{Eu}^{3+}$ -SA]”. Tras eliminar los reactivos no unidos, el Eu unido al inmunocomplejo se extrajo añadiendo ácido nítrico diluido y posteriormente se midió por ICP-MS. En este trabajo, la señal de  $\text{Eu}^{3+}$  era proporcional a la concentración de la molécula TSH.

A raíz de este pionero trabajo, se han propuesto una gran variedad de etiquetas metálicas para desarrollo de las inmunosondas específicas y su uso en la detección de biomoléculas por ICP-MS. Sin embargo, las etiquetas deben poseer unas ciertas características para poder ser consideradas buenas candidatas en este tipo de aplicaciones con detección por ICP-MS:

- En cuanto al **metal/elemento que compone la etiqueta** se pueden considerar dos aspectos:
  - a) teniendo en cuenta el tipo de muestras, la etiqueta debe ser un elemento que no esté presente en las muestras biológicas (i.e., se deben evitar elementos constituyentes como los minerales esenciales: Fe, Zn, Cu, etc.), y

---

<sup>75</sup> C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum. *J Anal At Spectrom.* 16, (2001), 1393-1396.

- b) atendiendo a la técnica de detección, la etiqueta ha de cumplir los siguientes requisitos: (i) la eficiencia de ionización en ICP-MS del isótopo debería ser elevada, (ii) se deben evitar isótopos que presenten interferencias espectrales, y (iii) en cuanto a las abundancias isotópicas se puede elegir un elemento con un isótopo muy abundante para su monitorización con el objetivo de maximizar la sensibilidad de la detección o bien optar por la elección de un elemento que presente varios isótopos con la posibilidad de realizar detección múltiple.
- En cuanto a la **estructura de la etiqueta**, con el objetivo de conseguir una gran amplificación de la señal, lo ideal es optar por aquellas marcas que estén constituidas por varios átomos de un mismo metal a la vez que presenten un volumen reducido. Es decir, que la relación metal detectable:volumen de la etiqueta sea máxima. Este aspecto es crítico en la funcionalidad de la inmunosonda. Al unir la etiqueta metálica a la molécula de reconocimiento, cuanto mayor sea el volumen de la etiqueta mayor impedimento estérico, lo que conlleva a una mayor posibilidad de bloqueo o impedimento en el sitio de unión el Ab, dificultando la detección de la biomolécula de interés (antígeno).

Teniendo estas características en cuenta, a continuación, se describirán varios ejemplos mostrando las etiquetas más habitualmente empleadas en este tipo de estrategias para la identificación y cuantificación de biomoléculas empleando ICP-MS.

El empleo de lantánidos (Ln) como elementos detectables en ICP-MS, como usaron Zhang et al.<sup>75</sup>, es una estrategia muy recurrida ya que su uso está avalado por tres motivos principales. Por una parte, las muestras biológicas no presentan Ln en su matriz, por lo que los fondos de detección para los Ln son insignificantes en el ICP-MS. Además, las elevadas eficiencias de ionización de los Ln en ICP-MS<sup>76</sup>, así

---

<sup>76</sup> 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. Trends Anal Chem 72, (2015), 45-52.

como la posibilidad de análisis múltiple (la serie de los Ln consta de 14 elementos estables y sus correspondientes isótopos) hacen que estos elementos sean ideales para su detección por ICP-MS. En este sentido, el marcaje de un determinado Ab con Ln se realiza por medio de compuestos quelantes bifuncionales que poseen grupos reactivos que permiten la unión a la biomolécula de reconocimiento<sup>77</sup>. En cuanto al grupo quelante, los más recurridos son el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), los cuales forman complejos de coordinación muy estables con iones trivalentes de los Ln en un amplio rango de pH y de concentraciones salinas<sup>78-80</sup> (**Figura 13**). Sin embargo, estas estructuras sólo adoptan un átomo por complejo quelante, por lo que, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la detección, se ha propuesto el uso de microesferas de polímero (~ 2 µm de diámetro) que contienen varios Ln<sup>81</sup>. La alternativa más recurrida en la actualidad está basada en el uso de polímeros que contienen varias unidades de DOTA<sup>82</sup> o DTPA (**Figura 13**). Este último enfoque ha dado lugar a los reactivos de etiquetado comerciales denominados MAXPAR®, que se utilizan en múltiples aplicaciones por detección con ICP-MS. En concreto, el auge del uso de los reactivos MAXPAR® ha ido de la mano con el desarrollo de las técnicas de análisis casi simultáneo por espectrometría de masas (citometría de masas, CyTOF™) puesto que se disponen de hasta 34 isótopos de Ln que permite la detección multiparamétrica<sup>83</sup>.

---

<sup>77</sup> A. Tholey, D. Schaumlöffel, Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal Chem.* 29, (2010), 399-408.

<sup>78</sup>G. Schwarz, L. Mueller, S. Becka, M.W. Linscheid, DOTA based metal labels for protein quantification: a review. *J Anal At Spectrom.* 29, (2014), 221-233.

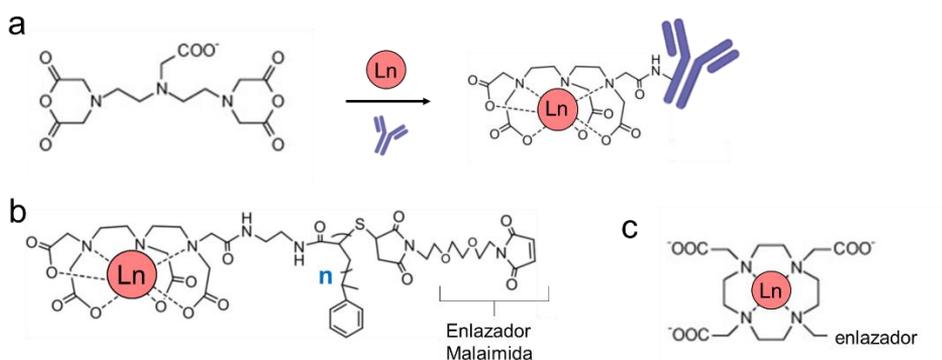
<sup>79</sup> N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatachalam, A. von Bohlen, P.H. Roos, A. Manz, Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 23, (2008), 1497-1507.

<sup>80</sup> C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 83, (2011), 8177-8183.

<sup>81</sup> A.I. Abdelrahman, S. Dai, S.C. Thickett, O. Ornatsky, D. Bandura, V. Baranov, M.A. Winnik, Lanthanide-containing polymer microspheres by multiphase dispersion polymerization for highly multiplexed bioassays. *J Am Chem Soc.* 131, (2009), 15276-15283.

<sup>82</sup> X. Lou, G. Zhang, I. Herrera, R. Kinach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angew Chem Int.* 46, (2007), 6111-6114.

<sup>83</sup> D.R. Bandura, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J.E. Dick, S.D. Tanner, Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay



**Figura 13:** Estructuras de los compuestos quelantes de metales más comúnmente empleados en aplicaciones de detección de biomoléculas por ICP-MS: a) DTPA, b) polímero formado por unidades de DTPA comercialmente distribuido como MAXPAR® y c) DOTA

### A.3.2.2. Nanopartículas metálicas como etiquetas elementales

Con el desarrollo y últimos avances en el campo de la nanotecnología se ha impulsado enormemente el uso de partículas inorgánicas de tamaño nanométrico, NPs, como etiquetas para la detección por ICP-MS. De hecho, paralelamente al uso de Ln como marca, en el año 2002 se publicaron un par de trabajos utilizando NPs de oro (AuNPs)<sup>84,85</sup>.

El empleo de NPs metálicas como etiquetas elementales ha supuesto una mejora significativa frente a otro tipo de marcas, superando por ejemplo los impedimentos estéricos que pueden presentar el uso de los polímeros. Además, en comparación con los quelatos y los polímeros (que contienen una parte no metálica considerable), la alta sensibilidad esperada por el uso de NPs metálicas se atribuye a la elevada proporción de átomos metálicos detectados por ICP-MS en relación con el tamaño de la etiqueta. Es importante mencionar que la sensibilidad conseguida por

based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 81, (2009), 6813-6822.

<sup>84</sup> C. Zhang, Z. Zhang, B. Yu, J. Shi, X. Zhang, Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 74, (2002), 96-99.

<sup>85</sup> V.I. Baranov, Z. Quinn, D.R. Bandura, S.D. Tanner, A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. *Anal Chem.* 74, (2002), 1629-1636.

ICP-MS empleando NPs se verá afectada por las características de detección del metal seleccionado para la medida (p.ej., la eficiencia de ionización) y por el número de átomos de metal por etiqueta. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la unión de las NPs de manera incontrolada a un Ab puede producir efectos negativos en el comportamiento fisicoquímico de dicho Ab en comparación con etiquetas más pequeñas como son los quelatos metálicos simples (DOTA o DTPA). Entre las posibles limitaciones que presenta el empleo de las NPs cabe mencionar la posible disminución de la eficacia del Ab como biomolécula de reconocimiento debido al bloqueo de los sitios de reconocimiento o a restricciones de accesibilidad a la biomolécula diana (particularmente críticas en el caso de los tejidos biológicos)<sup>86</sup>. Por tanto, en la selección de la marca se debe llegar a un compromiso entre poder de amplificación y funcionalidad de la inmunosonda metálica.

Tal y como se adelantó en el esquema de la **Figura 12**, una de las etapas clave en ciertas aplicaciones basadas en esta estrategia es la determinación de la composición elemental de las NPs así como la determinación de la relación NPs:Ab o el factor de amplificación (i.e., estequiometría de la inmunosonda: número de átomos de metal por molécula de Ab disponible). La caracterización de las inmunosondas nos ayuda a desarrollar procedimientos reproducibles no solo entre diferentes tandas de síntesis sino también entre diferentes laboratorios. Por tanto, tras la síntesis de las NPs y de la inmunosonda (NPs:Ab) se recomienda una correcta caracterización de la misma. Otra etapa clave es la purificación correcta de las inmunosondas tras su síntesis. Debido a la importancia que presentan estas etapas en el desarrollo de metodologías analíticas de cuantificación de biomoléculas por ICP-MS, a continuación, se describen las técnicas analíticas más comúnmente empleadas, así como diferentes aproximaciones de bioconjugación para realizar la síntesis de inmunosondas con marcas metálicas.

---

<sup>86</sup> M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Anal Bioanal Chem.* 411, (2019), 549-558.

### A.3.2.3. Estrategias de purificación y caracterización de NPs

Las NPs sintetizadas en el laboratorio (y, en muchos casos, las NPs comerciales) deben ser purificadas para eliminar los restos de otros reactivos que podrían interferir en sus futuras aplicaciones. Para ello, la centrifugación, la ultrafiltración o la diálisis son las técnicas de purificación más habitualmente empleadas. Además, para ciertas aplicaciones es conveniente aislar las NPs monodispersas de las NPs polidispersas y en este caso se requieren otro tipo de técnicas de separación más potentes; con este propósito, las estrategias más recurridas son la cromatografía<sup>87,88</sup>, la electroforesis<sup>89</sup> y el fraccionamiento asimétrico por flujo de campo (*asymmetrical flow field flow fractionation*, AF4)<sup>88,90</sup>.

En cuanto a la caracterización de las NPs, ésta puede realizarse en función de varios parámetros, como son el tamaño medio, distribución de tamaños, estado de agregación/aglomeración, forma, estructura cristalina, estabilidad, solubilidad, composición química, grupos funcionales, número de átomos por NP, concentración, etc. Para llevar a cabo estas caracterizaciones se emplean técnicas de dispersión (p.ej., dispersión de luz dinámica - DLS, Potencial zeta, y Difracción de Rayos X), microscopía electrónica, técnicas espectroscópicas (p.ej., absorbancia y luminiscencia), análisis térmico y MS (p.ej., ICP-MS, o electrospray-MS)<sup>91</sup>. Cabe destacar además que los recientes avances instrumentales y los nuevos métodos desarrollados en la técnica de *single particle*-ICP-MS permiten la medición del tamaño y la distribución de

---

<sup>87</sup> L. Pitkanen, A.R.M. Bustos, K.E. Murphy, M.R. Winchester, A.M. Striegel, Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC/ICP-MS and HDC/ICP-MS) and quasi-elastic light scattering (HDC/QELS). *J Chromatogr A* 1511, (2017), 59-67.

<sup>88</sup> E.P. Gray, T.P. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 27, (2012), 1532-1539.

<sup>89</sup> N. Surugau, P.L. Urban, Electrophoretic methods for separation of nanoparticles. *J Separ Sci.* 32, (2009), 1889-1906.

<sup>90</sup> M. Menendez-Miranda, M.T. Fernandez-Arguelles, J.M. Costa-Fernandez, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Elemental ratios for characterization of quantum-dots populations in complex mixtures by asymmetrical flow field flow fractionation online coupled to fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 839, (2014), 8-13.

<sup>91</sup> K.E. Sapsford, K.M. Tyner, B.J. Dair, J.R. Deschamps, I.L. Medintz, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Anal Chem.* 83, (2011), 4453-4488.

tamaño de NPs en suspensión, así como la concentración de NPs<sup>92,93</sup>. La intensidad de la señal es función del tamaño de la NP y el número de eventos (o *spikes*) está correlacionado con el número de partículas. Además, el acoplamiento en línea de técnicas de separación al *sp*-ICP-MS, como la electroforesis capilar<sup>94</sup> o el AF4<sup>95</sup>, puede llegar a distinguir las NPs por su forma o caracterizar NPs con diferentes recubrimientos.

#### A.3.2.4. Estrategias de bioconjugación de NPs

La unión no covalente es una forma sencilla de etiquetar biomoléculas con NPs, ya que éstas se pueden unir electrostáticamente, a través de interacciones hidrofóbicas, o por afinidad de unión específica como las interacciones "avidina-biotina" y "SA-biotina"<sup>96</sup>. Alternativamente, las principales estrategias de bioconjugación incluyen la unión directa de una biomolécula tiolada a la superficie de las NPs (normalmente de Au)<sup>97</sup> o a través de reactivos intermedios como el enlace entre una amina y un ácido carboxílico (reacción de "la carbodiimida")<sup>98</sup>. Por otro lado, la reacción de

---

<sup>92</sup> M.D. Montano, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials. *Anal Bioanal Chem.* 408, (2016), 5053-5074.

<sup>93</sup> F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem.* 86, (2013), 2270-2278.

<sup>94</sup> B. Franze, I. Streng, C. Engelhar, Separation and detection of gold nanoparticles with capillary electrophoresis and ICP-MS in single particle mode (CE-SP-ICP-MS). *J Anal At Spectrom.*, 32, (2017), 1481.

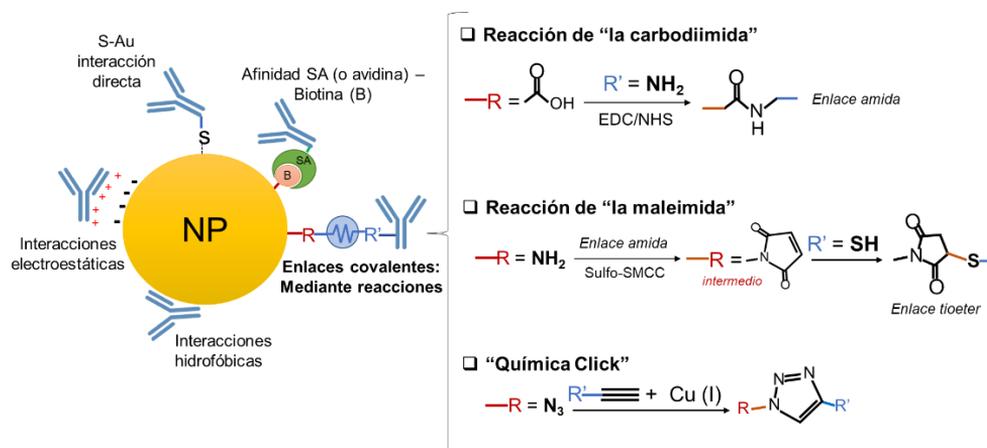
<sup>95</sup> K.A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki, S.A. Pergantis, Detection and quantification of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations using asymmetric flow field-flow fractionation online with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 88, (2016), 4909-4916.

<sup>96</sup> Q. He, Z. Zhu, L. Jin, L. Peng, W. Guo, S. Hua, Detection of HIV-1 p24 antigen using streptavidin-biotin and gold nanoparticles-based immunoassay by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 29, (2014), 1477-1482.

<sup>97</sup> J.R. Reimers, M.J. Ford, A. Halder, J. Ulstrup, N.S. Hush, Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)ethyl species and are destroyed when Au(I)ethiolates form. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113, (2016), 1424-1433.

<sup>98</sup> F. Song, W.C.W. Chan, Principles of conjugating quantum dots to proteins via carbodiimide chemistry. *Nanotechnology* 22, (2011), 494006.

bioconjugación puede realizarse empleando la reacción de “la maleimida” para con-  
 jugar aminas primarias con grupos tiol<sup>99</sup> y la “química Click”<sup>100</sup>. En la **Figura 14** se  
 esquematiza la base de las reacciones de bioconjugación descritas referidas al marcaje  
 de una biomolécula con una nanopartícula metálica.



**Figura 14:** Resumen de diferentes aproximaciones de etiquetado de anticuerpos con NPs metálicas.

Para la síntesis de las inmunosondas marcadas es importante elegir la estra-  
 tegia de bioconjugación adecuada para unir las moléculas de reconocimiento a las  
 NPs. Aunque las biomoléculas se adsorben espontáneamente a la superficie de las  
 NPs debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, esta estrategia presenta  
 varias limitaciones como la necesidad de una alta concentración de la molécula de  
 reconocimiento, la orientación aleatoria, la unión inestable en función del pH y la  
 fuerza iónica, y la debilidad de la interacción que puede provocar sustitución por otras  
 moléculas<sup>101</sup>. El sistema avidina-biotina y las estrategias covalentes mediante reaccio-  
 nes intermedias (p.ej., las estrategias maleimida o carbodiimida) permiten resolver en

<sup>99</sup> J. Pichaandi, G. Zhao, A. Bouzekri, E. Lu, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Lanthanide nanoparticles for high sensitivity multiparameter single cell analysis. Chem Sci. 10, (2019), 2965-2974.

<sup>100</sup> N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. Nano Today 5, (2010), 213-230.

<sup>101</sup> M.H. Jazayeri, H. Amani, A.A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, B. Sedighimoghaddam, Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sens Bio-Sens Res. 9, (2016), 17-22.

gran medida los inconvenientes anteriormente citados. Sin embargo, en algunos casos una incorrecta bioconjugación de las sondas de reconocimiento en la superficie de las NPs (debido a la incapacidad de controlar la orientación de la biomolécula en la superficie de la NP) puede ser una desventaja,<sup>102</sup> ya que la orientación de la unión maximiza la disponibilidad funcional de la sonda de reconocimiento<sup>103</sup>. En este contexto, el uso de la “química de Click” (generalmente basada en una reacción de cicloadición [3 + 2] entre un alquino terminal y un azida utilizando Cu (I) como catalizador) es una estrategia a la que se recurre en los últimos años ya que permite un mayor control sobre la orientación de la unión<sup>102,104</sup>.

#### **A.3.2.5. Caracterización de la inmunosonda metálica**

Las biomoléculas marcadas que servirán como sondas de detección deben aislarse del exceso de reactivos y subproductos, y deben caracterizarse adecuadamente antes de su uso posterior. El aislamiento de los productos del exceso de reactivos puede llevarse a cabo mediante técnicas de separación similares a las empleadas para la purificación de las NPs, como son la ultrafiltración, electroforesis, cromatografía, AF4, etc.<sup>91</sup>. Por otro lado, la eficacia o rendimiento de la reacción puede calcularse midiendo las concentraciones de metal en las fracciones separadas/aisladas (i.e., las NPs libres y las NPs bioconjugadas) utilizando ICP-MS.

Además, para llevar a cabo una caracterización completa de la inmunosonda y conocer su factor de amplificación, se debe conocer: la estequiometría de la inmunosonda (número de NPs por inmunosonda), la actividad de la biomolécula de reconocimiento tras la unión de las NPs, y la estabilidad con el tiempo de la sonda marcada a lo largo de la aplicación prevista. La separación de las inmunosondas marcadas con

---

<sup>102</sup> M.K. Greene, D.A. Richards, J.C.F. Nogueira, K. Campbell, P. Smyth, M. Fernandez, J.S. Christopher, V. Chudasama, Forming next generation antibody-nanoparticle conjugates through the oriented installation of non-engineered antibody fragments. *Chem Sci.* 9, (2018), 79-87.

<sup>103</sup> S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties. *Nat Protoc.* 3, (2008), 314-320.

<sup>104</sup> Y. He, D. Esteban-Fernandez, M.W. Linscheid, Novel approach for labeling of biopolymers with DOTA complexes using in situ click chemistry for quantification. *Talanta* 134, (2015), 468-475.

diferentes estequiometrías puede resultar compleja<sup>105</sup> y, por ello, de cara a su aplicación se suele emplear el valor promedio de la relación estequiométrica NPs:Ab. Dicha relación puede estimarse determinando las concentraciones molares de Ab y NPs en la sonda etiquetada una vez purificada. Para ello, los ensayos ELISA cuantitativos (en el caso de antígenos o anticuerpos unidos al bioconjugado) se emplean para determinar la concentración de biomoléculas disponibles en la inmunosonda marcada para su posterior reacción con el analito<sup>106</sup>.

### **A.3.2.6. Empleo de las NPs como marcas de inmunosondas: aplicaciones para la determinación de proteínas**

Las NPs más usadas en combinación con ICP-MS para determinación de biomoléculas han sido sin duda las NPs metálicas (MNPs) y en especial las de oro (AuNPs). En este contexto, las AuNPs se han bioconjugado a diferentes anticuerpos para la determinación de antígenos considerados en muchos de los casos biomarcadores de enfermedades, utilizando para ello como muestra diferentes fluidos biológicos. La detección de estos biomarcadores se presenta generalmente como un reto, puesto que sus concentraciones en las muestras biológicas suelen ser bajas. Por ello, el empleo de NPs como etiquetas se presenta como una alternativa ventajosa para lograr una amplificación significativa de la señal y, por lo tanto, conseguir una detec-

---

<sup>105</sup> D. Bouzas-Ramos, J.I. García-Alonso, J.M. Costa-Fernandez, J.R. Encinar, Quantitative assessment of individual populations present in nanoparticle-antibody conjugate mixtures using AF4-ICP-MS/MS. *Anal Chem.* 91, (2019), 3567-4574.

<sup>106</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. Gonzalez-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Anal Chem.* 90, (2018), 12145-12151.

ción sensible. Por ejemplo, las AuNPs se han empleado con éxito para la cuantificación de biomarcadores tumorales (p.ej., PSA<sup>107</sup>, CA19-9<sup>108</sup>, CEA<sup>109</sup> y AFP<sup>110</sup>), bacterias (p.ej., *E. coli*<sup>111</sup> o *salmonella*<sup>112</sup>), virus y viriones (p.ej., viriones de la gripe aviar A (H9N2)<sup>113</sup>), y toxinas (p.ej., aflatoxina M1<sup>114</sup>).

El uso de otro tipo de NPs inorgánicas como etiquetas de un Ab ha sido también investigado en los últimos años y se pueden encontrar aplicaciones utilizando QDs, NPs de conversión ascendente (UCNPs)<sup>115</sup> o NPs de sílice dopadas con metales<sup>116</sup>. En este contexto, los QDs ofrecen la posibilidad de llevar a cabo una detección dual de las biomoléculas objetivo, es decir, además de la detección elemental por MS, permite la detección por emisión de fluorescencia<sup>117</sup>. Por ejemplo, Chen et al. en una primera aplicación, hacen uso de los CdSe@ZnS QDs como etiquetas

---

<sup>107</sup> J.M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 301, (2003), 1884.

<sup>108</sup> J. Ko, H.B. Lim, Multicore magnetic nanoparticles (MMNPs) doped with Cs and FITC for the determination of biomarker in serum using ICP-MS. *Anal Chem.* 86, (2014), 4140-4144.

<sup>109</sup> X. Zhang, B. Chen, M. He, Y. Zhang, G. Xiao, B. Hu, Magnetic immunoassay coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous quantification of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum. *Spectrochim Acta B* 106, (2015), 20-27.

<sup>110</sup> X. Li, B. Chen, M. He, G. Xiao, B. Hu, Gold nanoparticle labelling with tyramide signal amplification for highly sensitive detection of alpha fetoprotein in human serum by ICP-MS. *Talanta* 176, (2018), 40-46.

<sup>111</sup> F. Li, Q. Zhao, C. Wang, X. Lu, X.-F. Li, X.C. Le, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle labelling and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 82, (2010), 3399-3403.

<sup>112</sup> Y. Lin, A.T. Hamme II, Gold nanoparticle labeling based ICP-MS detection/measurement of bacteria, and their quantitative photothermal destruction. *J Mater Chem B* 3, (2015), 3573-3582.

<sup>113</sup> X. Zhang, G. Xiao, B. Chen, M. He, B. Hu, Lectin affinity based elemental labelling with hybridization chain reaction for the sensitive determination of avian influenza A (H9N2) virions. *Talanta* 188, (2018), 442-447.

<sup>114</sup> E. Perez, P. Martínez-Peinado, F. Marco, L. Gras, J.M. Sempere, J. Mora, G. Grindlay, Determination of aflatoxin M1 in milk samples by means of an inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay. *Food Chem.* 230, (2017), 721-727.

<sup>115</sup> B. Yang, Y. Zhang, B. Chen, M. He, X. Yin, H. Wang, X. Li, B. Hu, A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells. *Biosens Bioelectron.* 96, (2017), 77-83.

<sup>116</sup> X. Yin, B. Chen, M. He, B. Hu, Simultaneous determination of two phosphorylated p53 proteins in SCC-7 cells by an ICP-MS immunoassay using apoferritin-templated europium(III) and lutetium(III) phosphate nanoparticles as labels. *Microchim Acta* 185, (2019), 424.

<sup>117</sup> A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella Alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Elemental and molecular detection for quantum dots-based immunoassays: a critical appraisal. *Biosens Bioelectron.* 33, (2012), 165-171.

para la detección de IgG en suero midiendo el Cd por ICP-MS<sup>118</sup> y posteriormente, los emplean para determinar la hormona progesterona en leche de vaca mediante detección dual, midiendo el Cd por ICP-MS o registrando la emisión de fluorescencia de la nanosestructura<sup>118</sup>. Otra aplicación empleando QDs como etiquetas bimodales fue publicada por García-Cortes et al. donde se lleva a cabo la determinación del antígeno prostático específico (PSA) en suero humano por medio de Mn-dopado-ZnS QDs (detección por ICP-MS y fosforescencia)<sup>119</sup>. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el empleo de marcas constituidas por más de un elemento medible por MS, como es el caso de los QDs, implica una disminución en el número de átomos detectables por marca, lo que conlleva a una menor amplificación de la señal detectada.

Dentro de este contexto, existe un tipo concreto de NPs inorgánicas conocidas como nanoclústeres metálicos (MNCs) que se presentan como excelentes candidatos para ser empleados como etiquetas en inmunosondas. Debido a la importancia que han cobrado en los últimos años, a continuación, se explicará con más detalle: su síntesis, características y propiedades, así como, algunos ejemplos representativos de aplicaciones en el campo biomédico.

### **A.3.2.7. Los nanoclústeres metálicos**

Los MNCs son nanopartículas con núcleos metálicos comprendidos entre 0,2 y 3 nm, compuestos desde unos pocos átomos hasta las pocas centenas, generalmente de un mismo metal<sup>120</sup>. Este menor el tamaño con respecto a las NPs más grandes implica la aparición de propiedades y comportamientos atípicos (más propios de moléculas, p. ej. la luminiscencia) y distintos a los típicamente encontrados en las NPs

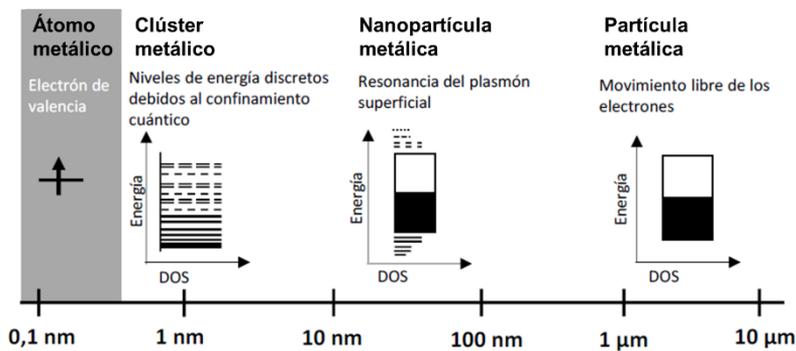
---

<sup>118</sup> B. Chen, H. Peng, F. Zheng, B. Hu, M. He, W. Zhao, D. Pang, Immunoaffinity monolithic capillary microextraction coupled with ICP-MS for immunoassay with quantum dot labels. *J Anal At Spectrom.* 25, (2010), 1674-1681.

<sup>119</sup> M. Garcia-Cortes, J.R. Encinar, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification. *Biosens Bioelectron.* 85, (2016), 128-134.

<sup>120</sup> L. Zhang, E. Wang, Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* 9, (2014), 132-157.

(> 3 nm) y, por supuesto, al metal en estado macroscópico. La disminución del tamaño nuclear hace que este se aproxime a la longitud de onda de Fermi de un electrón. Este fenómeno provoca el confinamiento cuántico de los electrones de los átomos que componen el núcleo y por ello que el modelo de bandas continua típica de los metales en estado macroscópico (movimiento libre de electrones), se divide en niveles discretos de energía (**Figura 15**). Por tanto, los MNCs se convierten en “el eslabón intermedio” entre los átomos metálicos individuales y las nanopartículas metálicas plasmónicas (diámetros de 10-100 nm).



**Figura 15:** Esquema de las bandas de energía típicas en NPs metálicas y NCs, donde se observa cómo al reducir su tamaño se produce la creación de los niveles de energía discretos.

Las propiedades y características más conocidas de los metales en su tamaño macroscópico (p.ej. conductividad debida a los electrones deslocalizados) desaparecen con la disminución del tamaño de la partícula metálica. Tal y como se observa en la **Figura 15**, existen dos niveles diferenciados y caracterizados por las propiedades ópticas de las nanoestructuras resultantes. Por un lado, las NPs más grandes (10-100 nm) presentan propiedades ópticas dominadas por la oscilación colectiva de los electrones deslocalizados de la superficie, al interactuar con un campo electromagnético, dando lugar al fenómeno de la Resonancia de plasmón superficial (SPR). De esta manera, estas NPs se caracterizan por absorber fuertemente la luz y no presentar luminiscencia<sup>121</sup>. Los MNCs presentan niveles de energía discretos y confinamiento

<sup>121</sup> X. Jiang, B. Du, Y. Huang, J. Zheng. Ultrasmall noble metal nanoparticles: Breakthroughs and biomedical implications, *Nano Today* 21, (2018), 106-125.

cuántico de los electrones, por lo que la banda de plasmón superficial desaparece (no hay electrones libres) pero mostrando una emisión fluorescente. Además, como consecuencia a este confinamiento cuántico, los MNCs dejan de ser conductores. Es decir, los NCs se alejan de su homólogo macroscópico acercándose a las características moleculares.

### □ Propiedades de los MNCs

Como se ha indicado, la emisión fluorescente es una propiedad destacable de los MNCs. Esta se ve influenciada por varios parámetros, como la naturaleza del metal, el tamaño de la nanoestructura<sup>122</sup>, la estructura cristalina, el estado de oxidación, el tipo de ligando, y las condiciones del medio en el que se encuentra (p.ej., el disolvente, temperatura, pH, y fuerza iónica). Por otra parte, este tipo de nanomateriales presenta absorción de dos fotones, buenos rendimientos cuánticos de la fluorescencia (hasta de un 20%), largos desplazamientos de Stokes, una relación superficie-volumen elevada, interesantes propiedades catalíticas y no presentan intermitencia en la emisión (*blinking*)<sup>123</sup>.

Debido especialmente a sus propiedades ópticas, los MNCs han sido etiquetas muy recurridas en aplicaciones bioanalíticas<sup>124</sup>. Sin embargo, el mecanismo por el cual los MNCs poseen luminiscencia es todavía objeto de debate. Se afirma que la fluorescencia se produce por combinación de varios factores. Por una parte, la ya comentada reducción del tamaño del nanomaterial que provoca la formación de niveles de energía discretos que hace que cuando los NCs interactúan con la radiación electromagnética se producen diferentes transiciones electrónicas intra- e interbanda, dando lugar a la aparición de espectros de emisión. Aunque también se ha propuesto que la emisión se puede producir por fenómenos de transferencia de energía ligando-

---

<sup>122</sup> V. Biju. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc Rev.* 43, (2014), 744-764.

<sup>123</sup> H.C. Chang, Y.F. Chang, N.C. Fan, J.A.A. Ho, Facile preparation of high-quantum-yield gold nanoclusters: application to probing mercuric ions and biothiols. *ACS Appl Mater Interfaces* 6, (2014), 18824-18831.

<sup>124</sup> L.B. Zhang, E.K. Wang, Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* 9, (2014), 132-157.

metal e interacciones metal-metal. De este modo, la longitud de onda de emisión fluorescente depende fuertemente tanto del propio núcleo metálico y su tamaño<sup>125</sup> (por efectos intrínsecos de la cuantización) como de la superficie de la partícula (interacciones metal-ligando)<sup>126</sup>. Otros estudios avalan que el ligando o las moléculas estabilizantes empleadas para generar los MNCs afectan notablemente a las propiedades fluorescentes<sup>127</sup>. Por ejemplo, se han sintetizado AuNCs y AgNCs con longitudes de onda de emisión fluorescente diferentes atendiendo al ligando protector utilizado durante su síntesis<sup>127,128</sup>.

#### □ Rutas de síntesis de MNCs

De manera general, la síntesis de MNCs se puede realizar atendiendo a dos aproximaciones (**Figura 16**): *bottom up* y *top-down*. En el primer caso se parte de átomo a átomo para construir la nanoestructura deseada, mientras que en el caso de las síntesis *top-down*, lo que se hace es partir de NPs más grandes a las que se le modula su tamaño empleando un exceso de ligandos (*etching*). En la **Figura 16**, se recogen las estrategias más comunes de síntesis de MNCs. Se pueden observar desde aquellas basadas en la química verde (empleo de algas, bacterias, etc.), hasta las estrategias más frecuentes como son las de reducción química. En este caso, la síntesis de MNCs proporciona un tipo de MNCs muy estable y que presentan alta luminiscencia (comparado con el resto de los métodos de síntesis para un mismo metal), siendo el reductor más común el borohidruro de sodio<sup>129</sup>.

---

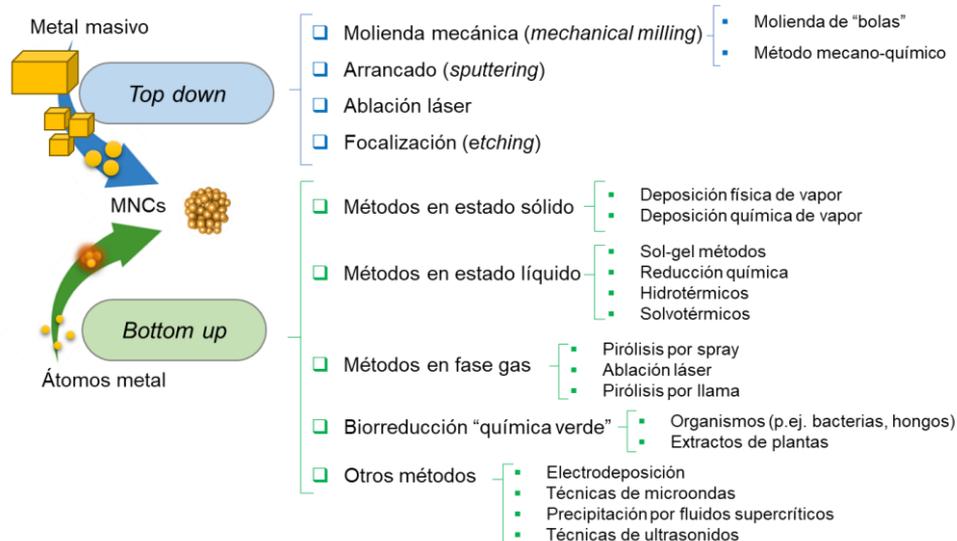
<sup>125</sup> V. Biju, Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc Rev.* 43, (2014), 744-764.

<sup>126</sup> Y. Lu, W. Chen. Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chem Soc Rev.* 41, (2012), 3594-3623.

<sup>127</sup> C.A.J. Lin, C.H. Lee, J.T. Hsieh, H.H. Wang, J.K. Li, J.L. Shen, W.H. Chang. Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: recent progress and present challenges. *J Med Biol Eng.* 29, (2009), 276-283.

<sup>128</sup> Y.S. Borghei, M. Hosseini, M. Reza-Ganjali, Synthesis of Fluorescent Cysteine-gold Nano-clusters (Cys-Au-NCs) and their Application as Nano-biosensors for the Determination of Cysteine. *Current Nanoscience* 13, (2017), 610-615.

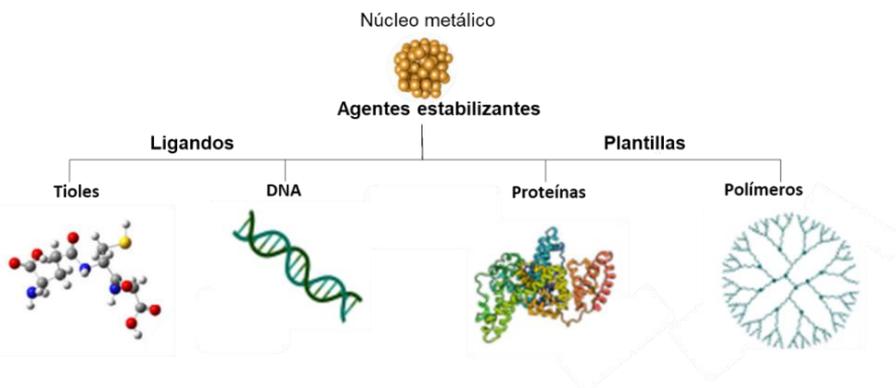
<sup>129</sup> H. Li, Y. Guo, L. Xiao, B. Chen, Selective and sensitive detection of acetylcholinesterase activity using denatured protein-protected gold nanoclusters as a label-free probe. *Analyst* 139, (2014), 285-289.



**Figura 16:** Esquema resumen donde se muestran las diferentes estrategias que se pueden seguir para la síntesis de MNCs.

Con el objetivo de conseguir un control del tamaño de la nanoestructura, así como de una mayor estabilidad de esta, la reducción del ion metálico (precursor del metal nuclear) se realiza en presencia de un agente estabilizante (ligando o plantilla). El uso del agente de estabilización es crucial para proteger la nanoestructura metálica frente al medio, así como evitar el aumento de su tamaño. Además, como se ha visto en el apartado anterior, la naturaleza de los ligandos utilizados para cubrir la superficie de la partícula puede afectar notablemente a sus propiedades de emisión. Por lo tanto, la elección de agentes adecuados capaces de estabilizar el núcleo para evitar la agregación de los NCs y, de esta manera mejorar su fluorescencia, es crucial para obtener MNCs altamente fluorescentes. Dentro de los tipos de agentes estabilizantes se puede distinguir entre aquellos que ejercen como plantillas y los que ejercen a modo de ligandos protectores (**Figura 17**). En el caso de la síntesis asistida por plantilla se usan moléculas en cuyo interior crecen los MNCs. Las moléculas específicas para este tipo

de síntesis suelen ser oligonucleótidos de ADN<sup>130</sup>, proteínas<sup>131</sup>, estructuras tipo dendrímeros como el PAMAM<sup>132</sup>, o polímeros<sup>133</sup>. Sin embargo, este tipo de estrategias incrementan notablemente el volumen hidrodinámico final de la nanoestructura, por lo que su aplicabilidad se ve limitada. Estas estructuras debido al impedimento estérico podrían bloquear e impedir el reconocimiento eficiente del antígeno (p.ej., en el marcaje de moléculas pequeñas).



**Figura 17:** Tipos de moléculas empleadas como agentes estabilizantes en la síntesis de MNCs.

Por otra parte, se pueden emplear ligandos protectores, los cuales normalmente contienen un grupo tiol (-S). Al ser moléculas de pequeño tamaño, no presentan las limitaciones de las plantillas poliméricas anteriormente citadas. En este caso se produce una fuerte interacción entre los grupos tiol y el metal de la superficie de la nanoestructura sintetizada<sup>134</sup>. Los ligandos tiolados más comúnmente empleados son el ácido lipoico (o DHLA que es su forma reducida)<sup>137</sup> o el glutatión (GSH). Los

<sup>130</sup> B. Han, E. Wang, E. DNA-templated fluorescent silver nanoclusters. *Anal Bioanal Chem.* 402, (2012), 129-138.

<sup>131</sup> N. El-Sayed, M.Schneider. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of protein-stabilized gold nanoclusters. *J Mater Chem B* 8, (2020), 8952-8971.

<sup>132</sup> Y. C. Jao, M.K. Chen, S.Y. Lin, Enhanced quantum yield of dendrimer-entrapped gold nanodots by a specific ion-pair association and microwave irradiation for bioimaging. *ChemComm.* 46, (2010), 2626-2628.

<sup>133</sup> B. Santiago-Gonzalez, M.J. Rodriguez, C. Blanco, J. Rivas, M.A. López-Quintela, J.M.G. Martinho. One step synthesis of the smallest photoluminescent and paramagnetic PVP-protected gold atomic clusters. *Nano Letters* 10, (2010), 4217-4221.

<sup>134</sup> L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G.U. Nienhaus, One-pot synthesis of near-infrared fluorescent gold clusters for cellular fluorescence lifetime imaging. *Small* 7, (2011), 2614-2620.

MNCs sintetizados con este tipo de ligandos suelen ser estables con un radio hidrodinámico pequeño. Además, cabe destacar la bifuncionalidad de estos ligandos, que al poseer grupos reactivos en sus extremos permiten la fácil funcionalización de la nanoestructura mediante reacciones covalentes (p.ej., reacción de la carbodiimida para su bioconjugación a un Ab).

### □ Aplicaciones de los MNCs

Los MNCs se presentan actualmente como una excelente alternativa al empleo de los fluoróforos convencionales (particularmente, a las moléculas orgánicas luminiscentes) en varios campos de la bioanalítica. Una de las aplicaciones propuestas es su uso como sensores químicos ópticos para la detección de metales pesados (p.ej.,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , y  $\text{Cu}^{2+}$ ). Estas estrategias se basan en la desactivación de la fluorescencia de los MNCs cuando los iones metálicos interactúan con la superficie del MNCs. Este tipo de estudios se muestra, entre otros, en el trabajo de Bian et al.<sup>135</sup> para el desarrollo de un sensor selectivo de  $\text{Hg}^{2+}$  basado en la desactivación de la fluorescencia de CuNCs ( $\lambda_{\text{em}}$ , 455 nm) a concentraciones crecientes del ion.

Otro campo en el que se suelen encontrar aplicaciones empleando MNCs fluorescentes es en su uso como marcas en fluoroinmunoensayos (**Sección A.2.2.2**). Desde la primera publicación en el año 2006 donde se usaron AuNCs en un inmunoensayo para la determinación de IgG humana<sup>136</sup>, numerosas han sido las publicaciones empleando diferentes MNCs. Un ejemplo es el trabajo presentado por Valencia et al.<sup>137</sup> en el que se describe una metodología para la cuantificación de CFH en suero humano utilizando AgNCs fluorescentes como marcas en un inmunoensayo competitivo en placa.

---

<sup>135</sup> R.X. Bian, X.T. Wu, F. Chai, L. Li, L.Y. Zhang, T.T. Wang, C.C. Wang, M.S. Zhong, Z.M. Su, Z.M. Facile preparation of fluorescent Au nanoclusters-based test papers for recyclable detection of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ . *Sens Actuators B Chem.* 241, (2017), 592-600.

<sup>136</sup> Triulzi, R.C., Micic, M., Giordani, S., Serry, M., Chiou, W.A, Leblanc, Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex. *Chemical Communications*, 48, (2006), 5068-5070.

<sup>137</sup> E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim Acta* 186, (2019), 429.

Sin embargo, cabe destacar que el gran auge de los MNCs radica en parte en su uso como marcas fluorescentes y altamente biocompatibles para llevar a cabo estudios de *imaging* molecular. De hecho, gracias a sus atractivas características ópticas los MNCs se presentan como una alternativa a los fluoróforos convencionales (colorantes orgánicos o proteínas fluorescentes), los cuales poseen una fotoestabilidad reducida que provoca la pérdida de la señal luminiscente en experimentos a largo plazo. Como ejemplo de este tipo de aplicaciones, cabe mencionar el uso de CuNCs estabilizados con BSA para el *imaging* de células CAL-27 con el objetivo de evaluar la internalización celular, así como la distribución intracelular de los CuNCs<sup>138</sup>. Otra aproximación interesante de *imaging* celular es el presentado por Tanaka et al.<sup>139</sup> en el que se emplean PtNCs para detectar células tumorales. En dicho trabajo se muestra que es posible detectar específicamente los receptores CXCR4, expresados en mayor nivel en células tumorales HeLa, siguiendo la emisión fluorescente. Cruz-Alonso et al. emplearon AuNCs estabilizados con ligandos tiolados (ácido lipoico) para obtener la distribución espacial de metalotioneina-1/2 en tejidos de retina humana<sup>140</sup>. Paralelamente, también se han publicado aplicaciones de los MNCs para la obtención de *imaging*s *in vivo*. En estos casos, las emisiones de los MNCs empleados deben ser cercanas a la región del infrarrojo cercano (NIR), para evitar así el daño en las muestras biológicas y reducir posibles interferencias debido a autofluorescencia. Un ejemplo de este tipo de aplicación fue presentado por Liu et al.<sup>141</sup> con la síntesis de dos tipos de AuNCs con dos recubrimientos diferentes (con PEG y GSH) para evaluar su especificidad a tumores. Para ello se utilizaron ratones portadores de tumores

---

<sup>138</sup> C. Wang, L. Xu, H. Cheng, Q. Lin, C. Zhang, Protein-directed synthesis of pH-responsive red fluorescent copper nanoclusters and their applications in cellular imaging and catalysis. *Nanoscale*, 6, (2014), 1775-1781

<sup>139</sup> S.I. Tanaka, J. Miyazaki, D.K. Tiwari, T. Jin, Y. Inouye, Fluorescent platinum nanoclusters: Synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angew Chem Int Ed.* 49, (2010), 1–6.

<sup>140</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Pereira, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags. *Microchim Acta* 185, (2018), 64.

<sup>141</sup> J. Liu, M. Yu, X. Ning, C. Zhou, S. Yang, J. Zheng, PEGylation and zwitterionization: pros and cons in the renal clearance and tumor targeting of near-IR-emitting gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed.* 125, (2013), 12804-12808.

MCF-7 como sistema modelo y se midió la biodistribución de las AuNP@PEG y AuNCs@GSH en los ratones a diferentes tiempos de incubación.

### **A.4. ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS EN CÉLULAS INDIVIDUALES Y SECCIONES DE TEJIDOS EMPLEANDO MNCs Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL**

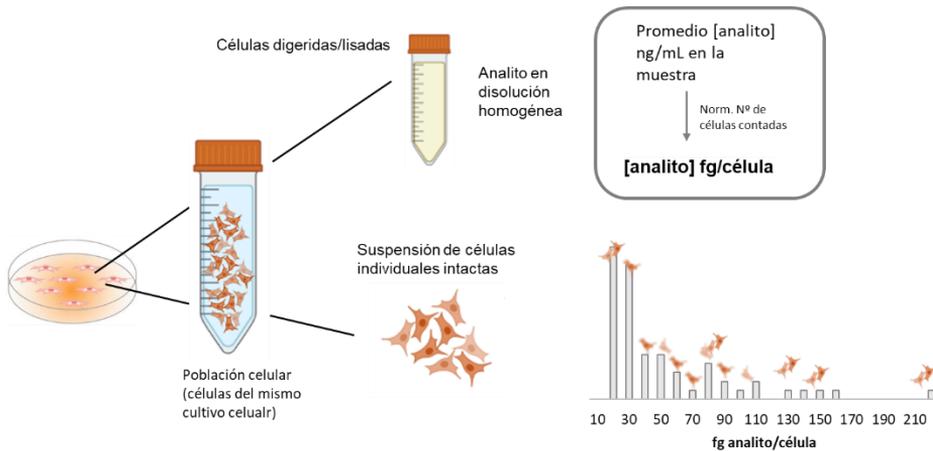
#### **A.4.1. Análisis de células individuales mediante ICP-MS**

Para la determinación de biomoléculas empleando las metodologías convencionales en muestras celulares provenientes de un tejido o cultivo celular, las muestras deben ser previamente lisadas o digeridas, y el analito (p.ej., una proteína) es cuantificado en el lisado o digerido resultante tras el tratamiento de la muestra. La concentración de analito obtenida se puede normalizar al contenido celular de partida teniendo en cuenta parámetros como el número de células, el peso seco o la concentración proteica total, determinados todos ellos previamente tal y como se esquematiza en la **Figura 18**. Este tipo de aproximaciones proporciona información del contenido promedio del analito en la muestra. Sin embargo, el comportamiento conjunto de la población celular no siempre es representativo del comportamiento de las células individuales que componen dicha población; de hecho, tal y como se ejemplifica en la **Figura 18**, en la suspensión celular existe una elevada variabilidad célula a célula (en el ejemplo se observa cómo la concentración del analito por célula, expresado en fg, varía dentro de la misma población celular entre los 20 y los 220 fg/célula)<sup>142,143</sup>.

---

<sup>142</sup> 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.

<sup>143</sup> S.J. Altschuler, L.F. Wu, Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? *Cell.* 141, (2010), 559–563.



**Figura 18:** Esquema de los dos tipos de estrategias que se pueden realizar para determinar el contenido de un analito en un cultivo celular mediante ICP-MS. En la parte superior se indica el procedimiento a seguir para conocer el contenido total promedio del analito en la población celular, mientras que en la parte inferior se muestra el tipo de información que se obtiene célula a célula.

#### A.4.1.1. Influencia de la heterogeneidad celular en el análisis de células individuales

La heterogeneidad celular es una característica fundamental y bien conocida que implica variabilidad en la composición o morfología entre las distintas células que forman parte de una determinada población celular<sup>142,144</sup>. Es decir, dentro de una misma población siempre están presentes variaciones célula a célula, que se manifiestan a diferentes niveles (p.ej., genómico, epigenómico, transcriptómico o proteómico, entre otros)<sup>143</sup>. Estas diferencias pueden tener origen genético y/o epigenético, o pueden producirse debido a estímulos internos o externos<sup>145</sup>. Por tanto, células con el mismo genoma y sometidas a los mismos estímulos pueden presentar diferencias significativas en cuanto a su composición elemental y/o molecular. Este hecho es

<sup>144</sup> M.A. Walling, J.R.E. Shepard, Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem Soc Rev.* 40, (2011), 4049–4076.

<sup>145</sup> M. Guo, Y. Peng, A. Gao, C. Du, J.G. Herman, Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res.* 7, (2019), 23.

crítico cuando se intentan estudiar procesos biológicos, o más concretamente la concentración de una biomolécula implicada en un proceso biológico, como posible biomarcador de una enfermedad<sup>146</sup>.

Por ello, en la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación de elementos y biomoléculas a nivel de células individuales para generar información más valiosa y realista<sup>147</sup>. Sin embargo, pese al interés actual por el análisis de células individuales, existen aún pocas metodologías que reúnan las características analíticas adecuadas para llevar a cabo este tipo de análisis. Este hecho puede atribuirse principalmente a 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 a la poca cantidad de analito presente en una única célula (dado su pequeño tamaño y volumen). Además, las células se encuentran en una matriz muy compleja, por lo que se necesitan técnicas que ofrezcan una elevada sensibilidad y selectividad<sup>148</sup>.

### A.4.1.2. Características generales de la técnica de *single cell*-ICP-MS

Dentro de este contexto, gracias a las mejoras en la electrónica de los equipos de ICP-MS que permiten la adquisición rápida de datos (*dwell time* <10 ms) es posible llevar a cabo análisis en disolución con resolución temporal (*time-resolved analysis*), lo que ha permitido la detección de una sola partícula (*single particle*, sp) o de una sola célula (*single cell*, sc), ambos tipos de análisis basados en el mismo concepto de medida. Este hecho, sumado a las características intrínsecas de la técnica ICP-MS, permiten llevar a cabo un análisis célula a célula con elevada sensibilidad<sup>149</sup>.

---

<sup>146</sup> K. Cyll, E. Ersvær, L. Vlatkovic, M. Pradhan, W. Kildal, M. Avranden Kjør, A. Kleppe, T.S. Hveem, B. Carlsen, S. Gill, S. Löffeler, E.S. Haug, H. Währe, P. Sooriakumaran, H.E. Danielsen, Tumour heterogeneity poses a significant challenge to cancer biomarker research, *Br J Cancer*. 117, (2017), 367–375.

<sup>147</sup> L. Yin, Z. Zhang, Y. Liu, Y. Gao, J. Gu, Recent advances in single-cell analysis by mass spectrometry. *Analyst*. 144, (2019), 824–845.

<sup>148</sup> N. Slavov, Single-cell protein analysis by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 60, (2021), 1–9.

<sup>149</sup> 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.

Como se observa en el esquema superior de la **Figura 19**, en los análisis por ICP-MS empleando como sistema de introducción de la muestra nebulización convencional, un analito es introducido en el ICP de manera homogénea al estar distribuido en la muestra en disolución (digerida o lisada como se mostraba en la **Figura 18**). Por tanto, el analito entra de manera constante al plasma, generando así una señal continua y estable durante todo el tiempo de medida. Sin embargo, si 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 (**Figura 19**, imagen inferior), cada célula generará un conjunto de iones cuando es vaporizada, atomizada e ionizada en el plasma, generando una señal de muy corta duración conocida como evento, o *spike*.<sup>150</sup> Estos eventos adquiridos presentan una duración típicamente de entre 100-500  $\mu\text{s}$  para una célula (aunque este tiempo depende del tamaño de la célula u organismo en cuestión), por lo que el *dwell time* fijado en el ICP-MS (tiempo al que se registra una señal en el ICP-MS) para la detección de los iones del analito debe ser lo suficientemente pequeño como para que cada evento monitorizado sea debido a una sola célula (generalmente se emplean *dwell times* igual o menores de 10 ms)<sup>151</sup>.

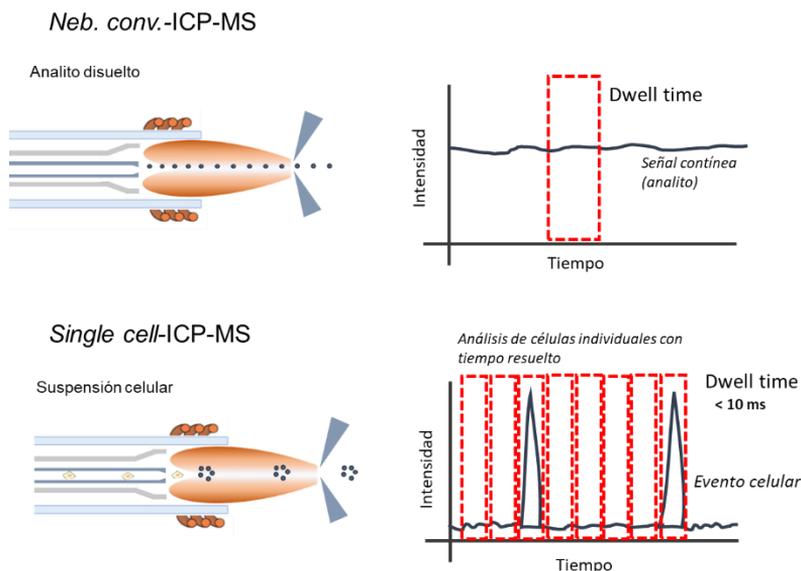
Cuando se realiza un análisis por sc-ICP-MS se pueden extraer varias conclusiones: a) el número de eventos detectado (**Figura 19**, imagen inferior) se corresponde directamente con el número de células presentes en la suspensión celular analizada, b) la intensidad de los eventos es proporcional a la masa del analito presente en la célula, y c) 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<sup>151,152</sup>.

---

<sup>150</sup> L. Armbrecht, P.S. Dittrich, Recent Advances in the Analysis of Single Cells, *Anal Chem.* 89, (2017), 2–21.

<sup>151</sup> A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, *J Anal At Spectrom.* 29, (2014), 1252–1257.

<sup>152</sup> 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.



**Figura 19:** Esquema general donde se muestra comparativamente cómo son los análisis por ICP-MS con nebulización convencional y single cell-ICP-MS. En la imagen superior se muestra la intensidad obtenida al analizar una disolución homogénea del analito (Neb. conv.-ICP-MS) frente al análisis mediante sc-ICP-MS de células individuales de una suspensión celular que se muestra en la imagen inferior.

Aparte de realizar una correcta selección del *dwell time*, otro aspecto crítico de la técnica sc-ICP-MS es asegurar un correcto transporte de la suspensión celular al plasma ICP para generar resultados fiables y reproducibles. Esto va ligado a dos cuestiones principalmente: mantener la integridad celular, es decir, que no haya rotura de las membranas celulares durante el transporte hasta el ICP-MS, y conseguir una buena eficiencia del transporte de las células hasta el plasma (en nebulización convencional la eficiencia de transporte es generalmente inferior al 5%)<sup>150,153</sup>. Para cumplir estos requisitos, en los análisis por sc-ICP-MS se debe disponer de sistemas de introducción de muestra adecuados. En la mayor parte de las aplicaciones se hace uso de micronebulizadores de alta eficiencia, que permiten un transporte elevado de muestras líquidas al plasma utilizando flujos de introducción de muestra muy bajos

<sup>153</sup> M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, TrAC - Trends Anal Chem. 132, (2020), 116042.

(en el rango de 10–45  $\mu\text{L min}^{-1}$ ), sin apenas comprometer la integridad de las membranas y paredes celulares. Estos micronebulizadores se emplean acoplados a cámaras de nebulización de flujo laminar de consumo total y bajo volumen, que utilizan 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 permiten un buen lavado entre muestras (eficiencias de transporte adecuadas y bajos efectos de memoria)<sup>154</sup>. Además, actualmente se pueden encontrar también sistemas automatizados con automuestreadores y que permiten el análisis más rápido de las muestras (p. ej. el sistema MicroFAST de la casa comercial Elemental Scientific)<sup>155</sup>.

En cuanto a los analizadores de masas más comunes para en el análisis de células individuales por ICP-MS, se encuentran los de tipo cuadrupolo, los de doble enfoque y los de tiempo de vuelo. Se debe tener en cuenta que en los analizadores secuenciales es necesario un tiempo de acondicionamiento entre medidas de dos relaciones  $m/z$  distintas (conocido como *settling time*) que limita la posibilidad de determinación de varios elementos en un único evento procedente de una célula<sup>153,156</sup>. Por ello, parece que los equipos con analizadores casi simultáneos como los analizadores tipo tiempo de vuelo (con una alta resolución temporal de pocos  $\mu\text{s}$ ) son más adecuados para la medida multielemental de señales transitorias muy cortas, como las que se obtienen en el análisis de células individuales por sc-ICP-MS<sup>157</sup>. No obstante, se debe tener en cuenta que la sensibilidad de estos equipos disminuye notablemente comparados con los ICP-MS de tipo cuadrupolo o de doble enfoque<sup>158</sup>.

---

<sup>154</sup> 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.

<sup>155</sup> Elemental Scientific <https://www.icpms.com/products/microfast-singlecell.php> (visitada 25.05.2022)

<sup>156</sup> 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.

<sup>157</sup> 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](http://www.tofwerk.com) (ultima consulta 30/04/2022).

<sup>158</sup> 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.

#### A.4.1.3. Determinación de proteínas mediante *sc*-ICP-MS

Hasta la fecha, la técnica *sc*-ICP-MS se ha aplicado fundamentalmente a la cuantificación elemental de células individuales. Estos elementos pueden estar presentes en las células de forma natural (i.e., como elementos constituyentes), como es el caso de K, Ca, Fe, Co, Cu, Mn, Zn, P, y S,<sup>159,160</sup> o bien como elementos externos introducidos artificialmente debido a internalización del metal (p.ej., estudios de viabilidad<sup>161,162</sup>), o con el objetivo de estudiar la incorporación celular de metalofármacos<sup>163,164</sup> o de NPs metálicas<sup>165,166</sup>.

En cuanto a la determinación de proteínas con *sc*-ICP-MS, las metodologías desarrolladas siguen las mismas directrices que las descritas en los análisis por ICP-MS con nebulización convencional. Es decir, las biomoléculas pueden ser detectadas de manera directa midiendo un heteroátomo presente en la estructura de la misma, como puede ser un metal en las metaloproteínas o Se en las selenoproteínas<sup>162</sup>. Por otro lado, las estrategias de detección indirecta basadas en el uso de inmunosondas metálicas, es decir, anticuerpos específicos etiquetados con un heteroátomo que reconocen específicamente la proteína de interés mediante una reacción antígeno-anticuerpo, son las que se emplean con más frecuencia para el estudio de biomoléculas.

---

<sup>159</sup> K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J Anal At. Spectrom.* 28, (2013), 637-645.

<sup>160</sup> Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells, *Talanta* 206, (2020), 120174.

<sup>161</sup> 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 sonicspray ionization-MS, *Anal Chem.* 91, (2019), 9590-9598.

<sup>162</sup> 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.

<sup>163</sup> 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.

<sup>164</sup> M. Corte Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, 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

<sup>165</sup> 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.

<sup>166</sup> Z. Chen, B. Chen, M. He, B. Hu, Droplet-splitting microchip online coupled with time-resolved ICP-MS for analysis of released Fe and Pt in single cells treated with FePt nanoparticles, *Anal Chem.* 92, (2020), 12208-12215.

Sin embargo, estas estrategias continúan siendo un reto puesto que la realización de un inmunoensayo en células suspendidas puede comprometer la integridad de las células. Además, para la determinación de proteínas es necesario conocer el número de átomos metálicos por biomolécula de reconocimiento, por lo que la inmunosonda debe ser adecuadamente caracterizada.

Hasta ahora, se han publicado varios trabajos para la detección de proteínas que combinan estas estrategias de inmunoensayo empleando inmunosondas metálicas y análisis de células por sc-ICP-MS. La mayor parte de las publicaciones usan anticuerpos específicos de las proteínas de interés marcados con isótopos de Ln. Dentro de este contexto, Corte-Rodríguez et al.<sup>167</sup> hicieron uso de un Ab marcado con Nd (etiqueta MAXPAR® con 21 átomos de Nd por inmunosonda) para la cuantificación de un biomarcador de la membrana celular (transferrina receptor-1) en dos líneas celulares humanas diferentes. También de forma similar, utilizando MAXPAR® marcado con Lu, se determinó otro biomarcador (HER2) en mezclas de líneas celulares humanas<sup>168</sup>. Por otra parte, Liu et al.<sup>169</sup> han propuesto el uso de una etiqueta de detección bimodal como es la aminofluoresceína-DOTA-Nd para la detección por MS e infrarrojo cercano (NIR). En dicho trabajo se llevó a cabo la identificación y determinación de un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en células tumorales circulantes. Alternativamente, Yuan et al.<sup>170</sup> han desarrollado una detección empleando NPs similares a los virus (con cápsides compuestas por proteínas estructurales derivadas de virus, modificables para enlazar hasta 1034 DOTA-Eu por cápside) que proporcionan una amplificación significativa de la señal para la detección de un biomarcador de membrana.

---

<sup>167</sup> M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, 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.

<sup>168</sup> A.F. Asensio, M. Corte-Rodríguez, J. Bettmer, L.M. Sierra, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, Targeting HER2 protein in individual cells using ICP-MS detection and its potential as prognostic and predictive breast cancer biomarker, *Talanta* 235, (2021), 122773.

<sup>169</sup> C. Liu, S. Lu, L. Yang, P. Chen, P. Bai, Q. Wang, Near-infrared neodymium tag for quantifying targeted biomarker and counting its host circulating tumor cells, *Anal Chem.* 89, (2017), 9239-9246.

<sup>170</sup> R. Yuan, F. Ge, Y. Liang, Y. Zhou, L. Yang, Q. Wang, Viruslike element-tagged nanoparticle inductively coupled plasma mass spectrometry signal multiplier: membrane biomarker mediated cell counting, *Anal Chem.* 91, (2019), 4948-4952.

En este punto cabe destacar la importancia que ha adquirido en los últimos años la estrategia de marcaje con Ln (mediadas por el reactivo quelante MAXPAR®) a anticuerpos específicos junto con la capacidad de determinación multielemental a nivel de célula individual que permiten los equipos de ICP-MS que emplean un analizador de masas tipo tiempo de vuelo (TOF). Esto ha dado lugar al desarrollo de una técnica conocida como citometría de masas (comercialmente CyTOF)<sup>171</sup>. Esta técnica, con ciertas características similares a la citometría de flujo, utiliza anticuerpos marcados con diferentes isótopos de Ln y detección mediante ICP-TOF-MS, en lugar de anticuerpos marcados con fluoróforos para el reconocimiento de proteínas y detección fluorescente. La citometría de flujo convencional se ve limitada para análisis simultáneo de proteínas, debido al menor número de fluoróforos disponibles en el mercado y al solapamiento espectral entre las señales fluorescentes de los diferentes fluoróforos que podrían ser utilizados simultáneamente<sup>172</sup>. Sin embargo, el marcaje elemental utilizado en citometría de masas ha llegado conseguir el análisis de hasta 40 parámetros celulares de forma simultánea con resolución unicelular<sup>173,174</sup>.

La **Figura 20** recoge un diagrama donde se resume cómo se lleva a cabo un análisis por citometría de masas. Dicha técnica se basa en la incubación de las células con anticuerpos específicos de las proteínas de interés etiquetados con isótopos de Ln (mediante el reactivo MAXPAR®). Los anticuerpos marcados reconocen y se unen a las proteínas diana presentes en las células (generalmente se trabaja con proteínas de la superficie celular). Adicionalmente, las células también pueden incubarse con moléculas, que contienen elementos como el Rh o Ir, las cuales son capaces de

---

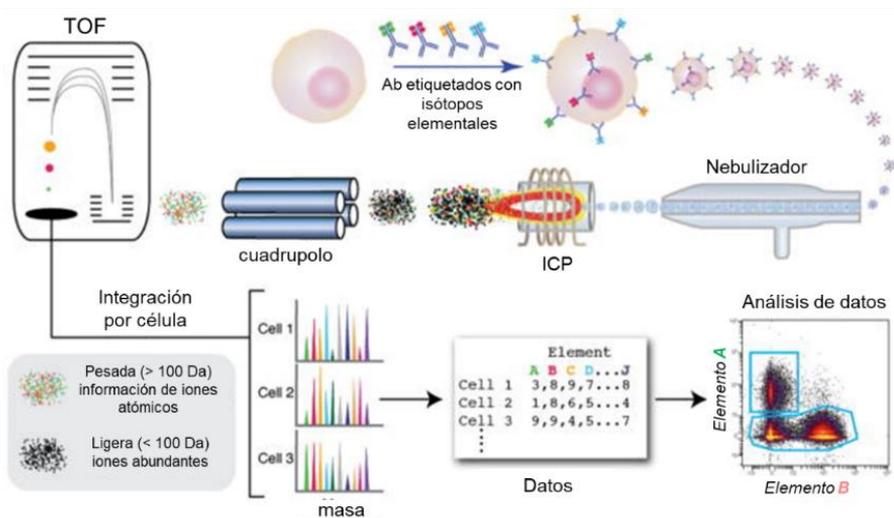
<sup>171</sup> S.D. Tanner, D.R. Bandura, O. Ornatsky, V.I. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay, *Pure Appl Chem.* 80, (2008), 2627–2641.

<sup>172</sup> 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.

<sup>173</sup> M.H. Spitzer, G.P. Nolan, Mass cytometry: single cells, many Features, *Cell* 165, (2016).

<sup>174</sup> D.E. Carvajal-Hausdorf, J. Patsenker, K.P. Stanton, F. Villarroel-Espindola, A. Esch, R.R. Montgomery, A. Psyrrí, 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 Cancer Res.* 25, (2019), 3054-3062.

entrar en la célula e intercalarse en el ADN. La detección de estos elementos funcionaría como patrón interno para validar la detección de eventos celulares a la vez que se puede obtener información del contenido en ADN. Después de la incubación, las células en suspensión son introducidas en el plasma en forma de aerosol. Las nubes iónicas formadas se transfieren al analizador de masas de tiempo de vuelo, donde es posible realizar la detección casi simultánea de los diferentes isótopos utilizados como marcas en las señales transitorias (eventos) que genera cada célula<sup>175</sup>.



**Figura 20:** Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al.<sup>175</sup>.

#### A.4.2. Análisis con resolución espacial empleando espectrometría de masas elemental

En los apartados anteriores se ha hecho notar que la cuantificación de elementos esenciales y/o biomoléculas en muestras en disolución (fluidos o muestras digeridas/liofilizadas o suspensiones celulares) aporta información muy valiosa en los estudios biológicos y clínicos. Sin embargo, la posibilidad de obtener imágenes de la distribución espacial de los analitos directamente sobre tejidos o células en cultivo

<sup>175</sup> S.C. Bendall, G.P. Nolan, M. Roederer, P.K. Chattopadhyay, A deep profiler's guide to cytometry. Trends immunol. 33, (2012), 323–332.

proporciona un punto de vista complementario que permite una mejor comprensión de muchos procesos biológicos y patológicos.

Tradicionalmente, en biología y clínica este tipo de imágenes se obtienen mediante estrategias de tinción química específica empleando métodos de IHC convencionales o mediante IF. En la **Sección A.2.2.4**, se describen ambas técnicas y se comentan con detalle las ventajas e inconvenientes de ambas aproximaciones. Las limitaciones que presentan radican principalmente en la imposibilidad de realizar una cuantificación del analito, así como en el solapamiento espectral de las marcas fluorescentes para realizar medidas multiparamétricas. Adicionalmente, no son técnicas que permitan la localización elemental. En este contexto, las técnicas de *imaging* por espectrometría de masas (IMS) suponen una potente herramienta capaz de evaluar mezclas complejas tanto para medida de elementos como moléculas en tejidos y células, con una elevada especificidad y resolución lateral. Dentro de las técnicas de IMS, las más empleadas actualmente en estudios clínicos son MALDI-MS, la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS, *Secondary ion mass spectrometry*), y la ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS<sup>176</sup>.

La técnica MALDI-MS es una técnica ampliamente empleada para la obtención de imágenes (con resolución espacial entre 5-200  $\mu\text{m}$ ) de la distribución de tipos muy variados de biomoléculas: proteínas, péptidos, lípidos, y otros metabolitos (p.ej., fármacos o drogas) en tejidos, sin necesidad de marcaje<sup>177</sup>. Sin embargo, la necesidad de preparar las muestras embebidas en una matriz que absorba la energía del haz láser empleado para la desorción molecular y la ionización limita las estrategias de cuantificación. Por otra parte, la técnica SIMS permite el mapeo de isótopos, elementos y pequeñas moléculas (por debajo de 1000 Da) en tejidos biológicos con una resolución

---

<sup>176</sup> P.A. Doble, R. Gonzalez de Vega, D.P. Bishop, D.J. Hare, D. Clases, Laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry imaging in biology. *Chem Rev.* 121, (2021), 11769–11822.

<sup>177</sup> M. Aichler, A. Walch, MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Invest.* 95, (2015), 422-431.

espacial de hasta 50 nm<sup>178</sup>. Sin embargo, su uso en aplicaciones biológicas se ve limitado para el análisis cuantitativo y la necesidad de preservar las muestras para trabajar en condiciones de alto vacío<sup>176</sup>.

Alternativamente, la técnica LA-ICP-MS proporciona una elevada sensibilidad para el análisis elemental a nivel de trazas y ultratrazas ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ - $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , dependiendo de las condiciones de análisis)<sup>179</sup> con una buena resolución espacial: resolución lateral en el rango de unas pocas micras (1-5  $\mu\text{m}$  típicamente) y una resolución en profundidad que puede llegar a los 500 nm. Aunque la técnica LA-ICP-MS presenta también efectos de matriz, es posible llevar a cabo la cuantificación de heteroátomos en las muestras (es necesario desarrollar métodos de cuantificación adecuados dependiendo del tipo de muestra) a la vez que permite la detección simultánea de varios elementos en muestras biológicas con una resolución espacial en el rango de los micrómetros. Teniendo en cuenta la complementariedad de las técnicas de IMS, algunos trabajos muestran la detección multimodal aprovechando las ventajas de las diferentes técnicas. Por ejemplo, Matusch et al. analizaron secciones de cerebro de rata con 6-OHDA utilizando espectrometría molecular y atómica, mostrando las distribuciones espaciales cuantitativas de Mn, Fe, Zn y Cu por LA-ICP-MS y correlacionándolas con las distribuciones de lípidos medidas por MALDI-MS<sup>180</sup>.

Adicionalmente, con la incorporación de la IHC y el empleo de las estrategias basadas en inmunosondas metálicas es posible la obtención de imágenes de biomoléculas por LA-ICP-MS y por ello se puede decir que no solo permite el *imaging* elemental sino también estudios de *imaging* molecular.

---

<sup>178</sup> Wirtz, T., Philipp, P., Audinot, J. N., Dowsett, D., Eswara, S. High-resolution high-sensitivity elemental imaging by secondary ion mass spectrometry: from traditional 2D and 3D imaging to correlative microscopy. *Nanotechnology*, 26, (2015), 434001-434022.

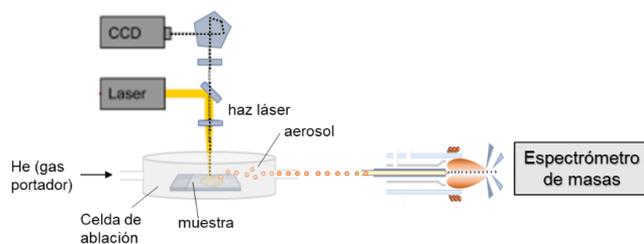
<sup>179</sup> Becker, J. S., Matusch, A., Wu, B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements-recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Anal Chim Acta*. 835, (2014), 1-18.

<sup>180</sup> A. Matusch, L.S. Fenn, C. Depboylu, M. Kliez, S. Strohmer, J.A. McLean, S.J. Becker, Combined elemental and biomolecular mass spectrometry imaging for probing the inventory of tissue at a micrometer scale. *Anal Chem*. 84, (2012), 3170–3178.

#### A.4.2.1. Estudios de *imaging* empleando ablación láser ICP-MS

La investigación con la técnica LA-ICP-MS en el campo biomédico viene ligada al interés de localización y mapeo de elementos esenciales en las muestras biológicas puesto que muchos estados patológicos se caracterizan por una alteración de la homeostasis elemental. Recientemente, el uso de esta técnica se ha ampliado al estudio de la internalización y distribución de elementos traza esenciales o tóxicos, agentes de contraste administrados, así como NPs o metalofármacos, estudios de gran interés en medicina<sup>181</sup>.

De manera general y esquemática en la **Figura 21** se muestra la configuración de un sistema de LA. La muestra se introduce en una cámara de ablación, que se purga con un gas portador (normalmente He). A continuación, se enfoca el haz láser sobre la superficie de la muestra. Se utilizan pulsos láser cortos de alta energía para ablacionar la muestra. Los fotones del láser interactúan con la muestra y se forma un aerosol que contiene partículas de esta (generalmente se ablaciona una cantidad de masa en el rango pg-fg). El material ablacionado es transportado al ICP por una corriente de gas portador. Una vez alcanzado el plasma se produce la vaporización del aerosol, la atomización y finalmente la ionización. A continuación, los iones se separan y se detectan en el espectrómetro de masas. Como se puede observar en la **Figura 21**, la etapa de muestreo está separada, espacial y temporalmente, de la excitación e ionización, por lo que puede optimizarse de forma independiente.



**Figura 21:** Esquema de la configuración de un sistema láser acoplado a ICP-MS.

<sup>181</sup> H. Traub, Chapter Six - Imaging of metal-based nanoparticles in tissue and cell samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, Editor(s): R. Milačić, J. Ščančar, H. Goenaga-Infante, J. Vidmar, Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier 93, (2021), 173-240.

Para obtener y construir imágenes bidimensionales (2D) de la superficie de la muestra, se realiza un barrido con el láser de líneas paralelas y consecutivas a lo largo de la zona de muestreo seleccionada. Para cada línea se obtienen intensidades dependientes del tiempo para todos los isótopos monitorizados en el ICP-MS (señal transitoria). Posteriormente, todas las líneas de las intensidades adquiridas para cada isótopo son empleadas para reconstruir las imágenes 2D de las distribuciones elementales del área ablacionada. Para ello se emplean softwares de construcción de imágenes (p.ej., Origin, Fiji Image J, Iolite, etc.). Las intensidades medidas son proporcionales al contenido de elementos en la muestra. Aplicando estrategias de calibración adecuadas (descritas en el apartado siguiente) es posible obtener el *imaging* elemental cuantitativo para los diferentes elementos. Los límites de cuantificación por LA-ICP-MS están en el rango de  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  aunque depende del analito, la matriz de la muestra, los parámetros de ablación, así como de la instrumentación utilizada.

Actualmente se comercializan sistemas láser con diferentes longitudes de onda, energía del láser y duración del pulso (nanosegundo o femtosegundo). Para las aplicaciones de *imaging* se utilizan ampliamente los láseres de estado sólido (p.ej., Nd:YAG, granate de Y y Al dopado con impurezas de Nd) que trabajan en el régimen de tiempo de nanosegundo (ns) y con longitudes de onda de 266 nm (frecuencia cuádruple) o 213 nm (frecuencia quintuple). Paralelamente, se utilizan también de manera generalizada los láseres de excímero cuyo medio de amplificación es una mezcla de gases (p.ej., ArF de 193 nm), y han permitido mejorar las características de ablación para una gran variedad de matrices (desde muestras biológicas a geológicas). Con este tipo de láseres se reduce la posibilidad de fraccionamiento elemental, especialmente para el análisis de muestras transparentes al IR, como el cuarzo y otros minerales. Además, ofrecen una resolución espacial de entre 1 y 200  $\mu\text{m}$ , dependiendo del diámetro haz láser seleccionado<sup>181</sup>.

Respecto a la resolución alcanzada en los análisis por LA-ICP-MS, es necesario tener en cuenta que la resolución depende también del tiempo de evacuación del aerosol desde la cámara de ablación (*washout time*) y del transporte rápido y eficiente del material ablacionado hasta el ICP, así como de la frecuencia de adquisición de

datos por parte del analizador de masas. En general, la reducción del tamaño del haz láser implica una mejor resolución espacial, pero también hace que se ablacione menos material por disparo del láser y, por tanto, una disminución de los iones detectados. Por todo ello, las condiciones óptimas de ablación han de ser seleccionadas en cada caso particular como un compromiso entre la sensibilidad y la resolución requerida en cada tipo de aplicación. El desarrollo de nuevas celdas de ablación con tiempos de evacuación reducidos, como por ejemplo la Celda TwoVol2 (Elemental Scientific) que ofrece tiempos de evacuación entre 10-600 ms, ha permitido mejorar notablemente la resolución de las imágenes obtenidas, al evitar el solapamiento de señales de cada disparo del haz láser.

### A.4.2.2. Estrategias de cuantificación por LA-ICP-MS

La obtención de imágenes cuantitativas de elementos, marcas elementales o NPs en muestras biológicas mediante LA-ICP-MS continúa siendo un reto a día de hoy. Los factores que influyen en una cuantificación fiable son los efectos de fraccionamiento elemental<sup>182</sup>, la inestabilidad del instrumento (i.e., deriva en la medida durante el tiempo de análisis), la gran variedad de muestras (y su complejidad), y la falta de materiales de referencia adecuados para hacer una calibración. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de cuantificación basadas en la preparación de estándares de calibración que imitan la matriz de la muestra (*matrix-matched*), así como para realizar la estandarización interna, son un importante campo de investigación. En la práctica, ambos enfoques, el empleo de un patrón interno y el uso de una calibración *matrix-matched*, han dado lugar al desarrollo de diferentes tipos de estrategias de calibración<sup>183</sup>

Se debe tener en cuenta que las muestras empleadas para llevar a cabo el *imaging* por LA-ICP-MS suelen ser secciones de tejido microscópico o monocapas de células

---

<sup>182</sup> S. Zhang, M. He, Z. Yin, E. Zhu, W. Hang, B. Huang, Elemental fractionation and matrix effects in laser sampling based spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 358–382.

<sup>183</sup> D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review. *J. Anal. At. Spectrom.* 32, (2017), 890-919.

depositadas en portaobjetos, las cuales presentan espesores de entre 2-30  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de ablación se optimizan de tal manera que se produzca la ablación completa del material con el láser (se arranca todo el volumen de la muestra). Paralelamente, las muestras empleadas como patrones de calibración deben tener el mismo espesor que las muestras y son ablacionadas también completamente a las condiciones de análisis optimizadas. De este modo, no es necesario tener en cuenta las diferencias en la profundidad de penetración del haz láser en el material de la muestra<sup>181</sup>.

A continuación, se describen algunas de las metodologías de cuantificación propuestas para el análisis de muestras biológicas por LA-ICP-MS:

- o **Estrategias basadas en el empleo de un patrón interno**

De forma análoga al ICP-MS por nebulización convencional, el uso de un patrón interno (IS, *internal standard*) puede ayudar a corregir los cambios de intensidad de la señal originados por la inestabilidad del instrumento y/o efectos de deriva que se pueden producir durante los largos tiempos de medición (el tiempo típico para realizar un *imaging* puede ser de varias horas). Además, los cambios en la composición de la matriz (p.ej., la diferente densidad celular o los tipos de células dentro de una muestra de tejido) pueden influir también en la cuantificación. Un patrón interno adecuado debe comportarse de forma similar al analito durante el proceso de ablación y en el ICP-MS, así como estar distribuido homogéneamente en la muestra y en los estándares de calibración<sup>184</sup>. En este contexto, el C (típicamente <sup>13</sup>C), constituyente principal en las muestras biológicas y que se distribuye uniformemente a lo largo de las mismas, ha sido empleado como patrón interno con frecuencia en un gran número de aplicaciones<sup>185</sup>. Sin embargo, estudios fundamentales han mostrado que las propiedades de transporte y las eficiencias del C pueden diferir notablemente de los de los analitos. Por tanto, emplear el C como normalización puede conducir a una

---

<sup>184</sup> C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh, P. Doble, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1494–1501.

<sup>185</sup> J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 813–818.

cuantificación inexacta<sup>186</sup>. Alternativamente se han propuesto marcadores elementales unidos covalentemente a ciertos componentes de la muestra. Por ejemplo, tinción con el intercalador de Ir ( $\eta^5$ -entametilciclopentadienilo)-iridio (III)-dipiridofenazina<sup>187</sup> o el tetraóxido de Ru (reacciona covalentemente con los dobles enlaces C-C de los ácidos grasos o de las moléculas no lipídicas). Sin embargo, para el caso del Ir, al ser un intercalador de ADN sólo se encuentra en el núcleo (no está distribuido homogéneamente)<sup>188</sup>. Otras alternativas radican en el empleo de capas constituidas por elementos homogéneamente distribuidos depositadas sobre o debajo de la muestra. La capa se ablaiona completamente junto con la sección de tejido o célula. Por ejemplo, Konz et al.<sup>189</sup> desarrollaron un enfoque de normalización basado en la deposición de una fina película homogénea de Au sobre la superficie del tejido.

- **Estrategias basadas en patrones de calibración que imitan la matriz de la muestra (calibración *matrix-matched*)**

En este campo de continua investigación se han desarrollado numerosas estrategias para la cuantificación de muestras biológicas, pero todavía no existe una estrategia de calibración de referencia. A continuación, se describen brevemente algunas de las estrategias desarrolladas para la cuantificación elemental. Se hará especial hincapié en aquellas usadas para la cuantificación de metales constitutivos de NPs en muestras biológicas (ya sean éstas internalizadas o empleadas como marcadores metálicos de inmunosondas para la detección de proteínas).

Los estándares de calibración preparados en laboratorio que intentan imitar la matriz de la muestra suelen crearse empleando geles de gelatina o empleando el pro-

---

<sup>186</sup> D.A. Frick, D. Günther, Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1294–1303

<sup>187</sup> D.A. Frick, C. Giesen, T. Hemmerle, B. Bodenmiller, D. Gunther, An internal standardisation strategy for quantitative immunoassay tissue imaging using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 254–259.

<sup>188</sup> R. Catena, L.M. Montuenga, B. Bodenmiller, Ruthenium counterstaining for imaging mass cytometry, *J. Pathol.* 244 (2018) 479–484.

<sup>189</sup> I. Konz, B. Fernandez, M.L. Fernandez, R. Pereiro, H. Gonzalez, L. Alvarez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3091–3096.

pio tejido homogeneizado al que se le añaden concentraciones crecientes del/los elemento(s) a cuantificar. La ventaja de este tipo de aproximaciones es la facilidad con la que se pueden ajustar las concentraciones de los elementos del calibrado a la muestra. Sin embargo, el proceso de producción debe ser validado, es decir, se debe llevar a cabo una caracterización de la composición elemental de los estándares empleados con una técnica de referencia. Para ello, se suele realizar una digestión ácida del estándar de calibración y se lleva a cabo la determinación elemental por ICP-MS con nebulización convencional<sup>190</sup>.

El trabajo pionero que publicó este tipo de estrategias de cuantificación fue realizado por Becker et al.<sup>191</sup> empleando tejido de cerebro homogeneizado al que se le añaden disoluciones de elementos en diferentes niveles de concentración. A modo de resumen, el protocolo de preparación de los estándares fue: (1) homogeneización y centrifugación del tejido, (2) adición de las disoluciones de metal, y (3) congelación de los estándares. Posteriormente, para la calibración por LA-ICP-MS, los estándares fueron seccionados al grosor requerido y ablacionados utilizando los mismos parámetros que para las muestras de cerebro humano en las que se llevó a cabo la cuantificación de elementos naturalmente presentes en los tejidos. Otros trabajos que emplean protocolos similares fueron presentados a posteriori por Hare et al.<sup>192</sup> y Jukowski et al.<sup>193</sup>. Las ventajas que presentan estas estrategias son la estabilidad a largo plazo del material congelado y que se pueden realizar múltiples criocortes de apenas unos  $\mu\text{m}$  de grosor a partir de una misma muestra. Otros trabajos publicados para la obtención de mapas cuantitativos de la distribución de NPs en diferentes tejidos es

---

<sup>190</sup> M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558.

<sup>191</sup> J.S. Becker, M.V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher, K. Zilles, Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3208–3216.

<sup>192</sup> D.J. Hare, J. Lear, D. Bishop, A. Beavis, P.A. Doble, Protocol for production of matrix-matched brain tissue standards for imaging by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Methods* 5 (2013) 1915–1921.

<sup>193</sup> K. Jukowski, M. Szewczyk, W. Piekoszewski, M. Herman, B. Szewczyk, G. Nowak, S. Walas, N. Miliszkievicz, A. Tobiasz, J. Dobrowolska-Iwanek, A standard sample preparation and calibration procedure for imaging zinc and magnesium in rats' brain tissue by laser ablation-inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1425–1431.

por ejemplo el presentado por Wiemann et al.<sup>194</sup> que emplea tejidos homogeneizados a los que se les añaden concentraciones crecientes de AuNPs. De esta manera es posible cuantificar los mapas de bioacumulación de AuNPs en diferentes tejidos de órganos de ratón (pulmón e hígado).

Otro enfoque comúnmente aceptado es el uso de matrices para los estándares que imiten la composición de la muestra biológica. Por ejemplo, el empleo de gelatina, agarosa, u otros compuestos como la nitrocelulosa. En particular, los geles de gelatina con concentraciones crecientes del elemento a cuantificar se vienen empleado frecuentemente desde hace varios años como estrategia de calibración para el análisis de secciones de tejido biológico. En este contexto Sala et al.<sup>195</sup> presentaron mejoras en la producción de este tipo de patrones al estudiar la influencia de varios parámetros (tipo y concentración de gelatina, acidez, temperatura de secado, etc.) en la calidad y homogeneidad del gel. Siguiendo esta estrategia, algunos trabajos recientemente publicados muestran el *imaging* elemental cuantitativo en diferentes tejidos. Por ejemplo, Rodríguez-Menéndez et al.<sup>196</sup> obtuvieron la distribución cuantitativa de Zn en tejidos criogénicos de retina y Bishop et al.<sup>197</sup> mostraron un mapa cuantitativo de la distribución de AgNPs en secciones de bazo de rata tras haber sido expuesta a AgNPs antimicrobiales. Resaltar también estudios recientes donde se ha evaluado el uso de suspensiones de AuNCs o la sal del metal inorgánica para preparar patrones de gelatina. En este último caso se observó una homogeneidad y sensibilidad para la

---

<sup>194</sup> M. Wiemann, A. Vennemann, F. Blaske, M. Sperling, U. Karst, Silver nanoparticles in the lung: toxic effects and focal accumulation of silver in remote organs, *Nanomaterials* 7 (2017) 441.

<sup>195</sup> M. Sala, V.S. Selih, J.T. van Elteren, Gelatin gels as multi-element calibration standards in LA-ICP-MS bioimaging: fabrication of homogeneous standards and microhomogeneity testing. *Analyst* 142, (2017), 3356–3359.

<sup>196</sup> S. Rodríguez-Menéndez, B. Fernández, M. García, L. Álvarez, M. L. Fernández, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, R. Pereiro, H. González-Iglesias, Quantitative study of zinc and metallothioneins in the human retina and RPE cells by mass spectrometry-based methodologies. *Talanta* 178, (2018), 222–230.

<sup>197</sup> D.P. Bishop, M. Grossgarten, D. Dietrich, A. Vennemann, N. Cole, M. Sperling, M. Wiemann, P.A. Doble, U. Karst, Quantitative imaging of translocated silver following nanoparticle exposure by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Methods* 10, (2018), 836–840.

señal de  $^{197}\text{Au}^+$  similar en ambos casos (patrones de gelatina con AuNCs o Au metálico) al ser medidos por LA-ICP-MS.<sup>198</sup> Alternativamente a los estándares suplementados que imitan la matriz de la muestra (tejidos homogeneizados o geles), se pueden encontrar estrategias basadas en el empleo de residuos secos de la disolución elemental (o la suspensión de NPs) depositados sobre el sustrato (p.ej., el tejido)<sup>199</sup>.

○ **Metodologías de cuantificación para la determinación de proteínas por LA-ICP-MS**

De la misma manera que para la detección de proteínas por ICP-MS con nebulización convencional o sc-ICP-MS, en los análisis por LA-ICP-MS la detección de la proteína se realiza siguiendo la etiqueta elemental empleada en la estrategia de marcaje con inmunosondas metálicas. Además de elegir una estrategia adecuada de cuantificación y/o patrón interno, para poder llevar a cabo una cuantificación de la biomolécula se ha de conocer la estequiometría de la relación metal:Ab. Es decir, se debe llevar a cabo la caracterización de la inmunsonda metálica (ver **Sección A.3.2.5**). A continuación, se presentan algunos de los trabajos recientes donde se obtiene la distribución cuantitativa de proteínas en muestras biológicas. Estas serán mostradas atendiendo al tipo de marca metálica empleada. Por una parte, se describen los trabajos basados en el empleo de quelatos y polímeros que contienen varios quelatos coordinando Ln (DOTA, DTPA, o MAXPAR ®) y finalmente se muestran aquellos basados en el empleo de MNPs.

En cuanto a los quelatos metálicos simples (DOTA) que coordinan un solo átomo por marca se han utilizado con éxito en varias aplicaciones de LA-ICP-MS. Para este tipo de aplicaciones el DOTA se suele funcionalizar (con residuos reactivos), por ejemplo, con Bz-SCN (isotiocianatobencilo). Este complejo se ha empleado para la detección múltiple de marcadores tumorales en tejido de cáncer de

---

<sup>198</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Anal Chem.* 90, (2018), 12145–12151.

<sup>199</sup> B. Malile, J. Brkic, A. Bouzekri, D.J. Wilson, O. Ornatsky, C. Peng, J.I.L. Chen, DNA-conjugated gold nanoparticles as high-mass probes in imaging mass cytometry. *ACS Appl Bio Mater.* 2, (2019), 4316–4323.

mama tras una etapa de IHC: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), citoqueratina 7 (CK7) y mucina 1 (MUC1) empleando el marcaje de los anticuerpos anti-Her2, anti-CK7 y anti-MUC1 con los complejos quelantes (Ho, Tm, y Tb)-DOTA, respectivamente<sup>200</sup>.

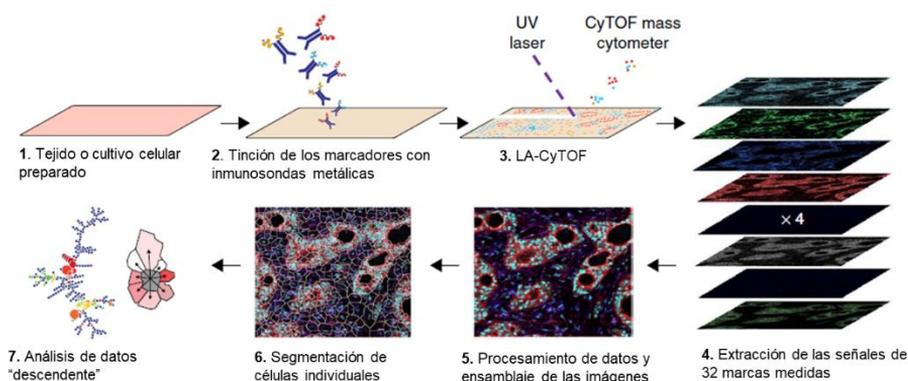
Por otra parte, las etiquetas poliméricas que contienen varios quelatos metálicos de un determinado metal o isótopo proporcionan una notable amplificación de la señal, como es el caso del reactivo comercialmente disponible MAXPAR®. La etiqueta polimérica metálica se une al Ab a través de un enlazador de maleimida, por reducción de disulfuro (**Sección A.3.2.4**). Normalmente, se conjugan cuatro o cinco de estos polímeros a cada Ab y cada MAXPAR® puede contener entre 14 y 22 quelantes DPTA (dependiendo del tipo), por lo que proporcionan una elevada amplificación de la señal en la detección de la biomolécula<sup>201</sup>. Este tipo de polímeros se han utilizado con éxito como etiquetas de anticuerpos en diferentes aplicaciones en combinación con ICP-TOF-MS para citometría de masas (CyTOF™)<sup>201</sup>. Adicionalmente, este tipo de estrategia se ha empleado con éxito con un sistema de LA para aplicaciones de *imaging* por citometría de masas con la posibilidad de obtener imágenes multiparamétricas de tejidos con resolución subcelular. En este sentido, cabe destacar el trabajo pionero de Giesen et al.<sup>202</sup> en el que consiguieron imágenes simultáneas de 32 biomoléculas (proteínas y modificaciones de proteínas) con polímeros que contienen Ln como elementos detectables. En la **Figura 22** se muestra a modo de ejemplo el flujo de trabajo seguido en esta publicación para llevar a cabo el análisis múltiple de proteínas y proteínas modificadas mediante la técnica de *imaging* múltiple de citometría de masas (CyTOF™) en muestras de cáncer de mama.

---

<sup>200</sup> C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne U. Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 83, (2011), 8177–83.

<sup>201</sup> S.D. Tanner, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, D.R. Bandura, T.C. George. An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. *Cancer Immunol Immunother.* 62, (2013), 955–65.

<sup>202</sup> C. Giesen, H.A. Wang, D. Schapiro, N. Zivanovic, A. Jacobs, B. Hattendorf, P.J. Schuffler, D. Grolimund, J.M. Buhmann, S. Brandt, Z. Varga, P.J. Wild, D. Gunther, B. Bodenmiller, Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 11, (2014), 417–22.



**Figura 22:** Flujo de trabajo de la técnica de *imaging* empleando LA-CyTOF<sup>TM</sup>. Imagen adaptada de la referencia *Giensen et al.*<sup>202</sup>

Por último, el empleo de anticuerpos marcados con MNPs en aplicaciones de LA-ICP-MS es todavía escaso a pesar de que los MNPs presentan una importante ventaja frente a los quelantes, puesto que la parte polimérica no metálica de estas etiquetas permite mejorar la relación entre el "número de átomos metálicos detectables" y el tamaño de la etiqueta. Uno de los trabajos publicados hasta la fecha se centra en el *imaging* de biomarcadores de cáncer de mama utilizando anticuerpos secundarios marcados con AuNPs de 5 nm<sup>203</sup>. Paul et al. presentan también el uso de AuNPs (10 nm) como etiqueta de un Ab secundario para el *imaging* de la tirosina hidroxilasa (enzima limitadora de la tasa de biosíntesis de la dopamina) en el cerebro de tejidos de ratón. Sin embargo, se debe comentar que se ha informado del riesgo de interacciones no específicas en el caso de procedimientos de IHC en tejidos biológicos<sup>204</sup>.

<sup>203</sup> J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics*. 8, (2008), 3775–3784.

<sup>204</sup> B. Paul B, D.J. Hare D.P. Bishop C. Paton, VT. Nguyen, N. Cole, et al. Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. *Chem Sci*. 6, (2015), 5383–93.

El uso de MNCs como etiquetas elementales para el *imaging* por LA-ICP-MS ha sido también estudiado en diferentes tipos de tejidos biológicos<sup>205</sup>. Además, en algunos casos se ha realizado una detección bimodal por ICP-MS y detección fluorescente. Recientemente, se ha publicado una estrategia de mapeo cuantitativo para metalotioneínas-1/2 en retina humana utilizando AuNCs solubles en agua con un tamaño medio de 2,7 nm y más de 500 átomos de Au por etiqueta<sup>206</sup>.

Como se ha descrito hasta ahora en esta sección de la Introducción de la presente Tesis Doctoral, existen diferentes tipos de metodologías a emplear para la obtención de *imaging* cuantitativos de proteínas en muestras biológicas, siempre teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el no disponer de materiales de referencia certificados. Se debe tener en cuenta que la mayor parte de las aplicaciones hasta la fecha están centradas en muestras de secciones de tejidos, sin embargo, la complejidad de las matrices de cultivos celulares hace que este tipo de muestras sean todavía más difíciles y se requieran de estrategias de cuantificación específicas.

---

<sup>205</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro R. Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* 197, (2019), 413-421.

<sup>206</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. Gonzalez-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Anal Chem.* 90, (2018), 12145-12151.





---

## B. OBJETIVOS

---



El objetivo general de la Tesis Doctoral es el desarrollo de estrategias analíticas de cuantificación de proteínas relacionadas con la DMAE en diferentes tipos de muestras biológicas, empleando MNCs como etiquetas de los anticuerpos específicos de las biomoléculas de interés y detección por ICP-MS.

Este objetivo general se divide en varios objetivos parciales, los cuales son enfocados en los diferentes capítulos que engloban la presente Tesis Doctoral.

### **Objetivo 1:**

Desarrollo de un protocolo de síntesis de PtNCs para obtener nanoestructuras estables, fluorescentes y monodispersas para su bioconjugación a anticuerpos específicos y su evaluación como marcas bimodales (fluorescentes y elementales) para la cuantificación de una proteína diana en muestras de suero empleando inmunoensayos ELISA en placa.

- Obtención de una estrategia de síntesis adecuada para los PtNCs, así como caracterización y bioconjugación de los PtNCs.
- Evaluación de los PtNCs como marcas bimodales para la determinación de una proteína “modelo”, el biomarcador de la enfermedad alérgica (IgE), llevando a cabo un inmunoensayo ELISA directo en placa con detección por fluorescencia e ICP-MS.

### **Objetivo 2:**

Obtención de un *imaging* simultáneo (cualitativo y semicuantitativo) de tres proteínas de interés en DMAE en secciones de tejidos oculares *post-mortem* de personas control y enfermos de DMAE por LA-ICP-MS empleando una estrategia de marcaje con NCs de tres metales diferentes (PtNCs, AuNCs, y AgNCs).

- Distribución individual de tres proteínas de interés en DMAE (APP, MT1/2 y CFH) en tejidos oculares *post-mortem* de personas control empleando los PtNCs sintetizados en el primero de los objetivos.

- Distribución cualitativa y semicuantitativa de APP, MT1/2 y CFH de manera simultánea, tanto en tejidos control como en tejidos de pacientes con DMAE empleando NCs de diferentes metales (PtNCs, AuNCs y AgNCs) como marcas elementales de cada proteína y análisis por LA-ICP-MS.

### **Objetivo 3:**

Desarrollo de una metodología para realizar el *imaging* cuantitativo de proteínas de interés en DMAE (APOE y MT2) por LA-ICP-MS en cultivos de células de EPR sometidos a un tratamiento inflamatorio con interleuquina-1 $\alpha$ . Para ello se propone el empleo de AuNCs de tamaño homogéneo como marca elemental para la cuantificación de las proteínas en células individuales.

- Optimización de la síntesis de AuNCs para obtener nanoestructuras altamente monodispersas para los estudios de cuantificación de proteínas en células de EPR.
- Estudio de diferentes tratamientos de inflamación para evaluar los niveles de expresión de dos proteínas en las células de EPR (APOE y MT2A).
- Síntesis y caracterización de patrones de calibrado *matrix-matched* empleando células de EPR dopadas con AuNCs.
- Cuantificación de APOE y MT2A en cultivos primarios de células humanas de EPR (HRPEsv40) tras ser sometidas a un tratamiento de inflamación empleando LA-ICP-MS y marcaje con AuNCs de tamaño homogéneo.

### **Objetivo 4:**

Cuantificación de APOE y MT2A de manera secuencial e independiente en células individuales del EPR, empleando la línea celular HRPEsv40 tras ser sometida a tratamiento inflamatorio con una citoquina mediante *single cell*-ICPMS.

- Optimización de las etapas de fijación de las células para asegurar su estabilidad e integridad en los análisis por sc-ICP-MS.
- Optimización del sistema de introducción de células en el ICP-MS.
- Desarrollo de inmunoensayos para la detección de las dos proteínas citosólicas en suspensión empleando AuNCs como marca elemental y sc-ICP-MS.
- Validación de las concentraciones de APOE y MT2A en células HRPEsv40 con kits ELISA.



---

# C. EXPERIMENTAL

## GENERAL

---



En este apartado se describen de manera general tanto los equipos empleados como las muestras biológicas analizadas en las diferentes aplicaciones desarrolladas a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Adicionalmente, se explican aquellos protocolos experimentales más generales o que son aplicados de manera similar en varios de los capítulos. Sin embargo, para una mejor comprensión de los resultados y su subsecuente discusión, aquellos materiales, reactivos y/o procedimientos experimentales específicos de una determinada metodología o tipo de muestra se describen más adelante en su correspondiente capítulo.

## **C.1. INSTRUMENTACIÓN**

A continuación, se recogen en primer lugar los equipos empleados para la caracterización de los MNCs sintetizados, así como de las inmunosondas bimodales (Anti-h-Ab:MNCs). Posteriormente se presentarán aquellos equipos usados para la determinación de las proteínas diana por detección fluorescente y por detección elemental ICP-MS.

### **C.1.1. Instrumentación empleada en la caracterización de los MNCs**

Los equipos requeridos para la caracterización de los MNCs sintetizados (PtNCs, AuNCs y AgNCs) empleados como marcas bimodales en la detección de las biomoléculas a lo largo de la Tesis Doctoral, son detallados a continuación.

#### **C.1.1.1. Dispersión dinámica de la luz**

El equipo de Dispersión dinámica de la luz (DLS) utilizado en la presente Tesis Doctoral es el Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd EEUU). DLS es una técnica ampliamente usada en el campo de la nanotecnología puesto que no es invasiva y está bien establecida para medir el tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños de macromoléculas y partículas en la región submicrométrica (típicamente entre 1 nm – 10 μm)<sup>1</sup>. El DLS es capaz de relacionar la difusión de las partículas (o

---

<sup>1</sup> Malvern Panalytical <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering> (último acceso 21.03.2022)

macromoléculas) en suspensión coloidal bajo movimiento browniano con el tamaño hidrodinámico de la partícula. Es decir, se mide la dispersión de la luz provocada por las partículas suspendidas en un líquido, al ser irradiadas con un haz de luz láser (193 nm). Por tanto, el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad permite conocer la velocidad del movimiento browniano de la suspensión de partículas, el cual se relaciona con el tamaño hidrodinámico de la partícula aplicando la ecuación de Stokes-Einstein<sup>2</sup>.

La distribución de tamaño hidrodinámico de la suspensión coloidal puede obtenerse en referencia a la intensidad, volumen, o número de dichas partículas en la suspensión. Sin embargo, el valor de la distribución de tamaño atendiendo al número de partículas es el que proporciona medidas más exactas, puesto que indica el valor promedio de la población de partículas mayoritaria (i.e., el valor de diámetro de la suspensión que presenta un mayor número de partículas de un determinado tamaño). De esta manera, se evita obtener información errónea por la presencia de agregados en la suspensión<sup>3</sup>. Adicionalmente, otra información interesante que ofrece esta técnica es el valor del índice de polidispersión de la suspensión coloidal, conocido como PDI (dato adimensional). El PDI da información sobre la dispersión en la distribución de tamaños de una suspensión, siendo un valor menor a 0,1 indicativo de una suspensión altamente monodispersa (i.e., MNCs de buena calidad por tener todos un tamaño muy similar), mientras que un valor mayor o igual a 0,4 indica elevada polidispersión (i.e., MNCs de mala calidad por tener una gran dispersión de tamaños y/o presencia de agregados en la suspensión)<sup>3</sup>.

Por otro lado, el equipo de DLS permite realizar medidas de potencial-Z, una medida indirecta de la estabilidad frente a la tendencia a la agregación. La mayoría de las dispersiones coloidales tienen una carga superficial originada por la naturaleza de las partículas y el medio que las rodea (doble capa eléctrica). La estabilidad de un

---

<sup>2</sup> Falke S., Betzel C. Dynamic Light Scattering (DLS). In: Pereira A., Tavares P., Limão-Vieira P. (eds) Radiation in Bioanalysis. Bioanalysis (Advanced Materials, Methods, and Devices), vol 8 (2019) Springer, Cham.

<sup>3</sup> Horiba, <https://horiba.com/int/scientific/products/particle-characterization/particle-education/particle-size-result-interpretation>, (último acceso 23.05.2022)

sistema coloidal puede determinarse sumando las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica<sup>4</sup>. Los factores que afectan al potencial-Z, incluyen el pH, la conductividad y la concentración, considerándose generalmente que sistemas que muestran un potencial Z entre +30 y -30 mV son más inestables y tienden a largo plazo a la agregación<sup>5</sup>. Para llevar a cabo este tipo de medidas, el instrumento Malvern Zetasizer Nano utiliza microelectroforesis doppler. Para ello, se aplica un campo eléctrico a una dispersión de partículas que se mueven con una velocidad, conocida como velocidad electroforética, y a partir de esta se puede relacionar la distribución de potencial Z de la suspensión.

Para realizar las medidas se emplean cubetas desechables BRAND™ para las medidas de la dispersión, mientras que para las medidas de potencial-Z se han empleado las celdas capilares Malvern Panalytical INC DTS1070 (ambas de la casa comercial Thermo Fisher Scientific).

#### **C.1.1.2. Medidas por espectroscopía**

Para la caracterización de los MNCs se han realizado diferentes medidas con dos métodos espectroscópicos, como son la espectrometría de fluorescencia molecular y la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta/visible (UV-VIS). Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se emplea un espectrofluorímetro modelo LS50B de Perkin-Elmer. Este equipo está compuesto por: (1) fuente de radiación: lámpara de descarga de Xe, (2) monocromadores (Monk-Gillieson) que cubren el rango de excitación y emisión entre 200-800 nm, (3) rendijas modificables en la entrada y salida del compartimento donde se sitúa la muestra (en el caso de la rendija de excitación entre 2,5-15,0 nm, y para la rendija de emisión entre 2,5-20,0 nm con incrementos de 0,1 nm), y (4) el detector tipo fotomultiplicador. Además, de

---

<sup>4</sup> S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Journal of Controlled Release 235, (2016), 337-351.

<sup>5</sup> [www.guialab.com.ar](https://www.guialab.com.ar) Guialab. Técnicas de caracterización de nanopartículas. <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/tecnicas-complementarias-de-caracterizacion-de-nanopartículas/> (última consulta 21.03.2022)

barridos de excitación o de emisión entre las longitudes de onda mencionadas, también permite la opción de realizar barridos sincrónicos tanto a una longitud de onda constante como a una diferencia de energía constante. La velocidad de barrido se puede seleccionar de 10 a 1500 nm·min<sup>-1</sup> con incrementos de 1 nm·min<sup>-1</sup>. La exactitud de la longitud de onda es de  $\pm 1$  nm y la reproducibilidad de  $\pm 0.5$  nm.

También se emplea un espectrofotómetro UV-VIS Cary 60 (Agilent Technologies). Este espectrofotómetro dispone de una lámpara pulsante de Xe como fuente de radiación, un monocromador tipo Czerny Turner, y permite un barrido en todo el espectro UV-Vis desde 190 a 1100 nm.

En ambos casos, tanto para las medidas de fluorescencia como para las medidas de absorbancia por UV-VIS, se emplea una cubeta de cuarzo modelo 101-Qs de Hellma® (Sigma-Aldrich).

### **C.1.1.3. Microscopía electrónica: HR-TEM y EDX**

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite llevar a cabo la caracterización estructural de los nanomateriales, es decir, obtener la morfología, tamaño, y estructura cristalina de los MNCs. Esta técnica aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones acelerados (cañón de electrones LaB<sub>6</sub> acelerados hasta 200 kV) colisiona con la muestra de interés (MNCs depositados en una rejilla de Cu). En función del espesor de la muestra y del tipo de átomos que la forman, un porcentaje de los electrones del haz son dispersados y la otra parte atraviesan la muestra. Esto permite generar una imagen con elevada información estructural de la muestra. En concreto, la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) permite generar imágenes de la estructura de una muestra a nivel atómico (resolución de 0,5 Å). Por ello es habitualmente requerido en el estudio de nanomateriales con pequeñas dimensiones, como es el caso de los MNCs sintetizados en la presente Tesis Doctoral.

El equipo de HR-TEM empleado a lo largo de la presente Tesis Doctoral ha sido el modelo JEM-2100 de la casa comercial JOEL dispuesto con un espectrómetro

de energía dispersiva de rayos X (EDX) para el microanálisis. El microscopio electrónico posee hasta 200 kV de aceleración y está equipado con un cañón de electrones de emisión de campo, el cual permite obtener un haz de luz muy intenso (alto brillo y estabilidad del haz de electrones) y de tamaño sub-nanométrico. El potencial de aceleración empleado, junto a la incorporación de un lente objetivo de alta resolución, permite alcanzar una resolución de 1,9 Å entre puntos y 1,0 Å entre líneas. El equipo dispone además de una cámara CCD de alta resolución (2048 x 2048 píxeles) y la unidad de EDX permite la detección de los elementos presentes en la muestra (i.e., es posible obtener la composición elemental de la muestra). El equipo también posee una unidad de barrido por transmisión con detectores de campo claro (BF, *Bright field*) u oscuro (DF, *Dark field*), siendo el más usado el primero de ellos, donde los átomos de elementos de elevada masa atómica (p.ej., Pt, Au, y Ag) se observan en color oscuro (escala de negro-gris) y aquellos átomos de masas bajas en color claro.

Adicionalmente, el instrumento dispone de una unidad *DigiSTAR* (Nanomegas) para la adquisición de patrones de difracción de área selecta (SAED). Con este tipo de micrografías es posible conocer la estructura cristalina de la muestra (o celda unidad que la forma). En la sección de Procedimientos Experimentales **C.4.3** (Caracterización de las MNCs) se describen los pasos necesarios para conocer la estructura cristalina de los MNCs.

## **C.1.2. Instrumentación empleada para la detección de las inmunosondas por MS y fluorescencia**

### **C.1.2.1. Espectrometría de masas elemental: ICP-MS**

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado cuatro equipos diferentes de ICP-MS, los cuales se pueden dividir en dos grupos atendiendo al tipo de analizador de masas: ICP-MS de tipo cuadrupolo, e ICP-MS con un analizador de sector magnético de doble enfoque (ICP-MS de alta resolución). En ambos casos se trata de ICP-MS con analizadores de tipo secuencial. Estos equipos han sido usados a lo largo de la presente Tesis Doctoral para medidas por nebulización convencional, medidas

por *single cell*-ICP-MS y acoplados a sistemas de ablación láser (LA-ICP-MS). A continuación, se detallan brevemente las principales características de estos.

### □ ICP-MS de tipo cuadrupolo

Fueron utilizados tres instrumentos diferentes, dos de ellos de la casa comercial Agilent Technologies (modelo 7500ce, y modelo 7900) y otro de la casa comercial Perkin-Elmer (modelo 350 X). Ambos ICP-MS de Agilent Technologies están instalados en los laboratorios de la Unidad de Masas de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (SCTs), mientras que el equipo de Perkin-Elmer pertenece a un laboratorio de la Universidad de Creta (Grecia) y fue el usado durante la estancia predoctoral (sc-ICP-MS).

Para los análisis por ICP-MS con nebulización convencional, las disoluciones se introducen mediante una bomba peristáltica al nebulizador de tipo concéntrico (flujo alrededor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ). Posteriormente pasan a la cámara de nebulización (de cuarzo) que está refrigerada con un sistema tipo Peltier. La antorcha es una sola pieza de cuarzo, con un inyector de 2,5 mm de diámetro interno. Ambos conos de extracción son de Ni y el cuadrupolo tiene un rango de medida de masa de 2 a 260 uma. El detector es un multiplicador de electrones secundarios, el cual puede trabajar en modo analógico o digital. El ICP-MS posee además una celda de colisión/reacción situada antes del cuadrupolo que permite eliminar interferencias poliatómicas mediante la adición de un flujo de gas (He o H<sub>2</sub>). Diariamente se realiza una calibración del sistema con una disolución patrón multielemental (con una concentración de  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) con el objeto de optimizar la sensibilidad del sistema (se persigue obtener la máxima señal, controlando la generación de óxidos y los iones doblemente ionizados).

El analizador de masas de tipo cuadrupolo es el más utilizado en los instrumentos ICP-MS debido a su bajo coste (en comparación con el resto de los analizadores de masas) y su robustez, lo que permite su implantación como técnica de rutina. El analizador de tipo cuadrupolo consiste en cuatro electrodos cilíndricos dispuestos paralelamente con la misma longitud y diámetro. Para la medida se aplica corriente

continua y de radiofrecuencia en los cuatro cilindros, pero con polaridad inversa dos a dos, de tal manera que sólo los iones con una determinada relación  $m/z$  atraviesan el analizador sin desviar su trayectoria y alcanzan el detector. Con este tipo de analizadores se alcanza una resolución de masa del orden de 300.

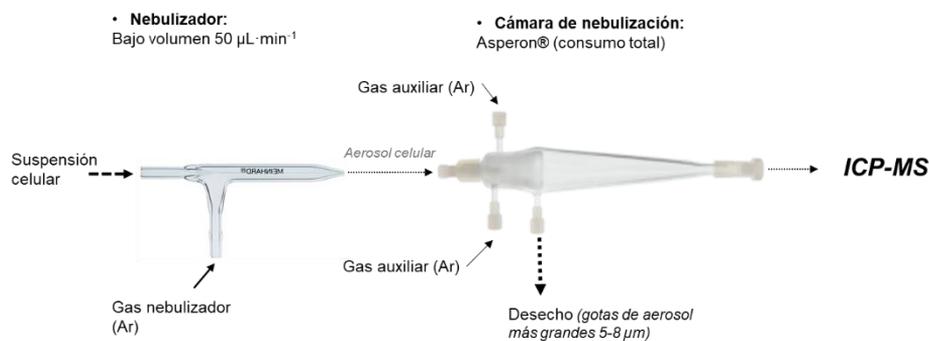
Para solucionar el problema de las posibles interferencias espectrales, este tipo de instrumentos poseen generalmente una celda de colisión/reacción (CRC, *collision, reaction cell*). En la CRC se introduce un gas de colisión (p.ej., He) o reacción (p.ej.,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$  u  $\text{O}_2$ ) que permite reducir las interferencias poliatómicas para los analitos. En la presente Tesis Doctoral sólo se ha hecho uso de la celda de colisión para resolver la interferencia del  $^{56}\text{Fe}^+$  ( $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ , y  $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ ) en los análisis por sc-ICP-MS. En este caso, se empleó la celda de colisión en modo He ( $4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). En el resto de las aplicaciones donde se monitorizan los elementos de los MNCs (Au, Pt, y Ag) no se requirió la celda de colisión, ya que estos elementos no presentan interferencias espectrales.

#### □ Sistema para *single cell*-ICP-MS

En las medidas por sc-ICP-MS se utilizó el ICP-MS NexION 350 X para detectar las señales de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  en células individuales. Este equipo permite ajustar el tiempo de *dwell time* hasta valores de 0.075 ms para poder registrar las señales transitorias de la nube de iones que llegan al detector provenientes de una única célula. Además, dispone de un sistema de introducción de muestra adecuado que asegura la integridad celular y su transporte de manera eficaz hasta el ICP.

El sistema consiste en un micronebulizador concéntrico de alta eficacia (*high efficiency nebulizer*, HEN) de Meinhard® que usa bajos flujos de inyección ( $0,05 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) lo que es adecuado para medida de micromuestras. El nebulizador está acoplado a una cámara de nebulización de consumo total de pequeño volumen Asperon® (Perkin-Elmer), 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 (gas auxiliar, Ar) que ayuda a incrementar la eficiencia de transporte, minimizando la deposición de células por el

impacto en sus paredes. En la **Figura 23** se muestra la imagen, así como una pequeña descripción, del sistema de introducción de muestra empleado para la determinación de proteínas en células individuales.

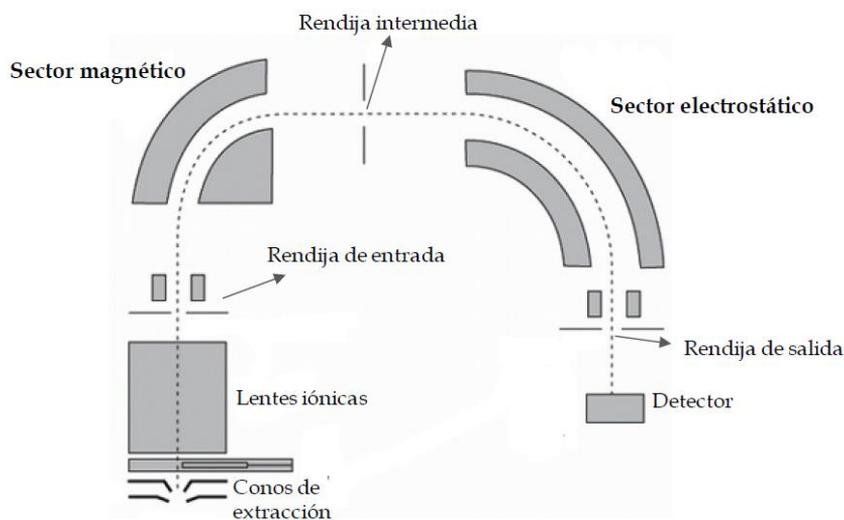


**Figura 23:** Sistema de introducción de muestra para sc-ICP-MS. En la imagen se muestra el nebulizador de bajo volumen de Meinhard®, y una cámara de nebulización concéntrica Asperon® de consumo total de Perkin-Elmer.

#### □ ICP-MS de sector magnético de doble enfoque

El ICP-MS de doble enfoque Element™ 2 (Thermo Fisher Scientific) se ha utilizado para llevar a cabo las medidas de *imaging* por LA-ICP-MS en secciones de tejidos biológicos (Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral).

Este equipo cuenta con un analizador de masas de sector magnético de doble enfoque, que incluye un electroimán que permite aplicar un campo magnético y un campo eléctrico al haz de iones proveniente del plasma (ver **Figura 24**). En primer lugar, los iones atraviesan un campo magnético perpendicular a su trayectoria que se encarga de ejercer fuerza lateral para que los iones describan una trayectoria circular cuyo radio de curvatura depende de su relación  $m/z$ . Por lo tanto, los iones que tengan la trayectoria adecuada pasarán a través de la rendija intermedia. A continuación, los iones que entran con distinta energía se aceleran adquiriendo energía cinética mediante la acción de un campo eléctrico y actúa además como un filtro energético. Este campo hace que únicamente los iones con la energía cinética adecuada lleguen a la rendija de salida. Variando el campo magnético en función del tiempo los iones de distinta masa se detectarán de manera secuencial.



**Figura 24:** Esquema de un sistema ICP-MS de sector magnético.

El poder de resolución de masas ( $R$ ) de este equipo (i.e., 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 de masas: 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. En la presente Tesis Doctoral se emplea la baja resolución de masas para las medidas realizadas, puesto que los elementos medidos (Au, Ag, y Pt) no presentan interferencias espectrales.

Al igual que se hace con el ICP-MS de tipo cuadrupolo, diariamente se realiza la optimización de varios parámetros experimentales (p.ej., flujo de Ar, posición de la antorcha, voltajes de las lentes, etc.) para maximizar la sensibilidad, así como controlar la formación de óxidos. Para ello se utiliza una disolución estándar multielemental ( $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). En el caso del ICP-MS de sector magnético, además de la sensibilidad se ajusta otro parámetro, denominado *mass offset*, para corroborar que todos los elementos que van a ser analizados en la muestra están siendo detectados en el

máximo del pico. Para ello se emplea una disolución de los analitos a un nivel de concentración de  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### C.1.2.2. Sistemas de ablación láser

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han usado dos sistemas de ablación láser: un sistema de ablación láser de estado sólido (modelo LSX-213 de la casa comercial Teledyne Cetac Technologies) y un sistema de ablación láser tipo gas excímero ArF (NWR-193 de la casa comercial Elemental Scientific). Cada uno de los sistemas de LA se ha acoplado a un ICP-MS diferente: el sistema LSX-213 fue acoplado al ICP-MS Element™ 2, mientras que el sistema NWR-213 se acopló al ICP-MS tipo cuadrupolo (7900 de Agilent).

#### □ Sistema de ablación láser de estado sólido (@213 nm)

El sistema LSX-213 emplea un láser de tipo Nd:YAG. Se trata de un láser pulsado de nanosegundos (duración de los pulsos  $<6 \text{ ns}$ ), con longitud de onda de la radiación láser de 213 nm (UV lejano). La energía del láser es modulable y es posible modificar el porcentaje de energía aplicada a la muestra dependiendo de cada aplicación (energía máxima 5,6 mJ). Los diámetros del haz de láser varían desde  $10 \mu\text{m}$  a  $200 \mu\text{m}$  de diámetro, la velocidad de barrido puede seleccionarse en amplio rango de valores ( $1\text{-}50 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), y la frecuencia de repetición se puede modificar en el rango de 1-20 Hz.

Para llevar a cabo los estudios de *imaging*, se hizo uso de una celda de ablación refrigerada (que puede llegar hasta los  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) desarrollada específicamente para este sistema láser en el Grupo de investigación<sup>6</sup>. Dicha celda permite controlar la temperatura de la muestra de manera constante durante el análisis (a través de un termopar situado sobre la superficie de la muestra), lo que mejora las prestaciones del análisis

---

<sup>6</sup> Konz, I., Valenzuela Castañeda, A., Fernández Sánchez, M. L., Pereiro García, R. Sanz Medel, A. Celda de ablación criogénica con control de la temperatura de la muestra. *Patente ES 2 425 138 A1*, 11 de Octubre de 2013 (España).

en el caso de muestras biológicas (p.ej., mejor resolución lateral al disminuir los efectos térmicos de la ablación)<sup>7</sup>. El volumen total de la celda en el que tiene lugar la expansión del aerosol es de aproximadamente 20 cm<sup>3</sup>. Además, la entrada de gas tiene una entrada circular de 2 mm de diámetro y la salida de gas tiene forma de embudo, específicamente diseñada para asegurar un flujo de gas laminar dentro de la celda. La celda de ablación está situada sobre una platina motorizada en los ejes X-Y-Z, moviéndose en rangos mínimos de 0,25 μm. El eje Z de la platina es el encargado de realizar el enfoque correcto de haz láser sobre la superficie de la muestra a analizar (el enfoque se realiza con una cámara CCD). Todo el sistema está informatizado y se maneja a través del software DigiLaz III. Para el tratamiento de los datos (i.e., generar imágenes 2D para los analitos detectados en el ICP-MS) se ha empleado el software Image J (National Institutes of Health. NIH, EEUU).

#### ❑ Sistema de ablación láser tipo excímero (@193 nm)

Este sistema láser está basado una mezcla de gas Ar y F<sub>2</sub> que forman un dímero excitado inestable (ArF) al ser irradiado con una fuente de energía. El excímero inestable regresa al estado fundamental emitiendo energía en forma de radiación a 193 nm y provocando su disociación. El sistema de ablación láser usado es de la casa comercial Elemental Scientific – ESI, así como la mezcla de gas Argon-Flúor también es suministrada por ESI. Adicionalmente, es necesario gas N<sub>2</sub> (99.999 % pureza) como gas de purga para el acondicionamiento del láser antes de cada medida.

Este sistema de ablación láser de alto rendimiento utiliza una fuente de láser de gas excímero a 193 nm con pulsos de nanosegundos (duración de los pulsos < 4 ns) que proporciona mayor potencia de pico para la ablación de todos los materiales, produciendo pequeñas partículas (aerosol) que son transportadas e ionizadas eficientemente en el ICP. Esto implica mayor sensibilidad, estabilidad y menor fracciona-

---

<sup>7</sup> I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control. *Anal Chim Acta*, 809, (2014), 88-96.

miento elemental. La fluencia del láser es modulable siendo posible modificar el porcentaje aplicado a la muestra (densidad de energía máxima  $12,0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Los diámetros del haz de láser varían desde  $1 \text{ }\mu\text{m}$  a  $150 \text{ }\mu\text{m}$  y presenta la opción de haz de ablación circular (modo IVA, *infinitely variable apertures*) o rectangular (modo XYR, *rotating XY*), lo que permite un aumento en la flexibilidad de las aplicaciones. La velocidad de barrido puede seleccionarse en un amplio rango de valores ( $1\text{-}200 \text{ }\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ), y la frecuencia de repetición se puede ajustar dentro de un rango de  $1\text{-}300 \text{ Hz}$ .

La celda de ablación empleada es la TwoVolume2 de ESI (Elemental Scientific). Esta celda ofrece un área de trabajo mayor de  $100 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$  donde se puede colocar más de una muestra en su superficie de trabajo. Dispone de una copa móvil que se desplaza por toda la superficie de la celda y se sitúa en la región de la muestra a ablacionar para recoger eficientemente las partículas del aerosol. Otra característica importante es la reducción de tiempos de evacuación de hasta  $600 \text{ ms}$ . Además, se pueden alcanzar tiempos de evacuación ultrarrápidos ( $80\text{-}100 \text{ ms}$ ) colocando un accesorio adicional DCI (*dual concentric injection*) que permite realizar *imaging* con alta resolución. Para el tratamiento de los datos (i.e., generar imágenes 2D de los analitos detectados por ICP-MS) se ha empleado el software Iolite v4 (Universidad de Melbourne, Australia).

### C.1.2.3. Microscopía confocal

La microscopía láser confocal es una técnica de observación microscópica que ofrece diversas ventajas frente a la microscopía óptica tradicional, en especial la obtención de imágenes con una mayor nitidez y contraste, una mayor resolución, y la obtención de “secciones ópticas” o “planos focales” de una muestra, lo cual hace posible llevar a cabo el estudio tridimensional de la misma.

A diferencia de la microscopía óptica tradicional donde el haz de luz interactúa con la totalidad de la muestra (en toda su profundidad), en microscopía láser confocal, el haz de luz láser es enfocado en una pequeña región, denominada plano focal. Esto permite obtener imágenes de un único plano (de un grosor,  $\mu\text{m}$ , fijado), eliminando la luz proveniente de planos contiguos. Para llevar a cabo esta selección

del plano, un microscopio de láser confocal dispone de dos diafragmas (*pinhole*), uno entre la fuente de luz y el objetivo, y el otro entre el objetivo y el detector. El proceso de obtención de imágenes es de la siguiente: parte de la luz que proviene de la fuente y atraviesa el primer diafragma, es reflejada mediante un espejo dicróico, y enfocada en un punto de la muestra mediante la lente del objetivo. La señal emitida, bien sea fluorescencia o luz reflejada, vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicróico y es enfocada a un detector. Delante de dicho detector se encuentra el segundo diafragma, el cual elimina las señales procedentes de la zona fuera de foco. Es importante que los dos diafragmas estén perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal (eliminando así las contribuciones del resto de los planos). La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un tubo fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y se almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda.

El microscopio láser confocal empleado en esta Tesis Doctoral es el modelo TCS-SP8X (Leica). Posee un diodo láser de 405 nm y un láser blanco con libre selección de líneas de excitación en el rango de 470 a 670 nm. Se trata de un microscopio invertido para poder observar luz transmitida y fluorescencia con luz incidente. Posee 6 objetivos: 10x (seco), 20x (seco), 20x (inmersión en aceite), 40x (inmersión en aceite), 40x (inmersión en agua), y 63x (inmersión en aceite), aunque el empleado para obtener las imágenes de la Tesis Doctoral ha sido siempre el 63x con inmersión en aceite. El sistema de detección es espectral libre de filtros. Posee cuatro detectores internos (2 fotomultiplicadores y 2 detectores híbridos de alta sensibilidad), además de un detector externo para iluminación transmitida. Por último, también presenta una platina motorizada en XY de alta precisión para realizar mosaicos de imágenes y una platina galvanométrica de alta velocidad y precisión para movimiento en Z (enfoque).

### C.1.3. Instrumentación general

- **pH-metro.** Modelo “Five Easy pH/mV” de Mettler Toledo. Utilizado para llevar a cabo el ajuste del pH de disoluciones necesarias durante la preparación de las muestras y disolventes.
- **Balanza analítica** (incertidumbre: 0,1 mg). Modelo ME104 de Mettler Toledo. Utilizada para la preparación de todas las disoluciones medidas por ICP-MS. Para lograr una mayor precisión en las medidas, el cálculo de la concentración en cada disolución se llevó a cabo siempre teniendo en cuenta los valores de las pesadas en lugar de trabajar con volúmenes.
- **Agitador vórtex.** Modelo V05 Series de LBX Instruments. Utilizado para homogeneizar las disoluciones.
- **Baño de ultrasonidos** (J. P. Selecta). Empleado para diferentes propósitos a lo largo de todo el experimental como para mejorar la solubilidad de sales orgánicas, digestión ácida de MNCs, y facilitar la mineralización de las muestras.
- **Microtomo y Criotomo.** Microtomo rotatorio modelo HM325 y criotomo o microtomo criostato modelo HM550 ambos de Thermo Fisher Scientific. Empleados para realizar los cortes micrométricos de tejidos oculares FFEP, y los cortes de los patrones de gelatina congelados (-20 °C), respectivamente.
- **Centrífuga.** Diferentes modelos y tamaños de centrífugas dependiendo del volumen de muestra y revoluciones requeridas. Usadas en etapas de purificación y lavado.
- **Estufa de laboratorio** (Mettler). Empleada durante etapas de incubación de los inmunoensayos.
- **Incubador.** Modelo 311 de Thermo Fisher Scientific. Necesario para el mantenimiento óptimo de las líneas celulares humanas de EPR: 37 °C y flujo de 5% de CO<sub>2</sub>.

- **Cabina de flujo laminar.** Modelo Testlar Bio II A/G (Testlar). Requerida para proporcionar un espacio con las condiciones óptimas de seguridad, proporcionando una zona de aire limpio para llevar a cabo los experimentos con cultivos celulares.
- **Autoclave de laboratorio.** VARIOKLAV® (Thermo Fisher Scientific). Utilizado para la esterilización de material y reactivos de uso en experimentos de cultivos celulares.
- **Hemocitómetro cámara Neubauer** (Sigma Aldrich). Usado para la tarea de conteo celular.
- **Microscopios ópticos.** Microscopio de transmisión modelo DM IL LED de Leica utilizado para llevar a cabo el conteo de las células y el control diario de las mismas. Microscopio de epifluorescencia (modelo Leica DM6000) equipado con una cámara DFC310 Fx Leica y el software “Advance Fluorescence AF6000 software” (Leica Microsystems CMS GMBH) se utilizó para obtener las imágenes de inmunofluorescencia.
- **Fluorímetro picodrop™:** (Thermo Fisher) para la cuantificación indirecta de RNA en alícuotas de lisado celular.
- **Termociclador de 96 pocillos Veriti™ HID y 7500 RT-PCR** (ambos de Applied Biosystems™, Thermo Fisher) usados para llevar a cabo la transcripción inversa de ARN a AND y para la PCR cuantitativa, respectivamente.
- **Lectores de placas.** modelo ELX800 (BioTek) y modelo 2030 VICTORTM X5 (Perkin-Elmer) diseñados para realizar automáticamente análisis de absorbancia de los productos resultantes en las aplicaciones basadas en ELISA. El lector puede medir la densidad óptica de las disoluciones en microplacas de 6, 12, 24, 48 ó 96 pocillos. El rango de longitud de onda es de 400 nm a 750 nm.

### C.2. MATERIALES Y REACTIVOS

#### C.2.1. Material general

A continuación, se recoge el material común que ha sido empleado en la realización del trabajo experimental a lo largo de la Tesis Doctoral:

- **Micropipetas de volumen ajustable.** Micropipetas con diferentes volúmenes: 0,5-10  $\mu$ L 10-20  $\mu$ L; 20-200  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L; y 0,5-5 mL, todas ellas de Eppendorf con sus correspondientes puntas de plástico desechables.
- **Pipetas Pasteur** de 1,5 y 3 mL de volumen (Thermo Fisher Bremen).
- **Tubos:** tubos estériles de 12 mL, tubos de centrífuga de 15 mL, y tubos de 0,5, 1,5 y 2 mL (Eppendorf).
- **Guantes de nitrilo** (LLG).
- **Portaobjetos de microscopio:** recubiertos en su superficie con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences) requeridos en los Capítulos I y II como soporte para realizar un inmunoensayo en placa (con detección por microscopía de láser confocal), así como para depositar las secciones de tejidos oculares en los que se realiza la IHC.

##### C.2.1.1. Material empleado en los cultivos celulares

A continuación, se recogen el material general requerido en el laboratorio de cultivos celulares (en este caso se trata siempre de materiales esterilizados).

- **Frascos de cultivo celular** (*flask*) T25, T75 y T125 (Thermo Fisher Scientific).
- **Placas de cultivo celular** de 6, 12, y 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific).
- **Cámaras de cultivo celular** en portaobjetos de Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Fisher Scientific) para cultivos celulares medidos por LA-ICP-MS y microscopía confocal.
- **Propipeta automática** con sus correspondientes pipetas Pasteur de plástico de 1, 5, 10 y 25 mL de Eppendorf.

- **Jeringas de plástico y filtros de jeringa** estériles con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  de Millipore® Merck.

## C.2.2. Reactivos generales

A continuación, se describen los reactivos generales que se han empleado a lo largo de la Tesis Doctoral, clasificándolos según el tipo de experimentos que se han realizado (p.ej., síntesis de MNCs, sc-ICP-MS, LA-ICP-MS, etc.). En cualquier caso, para facilitar una mejor comprensión del desarrollo experimental para cada uno de los Capítulos de la Tesis, los reactivos específicos serán descritos en detalle en cada uno de los capítulos. Todos los reactivos empleados han sido de grado analítico. En particular, el agua empleada para preparar todas las disoluciones acuosas ha sido agua ultrapura desionizada, resistividad 18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  @25°C (Purelab Flex 3&4; ELGA-Veolia).

### C.2.2.1. Reactivos para la síntesis de las inmunosondas metálicas

#### Reactivos para la síntesis de MNCs

- Sales metálicas precursoras:  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  (8% en peso líquido; Sigma-Aldrich),  $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (99% sólido; Sigma-Aldrich), y  $\text{AgNO}_3$  (99.9% sólido; Alfa Aesar, Thermo Fisher).
- Ligando estabilizante tiolado (-SH): AL (>98% sólido; Across Organics).
- Agente reductor fuerte:  $\text{NaBH}_4$  (98% sólido, Sigma-Aldrich).
- Otros reactivos necesarios: NaOH (Sigma-Aldrich), y propan-2-ol (Fisher Scientific).

#### Reactivos para la bioconjugación (reacción de la carbodiimida)

Aparte de los anticuerpos específicos a los que se unen los MNCs, los cuales serán descritos con detalle en cada Capítulo (dependiendo de la proteína diana), los reactivos usados en todos los casos son:

- 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (98% sólido; Across Organics).

- N-hidroxisuccinimida (NHS) (> 98% sólido; Sigma-Aldrich).
- Disolventes para la bioconjugación de los AgNCs: Base TRIS (> 99% sólido; Sigma-Aldrich), ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) (Panreac AppliChem), y L-glutación reducido (>98% sólido; Sigma-Aldrich).
- Ácidos: ácido nítrico (HNO<sub>3</sub> 67-69%, análisis de trazas; VWR chemicals), y ácido clorhídrico (HCl 37%, VWR chemicals).

### C.2.2.2. Reactivos para los análisis por ICP-MS y LA-ICP-MS

- **Disolución multielemental** (contiene Li, Co, Y, Ce, y Tl, entre otros elementos con una concentración de 1 ng·mL<sup>-1</sup>, Agilent Technologies). Se emplea para calibración diaria del equipo ICP-MS para obtener unas condiciones óptimas de sensibilidad (monitorizando las m/z: <sup>7</sup>Li<sup>+</sup>, <sup>89</sup>Y<sup>+</sup>, y <sup>205</sup>Tl<sup>+</sup>), y minimizar la formación de óxidos (CeO<sup>+</sup>/Ce<sup>+</sup>, <0,2%) y dobles cargados (Ce<sup>++</sup>/Ce<sup>+</sup>, <0,2%). También es importante la monitorización del <sup>59</sup>Co<sup>+</sup> para optimizar el flujo de gas de colisión (He) con el que se elimina las interferencias poliatómicas.
- Para la optimización diaria del sistema láser se emplea un vidrio de referencia **SRM NIST 612** (National Institute of Standards & Technology, NIST) a fin de garantizar una elevada sensibilidad (monitorizando las m/z: <sup>59</sup>Co<sup>+</sup>, <sup>139</sup>La<sup>+</sup>, <sup>232</sup>Th<sup>+</sup> y <sup>238</sup>U<sup>+</sup>), una buena estabilidad de la señal (desviación estándar relativa por debajo del 4%), ausencia de efectos de fraccionamiento (relación <sup>238</sup>U<sup>+</sup>/<sup>232</sup>Th<sup>+</sup> ~1), y minimizar la formación de óxidos (ThO<sup>+</sup>/Th<sup>+</sup> < 0,2%).
- **Patrones ácidos inorgánicos** para elaborar las rectas de calibración externa para la cuantificación por ICP-MS. Se emplean disoluciones con una concentración de partida de 1000 µg·mL<sup>-1</sup> para Pt, Ag, Au, Ir, Rh, y Fe de Merck Millipore.
- Para llevar a cabo los análisis en disolución empleando el ICP-MS con nebulización convencional, tanto las muestras biológicas como los patrones inorgánicos son previamente preparados en disoluciones acuosas con

---

porcentajes de 1-3% de ácido nítrico. Adicionalmente, el ácido clorhídrico se usa en porcentajes bajos para limpieza de las conexiones del ICP-MS (eliminar los efectos de memoria del  $^{197}\text{Au}^+$ ) y junto con ácido nítrico para producir agua regia ( $\text{HNO}_3:3\text{HCl}$ ), empleada como oxidante para la digestión de los MNCs antes de su introducción al ICP-MS.

- **Gases** suministrados por Air Liquide: Ar (99,999 % pureza) como gas de nebulización para generar el plasma del ICP-MS, He (99,999 % pureza) como gas de arrastre en ablación láser, así como como gas empleado en la celda colisión/reacción del ICP-MS de tipo cuadrupolo.

### C.2.2.3. Reactivos empleados en los cultivos celulares

- Medio de cultivo DMEM/F12 completo para el cultivo y crecimiento de la línea celular HRPEsv40. Medio Eagle de Dulbecco modificado/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12, Merck) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS, de Gibco™, Thermo Fisher Scientific), y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (ambos de Gibco™).
- Medio de cultivo libre de suero para aplicar los tratamientos celulares. Medio de cultivo sin suero CD hybridoma (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10 mM de Glutamina (Gibco™), y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina.
- Tripsina 0,25% AEDT (Gibco™) para liberar las células adheridas a las placas de sembrado.
- Trypan Blue (0,4% de Gibco™) para la tinción de células vivas para su conteo.
- Fijación celular. Se emplea 16% formaldehído libre de metanol (Fisher Scientific).
- PBS 10 mM, 1x (Tampón fosfato salino, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , todos de Sigma Aldrich), filtrado y estéril para las etapas de lavado de las células.

### C.2.2.4. Reactivos empleados en inmunoensayos, IHC e ICC

- Suero de albúmina bovina, BSA (Sigma Aldrich) para etapas de bloqueo.
- Suero de cabra o burro (Merck Millipore) como bloqueo en IHC e ICC.
- Triton-X100 (Merck), 0,1% en PBS, como surfactante para permeabilizar las membranas celulares para la penetración del Ab en el citoplasma trabajando con las secciones de tejidos, o para los cultivos celulares.
- Tween-20 (Sigma Aldrich) empleado en concentraciones 0,1-0,05% en PBS 10mM como surfactante en las etapas de lavado.

## C.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han analizado tres tipos de muestras biológicas humanas diferentes: suero humano, tejidos oculares de donantes *post mortem*, y células inmortalizadas del epitelio pigmentario de la retina. A continuación, se describen las muestras y cuál es su aplicación en cada caso.

### □ Suero humano

En el Capítulo I se analiza suero humano de personas control (no afectadas con ninguna patología conocida). En concreto, se trata de sueros comerciales estériles y filtrados de plasma humano tipo AB masculino (Sigma-Aldrich). Además, se han analizado también muestras de suero clínico de personas control suministrados por el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo, España), obtenidas con el consentimiento informado de los pacientes. Los procedimientos de extracción se ajustaron a los principios de la Declaración de Helsinki y están aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias – HUCA (España). Todos los sueros sanguíneos fueron guardados a -80°C hasta su posterior uso.

### □ Tejidos oculares

En el Capítulo II se analizan secciones de tejido de ojos humanos que se obtuvieron <24 h *post mortem* a través del National Disease Research Interchange (Filadelfia, EE.UU.) y del Eye Depository del University College of London-Institute of Ophthalmology (Londres, Reino Unido). Los procedimientos se ajustaron en ambos casos a los principios de la Declaración de Helsinki. La preparación de los tejidos oculares empleados en todos los casos fue la siguiente: el órgano es fijado con formaldehído y embebidos en parafina (FFPE) siguiendo los protocolos convencionales<sup>8</sup>. Posteriormente, se producen las secciones de tejido ocular con grosores de 5 o 10  $\mu\text{m}$  de espesor. Para su obtención, los bloques de FFPE son laminados usando un microtomo (ajustando el grosor requerido para el corte) y dichos cortes son colocados sobre portaobjetos de microscopio recubiertos en su superficie de poli-L-lisina para mejorar su adhesión. Las muestras ya preparadas son guardadas a temperatura ambiente hasta ser analizadas.

### □ Células humanas inmortalizadas de epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40)

En los Capítulos III y IV se utilizó una línea de células inmortalizadas de EPR humano (línea celular HRPEsv40) que ya había sido establecida previamente en el Grupo de investigación. Este cultivo había sido obtenido de un cultivo primario de células de EPR provenientes del ojo de un donante *post mortem* de 42 años de edad sin ninguna patología ocular relevante. Posteriormente, las células epiteliales de la retina se inmortalizaron mediante transfección con el virus de tipo salvaje SV40<sup>9</sup>. Las células HRPEsv40 se mantienen congeladas (10 % DMSO) a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En la sección de procedimientos experimentales se detalla el protocolo de descongelación y expansión de la línea celular.

---

<sup>8</sup> A. Sadeghipour, P. Babaheidarian, Making formalin-fixed, paraffin embedded blocks. In: W. Yong (eds) Biobanking. Methods in Molecular Biology 1897, (2019). Humana Press, New York, NY

<sup>9</sup> K.K. Jha, S. Banga, V. Palejwala, H.L. Ozer, SV40-Mediated immortalization. Exp Cell Res. 245, (1998), 1-7.

## C.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A lo largo de la Tesis Doctoral hay varios procedimientos experimentales que son similares en varios Capítulos o que se repiten en varios de ellos. A continuación, se describen los protocolos experimentales más utilizados a lo largo de la Tesis Doctoral, explicando en cada caso en qué Capítulos son aplicados y con qué objetivo.

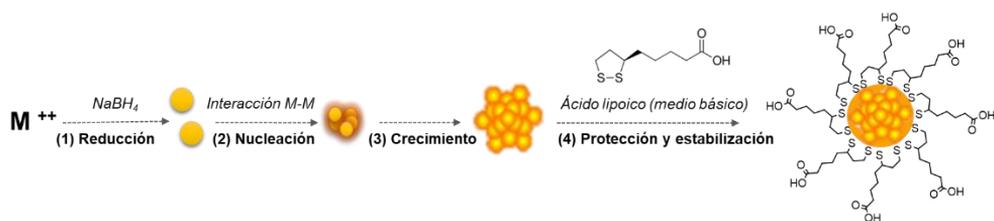
### C.4.1. Síntesis de MNCs solubles en agua mediante una estrategia *bottom-up*.

La determinación de proteínas de interés en la enfermedad de DMAE se ha llevado a cabo mediante el desarrollo de nuevas estrategias de marcaje empleando etiquetas metálicas detectables por MS y fluorescencia, como son los MNCs. Estos han sido sintetizados en el laboratorio y, salvo algunas modificaciones y optimizaciones (las cuales son detalladas en el Capítulo específico), todos ellos han seguido la estrategia de síntesis *bottom-up*. A continuación, se describe el protocolo general seguido para la síntesis de los MNCs empleados en la Tesis Doctoral: AuNCs (Capítulo II, y en los Capítulos III y IV con una modificación del protocolo), AgNCs (Capítulo II), y PtNCs (Capítulo I y II).

La estrategia *bottom-up*, ejemplificada en la **Figura 25**, en la que se basan las síntesis de AuNCs, AgNCs, y PtNCs, se puede resumir de la siguiente manera: el metal en estado de oxidación elevado (Au (III), Ag (I), y Pt (IV)) es reducido mediante el empleo de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), en presencia de un agente estabilizante (en nuestro caso un ligando tiolado, como el ácido lipoico - AL). De esta manera, los átomos del metal reducido se unen por interacciones metal-metal para formar un núcleo metálico el cual, tras su crecimiento, se protege gracias al ligando tiolado (AL) que presenta una fuerte afinidad por la superficie metálica (afinidad S-metal)<sup>10</sup> protegiéndolo frente a la oxidación y deformación.

---

<sup>10</sup> J.R. Reimersa, M.J. Fordb, A. Halderc, J. Ulstrupc, N. S. Hushd, Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)-thiyl species and are destroyed when Au(I)-thiolates form. PNAS (2016), 1424–1433.



**Figura 25:** Esquema general de la síntesis de MNCs siguiendo la estrategia bottom-up. En el ejemplo se emplea el ácido lipoico como ligando tiolado y agente estabilizante.

Las etapas del protocolo experimental para las síntesis de los MNCs se resumen en la **Figura 26**. Sin embargo, como cada una de las síntesis presenta ligeras modificaciones, a continuación, se describirán brevemente por separado. A modo resumen, tanto los reactivos como sus relaciones molares se recogen en la **Tabla 1** para todas ellas.

- **Síntesis de AuNCs (Capítulo II).** Para la síntesis de los AuNCs se siguió el protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.<sup>11</sup>. En un vial ámbar protegido de la luz directa, 30  $\mu\text{mol}$  de AL se disuelven en 20 mL de agua desionizada en la que previamente se añaden 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 2M (el medio básico mejora su disolución, aunque se hace necesario aplicar un baño de ultrasonidos para su completa homogeneización). Posteriormente se añaden a la mezcla 200  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de la sal precursora (50 mM de  $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ). Después de 5 min en agitación magnética, se añaden muy lentamente (gota a gota), y con ayuda de una jeringa, 400  $\mu\text{L}$  de una disolución 50 mM de  $\text{NaBH}_4$  (en isopropanol, para reducir la fuerza del agente reductor). Tras el inicio de la reacción, se deja a temperatura ambiente (21°C) durante 15 horas bajo agitación magnética constante.
- **Síntesis de AuNCs (Capítulos III y IV).** El protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.<sup>11</sup> fue optimizado para reducir la dispersión de tamaños de los AuNCs para su aplicación a la determinación de proteínas en células

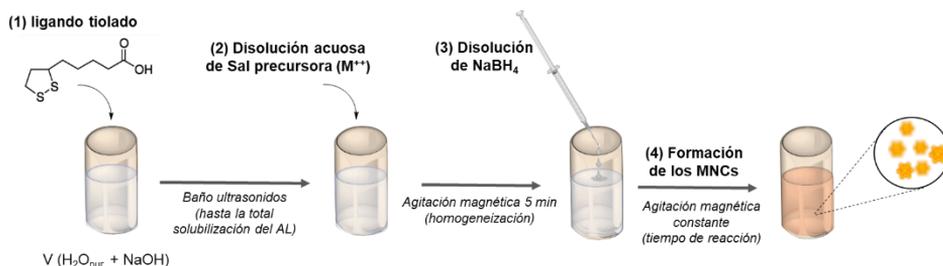
<sup>11</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* 197, (2019), 413–421.

individuales. En este caso, el protocolo de síntesis consta de los siguientes pasos: (1) se realiza la síntesis en un balón de vidrio de 50 mL en lugar de viales cilíndricos para mejorar la homogenización de la mezcla, (2) se reducen la velocidad de agitación de 600-700 a 400 rpm durante la reacción, (3) se reducen las horas de síntesis de 15 h a 6 h, y (4) se añade una etapa posterior de envejecimiento donde la síntesis de AuNCs es calentada durante 2 h a 50 °C con el objetivo de inducir un reajuste de los átomos que forman los diferentes núcleos metálicos y favorecer la formación de AuNCs más estables.

- **Síntesis de AgNCs (Capítulo II).** Este protocolo fue previamente descrito por Valencia et al.<sup>12</sup>. En este caso, 81,06 mg de AL se disuelven en el mismo volumen de agua desionizada (20 mL) basificados con 240 µL de NaOH (2 M). Posteriormente, se añade 1 mL de una disolución acuosa de la sal precursora (25 mM AgNO<sub>3</sub>). Después de 5 min, se añaden 2 mL de una disolución acuosa del reductor (NaBH<sub>4</sub>, 150 mM). La reacción se deja durante 21 h en agitación constante y a baja temperatura (9 °C).
- **Síntesis PtNCs (Capítulo I y II).** 10,5 mg de AL se disuelven en 10 mL de agua desionizada, en la que previamente se han añadido 30 µL de una disolución acuosa de NaOH 2 M. A continuación, se añade la sal precursora (200 µL de H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> 50 mM) a la mezcla y se deja homogeneizar durante 5 min para posteriormente añadir gota a gota 400 µL de NaBH<sub>4</sub> 25 mM. La reacción se inicia y se deja a temperatura ambiente durante 15 h en agitación magnética constante. En el Capítulo I se describen todas las optimizaciones y estudios realizados con la síntesis de PtNCs por ser en este caso la primera vez que se sintetizan.

---

<sup>12</sup> E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro. Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim Acta* 186, (2019), 429.



**Figura 26:** Esquema de las etapas requeridas para la síntesis de AuNCs, AgNCs y PtNCs.

#### C.4.1.1. Protocolo de purificación de los MNCs por ultracentrifugación

Para emplear los MNCs como marcas en inmunosondas, las suspensiones acuosas de MNCs deben ser purificadas a fin de eliminar cualquier exceso de reactivos (p.ej., ligando o agente reductor en exceso). La purificación se llevó a cabo por ultrafiltración empleando unidades de ultracentrifugación denominadas Amicones con un tamaño de poro de membrana de 3 kDa. Esto permite que todo aquello de menor tamaño (sales y reactivos no consumidos) sean eliminados atravesando el filtro (desecho), mientras que los MNCs con tamaños mayores son retenidos en el filtro de las unidades de filtración.

El protocolo de purificación se resume en tres etapas: (1) ciclo a 1600 g 10 min, (2) etapas de lavado donde se añade agua ultrapura a la suspensión y se centrifuga otros 10 min a 1600 g (se repite hasta 3 veces), y (3) se reduce el volumen acuoso de la suspensión hasta una tercera parte en un último ciclo de 10 min a la misma fuerza. Finalmente, la suspensión concentrada de MNCs se reconstituye (volumen inicial previo a la purificación) empleando agua ultrapura o un tampón salino (PBS, SBB, o TRIS-AEDT) adecuado para su estabilidad y posterior aplicabilidad en las muestras biológicas.

#### C.4.1.2. Almacenamiento de los MNCs

Los AuNCs son MNCs muy estables y pueden ser guardados ya purificados (en agua o tampón PBS) a temperatura ambiente. Sin embargo, los PtNCs, tal y como se describe en el Capítulo I, son más estables una vez purificados y conservados en

agua desionizada. Por otro lado, los AgNCs deben ser guardados entre 4-8°C en la nevera, siempre protegidos de la luz y sin purificar; se purifican previo a su uso (son más inestables y fotosensibles)<sup>12</sup>.

Una de las principales características de los MNCs (tal y como se describe en la Introducción de la presente Tesis Doctoral) es su fluorescencia. Cada uno de los MNCs sintetizados presenta un par excitación/emisión ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ ) de fluorescencia característico (recogido en la **Tabla 1**). Por ello, tras una adecuada purificación, la fluorescencia de los MNCs es medida siempre para corroborar una correcta síntesis.

**Tabla 1:** Cantidades y relaciones molares de los reactivos empleados, así como condiciones de síntesis y almacenamiento, para la formación de AuNCs, AgNCs, y PtNCs. Abreviatura: TA: temperatura ambiente.

MNCs	AuNCs	AgNCs	PtNCs
V <sub>final</sub> H <sub>2</sub> O <sub>ult</sub> (mL)	20	20	10
V NaOH 2M (μL)	50	240	30
[M <sup>+</sup> ] síntesis (mM)	0,5	1,25	1,0
Relación molar síntesis (nM <sup>+</sup> :nAL:nNaBH <sub>4</sub> )	1:3:2	1:16:12	1:5:1
Tiempo de reacción y temperatura	15 y TA	21 y 4°C	15 y TA
Condiciones almacenamiento	PBS/ TA	Sin purificar /4°C	H <sub>2</sub> O, /TA
Tampón bioconjugación	PBS	Tris-AEDT (3 mM GSH)	PBS
Par fluorescente característico $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	390/720	430/660	455/620

#### C.4.2. Digestión ácida de los MNCs para su detección por ICP-MS

Los MNCs son nanoestructuras con núcleos metálicos nanométricos generalmente formados por cientos de átomos altamente compactados. Por este motivo, cuando el objetivo es la determinación de su contenido metálico por ICP-MS con nebulización convencional, los MNCs deben ser digeridos empleando un medio

ácido para oxidar el metal, romper el núcleo metálico, y facilitar así la atomización e ionización en el plasma.

El protocolo seguido para la digestión de los MNCs es el siguiente: 50  $\mu\text{L}$  de una disolución que contiene MNCs (disolución concentrada) se disuelve con 200  $\mu\text{L}$  de una disolución oxidante (agua regia o ácido nítrico, según el metal de los MNCs). A continuación, la disolución se lleva a un baño de ultrasonidos durante 20 min. Finalmente, el digerido se disuelve en agua ultrapura o  $\text{HNO}_3$  al 1% hasta alcanzar una concentración del metal adecuada para su medida por ICP-MS (del orden de los  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). En dicha disolución se ajusta el porcentaje de ácido en el medio para que esté entre el 3-5% (v/v). El agua regia ( $\text{HNO}_3\text{:}3\text{HCl}$ ) es necesaria para la oxidación de metales nobles como el AuNCs o PtNCs, mientras que para AgNCs es suficiente con emplear  $\text{HNO}_3$  (evitando así la posible formación de precipitados de  $\text{AgCl}_{(s)}$ ).

Este protocolo de digestión es requerido en varias etapas a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Por una parte, con el objetivo de determinar el contenido metálico en la disolución de síntesis de los MNCs para calcular su rendimiento y conocer la concentración de MNCs en disolución. También, tras la síntesis de las inmunosondas tipo Anti-h-Ab:MNCs para calcular el factor de amplificación de esta. Y así mismo, en todas aquellas aplicaciones en las que los MNCs son empleados como marcas elementales para la detección de proteínas en muestras en disolución por ICP-MS con nebulización convencional.

### **C.4.3. Caracterización de los MNCs**

Llevar a cabo una buena caracterización de los MNCs no solo es requerida para estudiar las características y propiedades de la nanoestructura, sino también para realizar de manera reproducible la reacción de bioconjugación a biomoléculas de reconocimiento y generar las inmunosondas metálicas. La estructura cristalina y tamaño, así como la concentración de metal en la síntesis proporciona información suficiente para conocer la molaridad en los MNCs en suspensión. A continuación, se resumen los procedimientos llevados a cabo para las diferentes caracterizaciones de los MNCs.

### C.4.3.1. Caracterización óptica

La fluorescencia molecular es una propiedad típica de los MNCs y por ello típicamente los MNCs sintetizados son caracterizados en primer lugar por fluorescencia para encontrar su par  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  característico. Al sintetizar nuevos MNCs el par característico es desconocido, y para localizarlo se suele hacer un barrido de longitudes de onda desde 350 a 650 nm, recogiendo el espectro de emisión correspondiente a cada longitud de onda de excitación desde  $\lambda_{ex}+20$  nm hasta 800 nm. Las medidas se realizan en un espectrofluorímetro (Perkin-Elmer) usando una cubeta de cuarzo. En la **Tabla 1** se recogen los pares característicos de los MNCs sintetizados durante la presente Tesis Doctoral. Las medidas de fluorescencia suelen emplearse para confirmar el éxito de la síntesis de un determinado MNCs, puesto que la banda y la intensidad de fluorescencia resultante deben coincidir entre síntesis consecutivas.

Para hacer las medidas de fluorescencia, los MNCs recién sintetizados en un disolvente acuoso pueden ser: a) medidos directamente, b) purificados y llevados a volumen con agua ultrapura, o c) purificados y llevados a volumen en un tampón salino adecuado donde los MNCs son estables (p.ej., PBS, SBB, o Tris-AEDT).

### C.4.3.2. Caracterización morfológica y estructural

Los MNCs purificados (en agua ultrapura) son depositados en rejillas metálicas de Cu hasta su secado. A continuación, se puede estudiar la estructura morfológica y la composición elemental de la muestra empleando HR-TEM y EDX, respectivamente. El tamaño (diámetro) de los núcleos metálicos de los MNCs es estimado con las imágenes obtenidas por HR-TEM (normalmente obtenidas en campo claro, *Bright field*), las cuales son medidas manualmente con el software de tratamiento de imágenes Fiji-ImageJ.

Por otra parte, se puede conocer la estructura cristalina a partir de la medida de la distancia entre planos atómicos (distancia interplanar o *dL-spacing*). Si la resolución de la micrografía lo permite se miden las distancias directamente. Sin embargo,

normalmente se suelen obtener los patrones de difracción electrónica en un área localizada (SAED), es decir haciendo incidir el haz de electrones en la zona de la imagen concreta (MNCs). Dependiendo del patrón de anillos resultante se puede distinguir entre: (a) estructura no cristalina o amorfa (anillos difusos), (b) estructura cristalina (puntos brillantes), o (c) estructura polinancristalina (pequeños puntos que forman varios anillos brillantes de distinto diámetro)<sup>13</sup>. Adicionalmente, a partir del patrón de difracción SAED se puede averiguar qué tipo de celda cristalina unidad forma el MNC midiendo los *dL-spacing* de la estructura. Para ello, se sigue el siguiente procedimiento: (i) medir el diámetro de cada anillo ( $2R$ , nm<sup>-1</sup>) (desde un punto brillante hasta el opuesto pasando por el centro del anillo) utilizando el software Fiji-ImageJ de procesamiento de imágenes, (ii) obtener el valor del radio,  $R$ , (con respecto al punto central);  $R = d/2$  (nm<sup>-1</sup>), (iii) obtener la distancia interplanar (*dL-spacing*), como  $1/R$  (nm), (iv) repetir este protocolo para todos los anillos resultantes del SAED, y (v) comparar los valores *dL-spacing* con aquellos recogidos en bases de datos<sup>14</sup>. Por comparación, se puede determinar la celda unidad que forma la nanoestructura.

Conociendo la celda unidad y el radio promedio de las nanoestructuras se puede estimar el número de átomos promedio que componen un MNC. Por una parte, conociendo el número de átomos de la celda unidad, la densidad, y la masa atómica del metal y el número de Avogadro ( $NA = 6,022 \cdot 10^{23}$  átomos  $\cdot$  mol<sup>-1</sup>) se puede conocer el volumen que ocupa una celda unidad de la nanoestructura ( $V_{celda}$ ). Paralelamente, conociendo el radio promedio de los MNCs, y asumiendo su forma esférica, el volumen de un MNC puede estimarse como  $V_{MNC} = \frac{3}{4} \times \pi r^3$ . Por tanto, se puede averiguar cuántas celdas unidades ocupa un MNC al comparar ambos volú-

---

<sup>13</sup> M. Mendoza-Ramirez, M. Avalos-Borja, Nanoestructuras y su caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión; ciencia y arte. Mundo Nano Revista Interdisciplinaria en Nanociencias Y Nanotecnología, 13, (2020), 61-78.

<sup>14</sup> American Mineralogist Crystal Structure Database. <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>

menes ( $V_{\text{MNC}}/V_{\text{celda}}$ ) y, por ende, se puede determinar cuántos átomos de metal forman la esfera metálica, es decir, el NC. Este cálculo se recoge detalladamente en el Capítulo I, para el caso de los PtNCs (**Sección D.4.5**).

### C.4.3.3. Análisis por ICP-MS: rendimiento de la síntesis & concentración de los MNCs

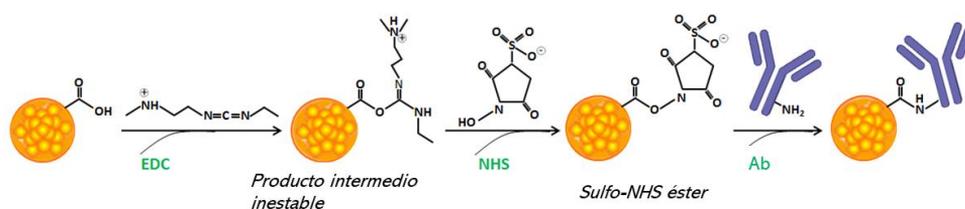
El rendimiento de la síntesis se puede estimar como la relación entre la concentración de metal que queda en la suspensión purificada de MNCs y la concentración de metal añadido en la síntesis (i.e., concentración de metal en la “disolución madre”). En la **Ecuación 1** se muestra cómo se realiza el cálculo para obtener el rendimiento de la reacción de síntesis de un determinado MNCs. Para ello, tras la purificación empleando unidades de ultrafiltración por centrifugación, se recoge la suspensión retenida en la parte superior del filtro del Amicon (que contiene los MNCs purificados) y se mide su contenido metálico por ICP-MS. Las muestras metálicas son digeridas siguiendo el protocolo de digestión recogido en la **Sección C.4.2**, previa a su introducción en el sistema ICP-MS. La concentración de metal es determinada realizando un calibrado externo empleando un estándar del metal (además de un patrón interno adecuado). Para determinar Au y Pt se emplea Ir como patrón interno, mientras que para la Ag se emplea Rh como patrón interno.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\mu\text{moles}_{\text{reales}} \text{Metal síntesis}}{\mu\text{moles}_{\text{reales}} \text{Metal dis. madre}} \times 100 \text{ Ecuación 1}$$

Adicionalmente, conociendo la concentración molar de metal en la síntesis (tras la purificación) y el número de átomos de metal que conforman 1 MNC (**Sección C.4.3.2**), se puede estimar la molaridad de los MNCs en la síntesis. Este dato es necesario en el cálculo de los volúmenes necesarios para realizar el marcaje del anti-cuerpo correspondiente (volúmenes recogidos en la **Tabla 2** de la **Sección C.4.4**).

#### C.4.4. Síntesis de las inmunosondas metálicas: estrategia de bioconjugación mediante el enlace de la carbodiimida

La bioconjugación de los MNCs recubiertos con terminaciones carboxílicas, como es el caso de los sintetizados en esta Tesis Doctoral, con anticuerpos específicos (con varias terminaciones  $\text{-NH}_2$ ) se realiza mediante la estrategia basada en la química de la carbodiimida (EDC) en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS). En dicha reacción se produce la formación de un enlace amida entre el nanomaterial y la biomolécula de reconocimiento<sup>15</sup>, tal y como se describe en la **Figura 27**.



**Figura 27:** Esquema general de la reacción de la carbodiimida para establecer un enlace amida entre el grupo carboxílico de los MNCs y el grupo amino del Ab (esquema modificado de la ref. 15).

Las etapas del protocolo general para llevar a cabo la bioconjugación se resumen de la siguiente manera, teniendo en cuenta que el volumen añadido de la suspensión de MNCs es diferente dependiendo del metal (los volúmenes están recogidos en la **Tabla 2**): en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se mezclan 100  $\mu\text{L}$  del Ab específico (tipo IgG, 150 kDa de masa molecular) en una concentración de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (en PBs 1x) con el volumen estipulado de la síntesis de MNCs (Anti-h-Ab:MNCs en la relación molar óptima para cada bioconjugado, **Tabla 2**). La mezcla se agita vigorosamente con el vórtex y tras 10 min, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de EDC y NHS en PBS 1x en una relación molar de Ab:EDC:NHS de 1:1500:1500. Se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación vigorosa en el vórtex. Finalmente, se procede a su purificación siguiendo el mismo protocolo que para los

<sup>15</sup> C. Nieto, M.A. Vega, E.M. Martín del Valle, Trastuzumab: more than a guide in HER2-positive cancer nanomedicine. *Nanomaterials* 10, (2020), 1674.

MNCs (**Sección C.4.1**). Sin embargo, en el caso de los bioconjugados se recurre a Amicones de tamaño de poro mayor (100 kDa). Una vez purificadas las inmunosondas metálicas, desechando el exceso de MNCs filtrado en el Amicon, estas son almacenadas en la nevera a 4-9°C hasta su posterior uso. Es necesario tener en cuenta que las disoluciones son preparadas en tampón fosfato (PBS 1x) 10mM, pH 7,4, para las bioconjugaciones empleando AuNCs, y PtNCs. Sin embargo, los AgNCs una vez purificados se disuelven en tampón Tris-EDTA con GSH en una concentración de 3 mM (**Tabla 1**). Así mismo, la disolución de EDC:NHS debe hacerse en tampón TRIS-AEDT<sup>12</sup>. Finalmente, una vez terminada la reacción de bioconjugación y purificadas las inmunosondas, estas se llevan a volumen con PBS 1x (AuNCs, PtNCs, y AgNCs).

**Tabla 2:** Resumen de las características de los diferentes MNCs empleados en la Tesis Doctoral. En la tabla se incluye su concentración, tamaño promedio, la relación molar óptima para la bioconjugación a anticuerpos IgG (Anti-h-Ab:MNCs), y los volúmenes de cada síntesis necesarios para la reacción.

MNCs	AuNCs	AgNCs	PtNCs	Aging-AuNCs
<b>Diámetro promedio (nm)</b>	2.2	2.9	1.5	1.9
<b>[MNCs]<sub> sint</sub> (moles MNCs·L<sup>-1</sup>)</b>	1,57·10 <sup>-6</sup>	1,06·10 <sup>-6</sup>	6,75·10 <sup>-6</sup>	1,99·10 <sup>-6</sup>
<b>Relación molar anti-h-Ab:MNCs</b>	<b>1:3</b>	<b>1:3</b>	<b>1:20</b>	<b>1:3</b>
<b>V<sub> síntesis bioconjugación</sub> (μL)</b>	<b>212</b>	<b>188</b>	<b>198</b>	<b>167</b>

### C.4.5. Caracterización de las inmunosondas metálicas: cálculo del factor de amplificación

El factor de amplificación de una inmunosonda (N) se puede definir como el número de átomos de metal (o en su defecto, número de MNCs) enlazado por molécula de Ab disponible (**Ecuación 2**).

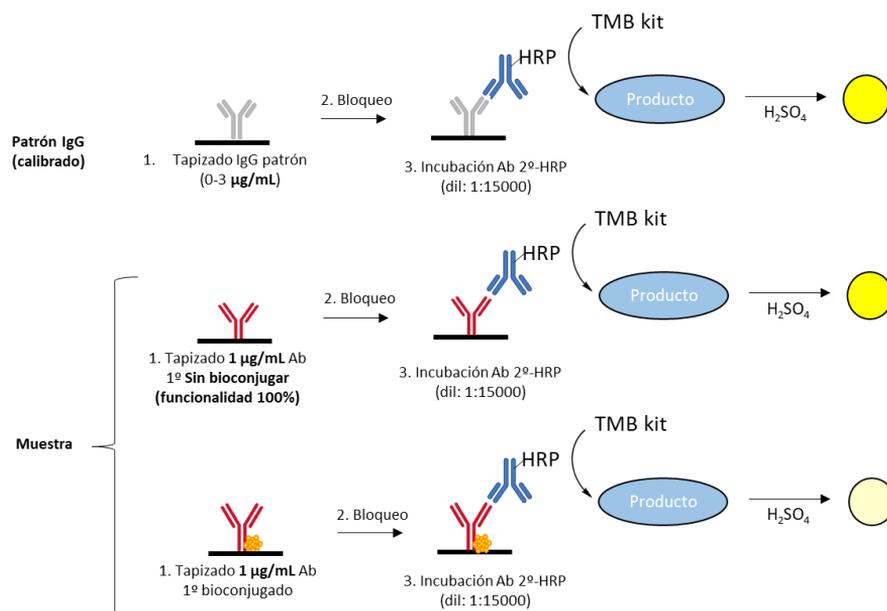
$$N = \frac{\text{(a) moles de átomos de metal}}{\text{(b) moles de moléculas de Ab disponible}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para estimar el número de átomos de metal (a), se debe conocer la concentración metálica en la inmunosonda. Para ello, tras la purificación de la sonda marcada,

este es digerido (ver protocolo de digestión ácida en la **Sección C.4.2**) y se determina la concentración del metal por ICP-MS mediante una calibración externa con patrón interno, de manera similar a como se realiza para la caracterización de los MNCs.

Paralelamente, se debe cuantificar la concentración de Ab que tras su bioconjugación con los MNCs y purificación sigue disponible para reaccionar con el antígeno de interés (b). Para ello, se diseña un inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo, donde la inmunosonda metálica es el analito a cuantificar. Se realiza un calibrado externo empleando un Ab IgG genérico. Este Ab ha de ser puro, de concentración conocida, y producido en el mismo animal (mismo *Host*) que el Ab específico de la inmunosonda. De esta manera se determina la concentración de Ab que hay en la inmunosonda, incubando con un Ab secundario que se enlaza al antisuero primario (inmunosonda o IgG patrón). El diseño del inmunoensayo está resumido en la **Figura 28** y a continuación se describen las etapas:

- (1) Tapizado de la placa: **(1a)** con el IgG genérico (patrón de calibración entre  $0\text{-}3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) o **(1b)** con el analito en una concentración de  $\sim 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (inmunosonda o Ab sin bioconjugar) durante 6 h a  $37^\circ\text{C}$  (estufa).
- (2) Bloqueo con BSA 1%, 2 h a temperatura ambiente.
- (3) Incubación del Ab secundario marcado con enzima HRP, 2 h a temperatura ambiente.
- (4) Lavado: se decanta la disolución sobrante y se lava con PBS1x (3 veces).
- (5) Reacción enzimática: adición  $100\ \mu\text{L}$  del sustrato TMB y esperar 10-15 min hasta que la disolución se vuelva azul por la deposición del producto coloreado.
- (6) Parada de la reacción enzimática: adición de  $50\ \mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M. La disolución torna de azul a amarillo.
- (7) Lectura de la absorbancia del producto resultante (amarillo) a 450 nm en el lector de placas.



**Figura 28:** Esquema donde se resumen las diferentes etapas del inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo diseñado para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas metálicas (Anti-h-Ab:MNCs).

#### C.4.6. Protocolo de desparafinación de los tejidos FFPE

Los cortes de tejido ocular empleados como muestras en el Capítulo II de la Tesis Doctoral, tal y como se ha descrito en la **Sección C.3**, están fijados en formalina y embebidos en parafina. De cara a llevar a cabo la ICH (para detección ICP-MS o fluorescente), las secciones de tejidos deben ser previamente desparafinadas a fin de permitir la penetración del Ab y que la reacción inmunológica tenga lugar. Este proceso de desparafinación empleando xilol, necesita de una rehidratación posterior del tejido. Las etapas del protocolo y sus tiempos se resumen en la **Tabla 3**. Los portaobjetos donde las secciones de tejido están adheridas se introducen cuidadosamente en disoluciones de xilol (x2 veces) y, a continuación, se hidratan en una cadena de alcoholes decreciente desde alcohol absoluto hasta agua (**Tabla 3**). Una vez finalizado el proceso, el tejido estaría listo para realizar el protocolo de IHC con la inmunosonda metálica (Anti-h-Ab:MNCs).

**Tabla 3:** Protocolo de desparafinación e hidratación empleada para secciones de tejido ocular de bloques FFPE.

Disolvente	Desparafinación		Rehidratación				
	Xilol (1)	Xilol (2)	EtOH <sub>Abs</sub>	EtOH <sub>95%</sub>	EtOH <sub>80%</sub>	EtOH <sub>70%</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>des</sub>
Tiempo (min)	10	5	10	3	3	3	3

### C.4.7. Protocolos de cultivo y tratamiento de la línea celular HRPEsv40

#### C.4.7.1. Descongelación y expansión de la línea celular

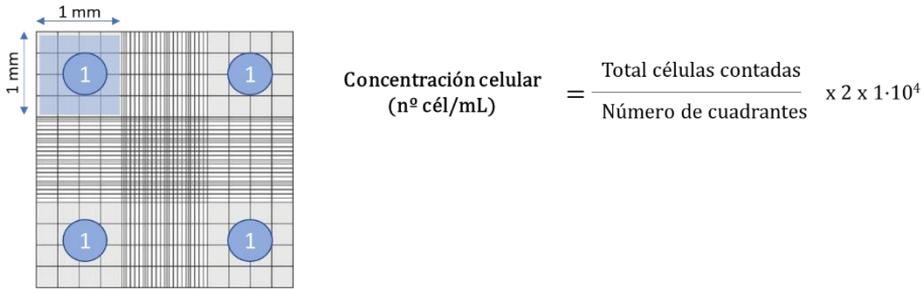
El criovial (almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) donde están las células de la línea celular inmortalizada HRPEsv40 se descongela rápidamente dejándolo en el incubador o en el baño a  $37^{\circ}\text{C}$ . Ya bajo condiciones estériles en campana de cultivos del flujo laminar, se recoge el contenido celular del criovial y se lleva a un Eppendorf de 15 mL, donde se lava el *pellet* celular para eliminar el porcentaje de DMSO (añadido para la congelación) adicionando 9 mL de medio completo suplementado con un 10% de FBSi y un 1% de P/S (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S). Se centrifuga a 100 g durante 5 min y, tras aspirar el medio, el *pellet* celular es resuspendido de nuevo en 5 mL de medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S). La suspensión celular está así lista para su siembra en los *flask* de cultivo (T25 o T75).

La línea celular se cultiva a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  en el incubador, hasta que las células alcanzan una confluencia suficiente (80-90% de la superficie del *flask* ocupada por células). Para expandir la línea celular, es decir obtener un número mayor de células, cuando las células están confluentes en un *flask* se debe retirar el medio (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S) y tras un lavado con PBS 1x, se tripsinizan añadiendo 1 mL de 0,25% Tripsina-AEDT, se incuba a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2-3 min hasta visualizar que las células se han despegado de la superficie (se observan las células con el microscopio de transmisión). A continuación, se añaden 4 mL de medio completo para bloquear la tripsina y evitar la lisis celular. La suspensión celular es sembrada en varios *flask* (T75 o T125) añadiendo 15 mL de medio completo nuevo y 3 mL de la suspensión de células recién recolectadas. Este protocolo se repite hasta alcanzar el número de

células deseado para llevar a cabo el experimento. Es necesario tener en cuenta que cada vez que se tripsinizan las células y se siembran en un nuevo *flask*, esto se considera un pase de la línea celular. Para la línea HRPEsv40 se ha observado que las células pueden durar en torno a 25-30 pases (a partir de ese momento las células dejan de proliferar).

### C.4.7.2. Conteo celular manual con el hemocitómetro

Conocer el número de células en una determinada suspensión es necesario entre otras cosas para sembrar el número adecuado de células en cada *flask* el número puede variar (dependiendo del ensayo programado). Por ello, una vez tripsinizadas las células y recogidas en un tubo falcon (12 mL o 50 mL) con medio completo, las células son lavadas con PBS 1x para eliminar células muertas (centrifugación a  $100g \times 3 \text{ min}$  y posterior extracción del sobrenadante) y el pellet se resuspende en PBS 1x (homogeneizándolo cuidadosamente). El conteo se realiza empleando un hemocitómetro (cámara Neubauer) donde se depositan 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla previamente preparada de 1:1 (v/v) de la suspensión celular (homogeneizada) con tinte Trypan-blue. Bajo el microscopio de transmisión se cuentan manualmente las células visualizadas dentro de los límites de los 8 cuadrantes del hemocitómetro (4 parte superior y 4 parte inferior) tal y como se muestra en la **Figura 29**. En dicha Figura, el número 1 marca cada uno de los 4 cuadrantes (superior o inferior). Teniendo en cuenta que el área de cada cuadrante de la cámara Neubauer empleada es de  $1 \text{ mm}^2$  y el espesor del cuadrante de  $0,1 \text{ mm}$ , el volumen resultante de cada cuadrante es de  $0,1 \text{ mm}^3 = 1 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . Por tanto, tal y como se describe en el cálculo de la **Figura 29**, el valor promedio de número de células por cuadrante debe ser multiplicado por 2 (dilución 1:1 del Trypan blue) y multiplicado por  $1 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$ . De este modo, el valor resultante es la concentración de células por mL de disolución en la suspensión.



**Figura 29:** Esquema de los cuadrantes de la cámara Neubauer y explicación del cálculo de la concentración celular.

### C.4.7.3. Tratamiento inflamatorio de las células HRPEsv40

Aunque el número de células requerido, su estado (en suspensión o fijadas en placa), o incluso los soportes en los cuales se siembran son diferentes dependiendo del ensayo a realizar, el procedimiento de cultivo, así como el tratamiento inflamatorio empleado, ha sido el mismo para los estudios llevados a cabo con las células HRPEsv40 (sc-ICP-MS y LA-ICP-MS).

Las células inmortalizadas HRPEsv40 se cultivan a 37°C en incubadora con un 5% de CO<sub>2</sub> utilizando el medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S). Una vez que las células alcanzan el 80% de confluencia, se lavan con PBS 1x y se cambia el medio a un medio libre de suero, Hibridoma™ suplementado con 5% de L-glutamina y 1% de P/S, y se dejan en el incubador durante 24 h para que las células se adapten al nuevo medio. Transcurrido ese tiempo, las células cultivadas son tratadas con una citoquina proinflamatoria, la Interleuquina-1α (IL1α), con una concentración de 100 ng·mL<sup>-1</sup> durante 48 h<sup>16</sup>. Paralelamente, siempre se realiza un control celular, es decir, otro *flask* o pocillo donde las células no son tratadas con la citoquina, es decir, se mantienen en el medio libre de suero Hibridoma™ (5% de L-glutamina y 1% +P/S). Los tratamientos y tiempos específicos a los que se sometió la línea celular hasta encontrar el adecuado, se encuentran descritos en el Capítulo III.

<sup>16</sup> L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, M. Garcia, S. Ghosh, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, The stoichiometric transition from n6Cu1-Metallothionein to Zn7-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells, J. Biol. Chem. 287 (2012) 28456e28469.

### C.4.8. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR por sus siglas en inglés, *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) es muy empleada en medicina molecular, biotecnología, microbiología y diagnóstico, y se ha convertido en el método de referencia para la cuantificación de ARN mensajero (ARNm)<sup>17</sup>. Es notable su uso en el estudio de los niveles de expresión de genes codificantes de proteínas de interés<sup>18</sup> (secuencias nucleotídicas específicas) o para la detección sensible de microRNA (biomarcador de enfermedades)<sup>19,20</sup>.

En esta técnica, el ARNm es transcrito en ADN complementario mediante la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, se lleva a cabo la amplificación de millones de veces del gen (diana) mediante cebadores (*primers*) complementarios a esa secuencia, para finalmente ser identificados con elevada sensibilidad y especificidad por medio de sondas fluorescentes (p.ej. TaqMan®)<sup>21</sup>. Esta técnica es de gran ayuda para conocer las diferencias de expresión de un gen bajo diferentes condiciones. Sin embargo, la precisión de la RT-qPCR se ve muy afectada por la estabilidad de los genes de referencia (conocidos como genes *housekeeping*) que se emplean para la normalización (cuantificación relativa). Estos se pueden ver alterados por el entorno y las condiciones de estudio. Esta limitación hace que sea crítica una buena elección del gen de referencia para poder dar valores fiables e interpretar los patrones de expresión génica<sup>22</sup>.

---

<sup>17</sup> T. Nolan, R.E. Hands, S.A. Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 1, (2006), 1559-1582.

<sup>18</sup> M. Sato, T. Abe, M. Tamai. Analysis of the Metallothionein Gene in Age-Related Macular Degeneration. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 44, (2000) 115-121.

<sup>19</sup> M. Szemraj, A. Bielecka-Kowalska, K. Oszejca, M. Krajewska, R. Goś, P. Jurowski, M. Kowalski, J. Szemraj. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD. *Med Sci Monit.* 21, (2015) 2734-2742.

<sup>20</sup> Thorsen M, Blondal T, Mouritzen P. Quantitative RT-PCR for MicroRNAs in Biofluids. *Methods Mol Biol.* 1641, (2017), 379-398.

<sup>21</sup> Tama de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2 (2013) 70-78.

<sup>22</sup> M. Gao, Y. Liu, X. Ma, Q. Shuai, J. Gai, Y. Li. Evaluation of Reference Genes for Normalization of Gene Expression Using Quantitative RT-PCR under Aluminum, Cadmium, and Heat Stresses in Soybean. *PLoS One.* 12, (2017) 0168965.

---

# D. CAPÍTULO I

Síntesis, optimización, y evaluación de  
los PtNCs como nuevo marcador  
multimodal en inmunoensayos

---



## D.1. INTRODUCCIÓN

En la Introducción general de esta Tesis Doctoral se han presentado los MNCs como un tipo de NPs con interesantes propiedades ópticas. Los MNCs presentan fluorescencia debido a su pequeño tamaño ( $<3$  nm), una baja o nula toxicidad, y una elevada biocompatibilidad. Estas características han hecho que los MNCs se usen actualmente como una alternativa muy atractiva a las marcas fluorescentes tradicionales (i.e., los fluoróforos convencionales como los tintes orgánicos o proteínas fluorescentes), o incluso frente a otras nanoestructuras como los QDs<sup>1</sup>. En la **Sección A.3.2.6** se recogen las aplicaciones más remarcables de estas interesantes nanoestructuras, como por ejemplo sus aplicaciones como sensores químicos para la detección selectiva de metales<sup>2</sup> o su empleo como marcas para la detección de biomoléculas diana en muestras biológicas<sup>3</sup>. Además, cabe resaltar su empleo en estudios de *imaging* para la localización fluorescente de biomoléculas en tejidos y células<sup>4</sup>, incluso en aplicaciones *in vivo*<sup>5</sup>.

Paralelamente, tal y como se describe en la **Sección A.3.2.2**, los MNCs, presentan un gran potencial como etiquetas para generar inmunosondas metálicas y su aplicación a la detección específica de biomoléculas mediante detección elemental empleando la técnica ICP-MS tras la realización de un inmunoensayo.

Al ser nanoestructuras compuestas por un solo metal, ofrecen una elevada amplificación de la señal debido a los cientos de átomos que componen su núcleo nanométrico. En este sentido, la elevada relación entre el número de átomos detectables por volumen de la marca constituye además una gran ventaja no sólo frente a

---

<sup>1</sup> X.R. Song, N. Goswami, H.H. Yang, J. Xie, Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications. *Analyst* 141, (2016), 3126–3140.

<sup>2</sup> M. Cui, C. Wang, D. Yang, Q. Song, Fluorescent iridium nanoclusters for selective determination of chromium (VI). *Microchim Acta* 185, (2017), 8.

<sup>3</sup> H. Wu, Y. Xu, R. Xie, M. Tang, L. Chen, F. Qu, C. Guo, F. Chai, The controllable synthesis of orange-red emissive Au nanoclusters and their use as a portable colorimetric fluorometric probe for dopamine. *New J Chem.* (2022), Advance Article.

<sup>4</sup> A.K. Sharma, S. Pandey, N. Sharma, H.F. Wu, Synthesis of fluorescent molybdenum nanoclusters at ambient temperature and their application in biological imaging. *Mater Sci Eng C* 99, (2019), 1-11.

<sup>5</sup> E. Porret, X. Le Guevel, J.-L. Coll, Gold nanoclusters for biomedical applications: toward *in vivo* studies. *J Mater Chem B* 8, (2020), 2216.

otras nanoestructuras metálicas empleadas como etiquetas metálicas (p.ej., QDs de CdSe<sup>6</sup> o las MNPs de mayor volumen), sino también frente a las estructuras quelantes de Ln (DOTA y DPTA) o los complejos poliméricos compuestos por varias estructuras quelantes DPTA (MAXPAR®), las cuales contienen una importante parte no metálica. En este contexto, los MNCs a diferencia de estas estructuras poliméricas presentan menor riesgo de impedimento estérico haciendo posible una bioconjugación a las biomoléculas de reconocimiento (p.ej., Ab específico) sin bloquear u obstaculizar los sitios de unión a la molécula diana<sup>7</sup>. En definitiva, las estrategias basadas en el uso de inmunosondas con MNCs como marcas ofrecen la posibilidad de una detección multimodal presentando ciertas ventajas frente a las marcas comúnmente empleadas. Sin embargo, tal y cómo se muestra en este Capítulo I, cada una de las detecciones (i.e. fluorescencia y MS) tienen ventajas y limitaciones, y por ello es conveniente comparar las características analíticas de las diferentes estrategias de detección.

Haciendo referencia a trabajos previos en este campo, Bustos et al.<sup>6</sup> han comparado la detección mediante luminiscente y la medida de Cd por ICP-MS empleando CdSe/ZnS (QDs) como etiqueta para la determinación de progesterona en leche de vaca. De esta manera, encontraron una mejor sensibilidad con la detección por ICP-MS, IC(10)=0,028 ng·mL<sup>-1</sup>, frente a 0,11 ng·mL<sup>-1</sup> utilizando la detección luminiscente. Otros ejemplos incluyen el uso de etiquetas híbridas que contienen un quelato DTPA (coordinado con <sup>165</sup>Ho o <sup>111</sup>In) y un colorante fluorescente Cy5<sup>8</sup>, o combinando un colorante fluorescente (Cy3) con NPs de conversión ascendente<sup>9</sup>. Estas

---

<sup>6</sup> A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella Alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Elemental and molecular detection for quantum dots-based immunoassays: a critical appraisal. *Biosens Bioelectron.* 33, (2012), 165–171.

<sup>7</sup> M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro. Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Anal Bioanal Chem.* 411, (2019), 549-558.

<sup>8</sup> T. Buckle, S. van der Wal, S.J.M van Malderen, L. Müller, J. Kuil, V. van Unen, R.J.B. Peters, M.E.M. van Bommel, L.A. McDonnell, A.H. Velders, F. Koning, F. Vanhaeke, F.W.B. van Leeuwen. Hybrid imaging labels: providing the link between mass spectrometry-based molecular pathology and theranostics. *Theranostics* 7, (2017), 624–633.

<sup>9</sup> B. Yang, Y. Zhang, B. Chen, M. He, X. Yin, H. Wang, X. Li, B. Hu, A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells. *Biosens Bioelectron.* 96, (2017), 77–83.

sondas están compuestas por un solo átomo de metal o por átomos de diferentes heteroátomos (p.ej., CdSe), lo que reduce en este último caso la capacidad de amplificación por detección con ICP-MS. Sin embargo, en el caso de los MNCs la detección elemental permite mejorar la sensibilidad de la metodología puesto que ofrece una elevada amplificación de la detección de la biomolécula diana: el elevado número de átomos metálicos por NCs junto con las características intrínsecas del ICP-MS, como la elevada sensibilidad ( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{-ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y los bajos efectos de matriz (ideal para aplicaciones biológicas)<sup>10</sup>, hacen de esta combinación una herramienta muy potente para la detección de biomoléculas.

En cuanto a los metales empleados para la síntesis de MNCs, el Au ha sido el metal más utilizado debido a su baja toxicidad y biocompatibilidad, y por ello existe un elevado número de publicaciones científicas que avalan el uso de los AuNCs como etiquetas fluorescentes y elementales<sup>11</sup>. Además de los AuNCs, también la Ag<sup>12</sup> o el Cu<sup>13</sup> han sido elementos estudiados para la síntesis de MNCs. Sin embargo, estos NCs presentan algunas limitaciones como una menor estabilidad y fotosensibilidad (AgNCs), o la imposibilidad del empleo de los CuNCs como marcas elementales en muestras biológicas puesto que el Cu es un elemento constituyente de las mismas. Así pues, en los últimos años se ha investigado en el desarrollo de nuevas nanoestructuras basadas en otros metales nobles, como el Ir<sup>2,14</sup>, el Pd<sup>15</sup>, o el Mo<sup>16</sup>. Siguiendo

---

<sup>10</sup> 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.

<sup>11</sup> I.M. Khan, S. Niazi, L. Yue, Y. Zhang, I. Pasha, M.K.I. Khan, W. Akhtar, A. Mohsin, M.F.J. Chughati, Z. Wang, Research update of emergent gold nanoclusters: A reinforced approach towards evolution, synthesis mechanism and application. *Talanta* 241, (2022), 123228.

<sup>12</sup> E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro. Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim Acta* 186, (2019) 429.

<sup>13</sup> S. Zhang, J. Li, S. Huang, X. Ma, C. Zhang, Novel blue-emitting probes of polyethyleneimine-capped copper nanoclusters for fluorescence detection of quercetin. *Chem Pap.* 75, (2021), 3761.

<sup>14</sup> P. Menero-Valdés, A. Lores-Padín, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Iridium nanoclusters as high sensitive-tunable elemental labels for immunoassays: Determination of IgE and APOE in aqueous humor by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta*, 244, (2022), 123424.

<sup>15</sup> S.K. Eswaramoorthy, A. Dass, Atomically precise palladium nanoclusters with 21 and 38 Pd atoms protected by phenylethanethiol. *J Phys Chem C* 126, (2022), 444–450.

<sup>16</sup> A.K. Sharma, S. Pandey, N. Sharma, H.F. Wu, Synthesis of fluorescent molybdenum nanoclusters at ambient temperature and their application in biological imaging, *Mater Sci Eng C* 99, (2019), 1-11.

esta línea, en el Capítulo I de la Tesis Doctoral se propone desarrollar una síntesis de PtNCs. Este metal aparte de ser un metal noble presenta la posibilidad de detección múltiple por ICP-MS gracias a poseer varios isótopos estables (isótopos y abundancia natural:  $^{192}\text{Pt}$ -0,78%,  $^{194}\text{Pt}$ -32,9%,  $^{195}\text{Pt}$ -33,8%,  $^{196}\text{Pt}$ -25,3%, y  $^{198}\text{Pt}$ -7,21%). Este hecho permitiría que, una vez desarrollado un protocolo óptimo de síntesis de PtNCs, se pueda emplear Pt enriquecido isotópicamente para obtener hasta 5 marcas diferentes. Siguiendo una estrategia similar a la llevada a cabo por Valencia et al.<sup>17</sup> donde se sintetizaron AgNCs con plata natural y AgNCs enriquecidos en el isótopo  $^{109}\text{Ag}$  empleando el mismo protocolo de síntesis, se podrían sintetizar hasta 5 tipos de PtNCs para llevar a cabo el *imaging* de varias proteínas simultáneamente con ICP-MS.

Hasta la fecha se han publicado varios trabajos centrados en la síntesis de PtNCs<sup>18</sup>, con mayor hincapié en el uso de plantillas como agentes estabilizantes como es el caso de proteínas<sup>19</sup>, ADN<sup>20</sup>, polímeros<sup>21,22</sup>, y dendrímeros<sup>23</sup>. Sin embargo, el empleo de estas grandes estructuras/plantillas presenta algunas limitaciones debido especialmente a la dificultad para llevar a cabo la eliminación del exceso de este reactivo tras la síntesis, es decir, el aislamiento y purificación de los PtNCs. Además, a la vista de los problemas estructurales y estéricos que pueden presentar, se le suma la posible fluorescencia del ligando que enmascara la fluorescencia debida a la estructura

---

<sup>17</sup> E. Valencia, B. Fernández, M. Cruz-Alonso, M. García, H. González-Iglesias, M.T. Fernández-Abedul, R. Pereiro, Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters. *J Anal At Spectrom.* 35, (2020), 1868-1879.

<sup>18</sup> X. Huang, Z. Li, Z. Yu, X. Deng, Y. Xin, Recent advances in the synthesis, properties, and biological applications of platinum nanoclusters, *J. Nanomater.* 19, (2019), 6248725.

<sup>19</sup> N. Xu, H.W. Li, Y. Yue, Y. Wu, Synthesis of bovine serum albumin protected high fluorescence Pt16-nanoclusters and their application to detect sulfide ions in solutions. *Nanotechnology* 27, (2016), 425602.

<sup>20</sup> G. Wang, Z. Li, X. Luo, R. Yue, Y. Shen, N. Ma, DNA-templated nanoparticle complexes for photothermal imaging and labeling of cancer cells. *Nanoscale* 35, (2018), 16508-16520.

<sup>21</sup> X. Huang, H. Ishitobi, Y. Inouye, Formation of fluorescent platinum nanoclusters using hyperbranched polyethylenimine and their conjugation to antibodies for bio-imaging. *RSC Adv.* 6, (2016), 9709-9716.

<sup>22</sup> N. Xu, L. Hong-Wei, W. Yuqing, Hydrothermal synthesis of polyethylenimine-protected high luminescent Pt-nanoclusters and their application to the detection of nitroimidazoles. *Anal Chim Acta.* 958, (2017), 51-58.

<sup>23</sup> S. Tanaka, J. Miyazaki, D.K. Tiwari, T. Jin, Y. Inouye, Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angew Chem Int Ed.* 50, (2011), 431-435.

nanométrica. Otros de los problemas que plantean la síntesis de los PtNCs empleando plantillas son las bajas longitudes de onda de emisión de fluorescencia (normalmente emiten en el rango del azul o verde, 450-550 nm), que coincide con el rango en el que emiten muchas estructuras biológicas. Por todo ello (solapamientos espectrales y fondos elevados que dificultan una detección específica), su uso en aplicaciones ópticas puede verse limitado.

Como alternativa, la síntesis de PtNCs utilizando pequeños ligandos tiolados como agentes estabilizantes permite superar las limitaciones anteriormente citadas: es posible aislar los NCs mediante métodos de purificación rápidos y/o sencillos (ultracentrifugación o diálisis) al mismo tiempo que se evitan los fondos fluorescentes debido a los ligandos<sup>24</sup>. De esta manera, y siguiendo un trabajo previamente desarrollado por García-Fernández et al.<sup>25</sup>, en el Capítulo I se propone investigar un nuevo protocolo de síntesis de PtNCs empleando ligandos tiolados, estables, homogéneos, y altamente fluorescentes para su aplicación como marcas bimodales (detección por fluorescencia e ICP-MS), así como evaluar su uso como posibles marcas para la determinación de una biomolécula diana en fluidos biológicos.

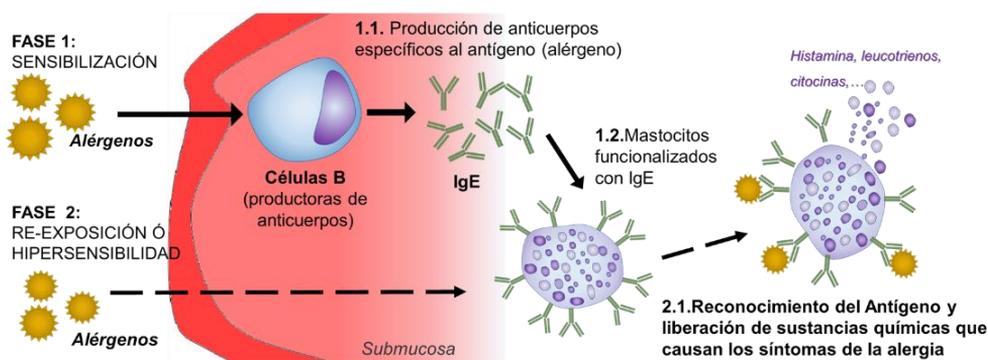
Como prueba de concepto, los PtNCs son bioconjugados mediante la estrategia de la carbodiimida a anticuerpos Anti-h IgE para la cuantificación en muestras de suero humano del biomarcador de la enfermedad alérgica, la Inmunoglobulina E (IgE). La enfermedad alérgica es una enfermedad que afecta a más del 40% de la población mundial y se define como reacciones patológicas del sistema inmune ante sustancias inocuas a las que el ser humano se expone normalmente. La mayor parte de las reacciones alérgicas son reacciones de hipersensibilidad tipo I mediadas por la IgE (**Figura 30**). En condiciones normales la IgE presenta una concentración basal en suero baja (0,1-1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Sin embargo, en un individuo alérgico al entrar en contacto con el alérgeno, la producción de IgE en sangre se ve incrementada tal y

---

<sup>24</sup> D. Chen, S. Gao, W. Ge, Q. Li, H. Jiang, X. Wang, One-step rapid synthesis of fluorescent platinum nanoclusters for cellular imaging and photothermal treatment. *RSC Adv.* 4, (2014), 40141–40145.

<sup>25</sup> J. García-Fernández, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Aqueous synthesis of near-infrared highly fluorescent platinum nanoclusters. *Nanotechnology* 26, (2015), 215601.

como se muestra en mecanismo biológico de hipersensibilidad tipo I descrito en la **Figura 30**. Por tanto, la baja concentración de IgE en suero humano la hace interesante para evaluar las prestaciones de los PtNCs como marcas bimodales.



**Figura 30:** Esquema del mecanismo de hipersensibilidad tipo I por el que se desencadena una reacción alérgica mediada por la IgE, siendo este el biomarcador. Cuando un individuo está en presencia del alérgeno se produce un aumento en la producción (concentración) de IgE.

De manera general, para diagnosticar la sensibilización alérgica en suero actualmente se emplean pruebas ImmunoCAP (comercializadas por Thermo Fisher), las cuales presentan diferentes protocolos y antígenos detectados. Paralelamente, otro kit comercial frecuentemente comercializado, y que ha sido empleado como método de validación a los resultados mostrados en este Capítulo I, es un inmunoensayo ELISA espectrofotométrico (comercializado por Abnova) y con un límite de detección del antígeno IgE de  $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado también novedosas estrategias alternativas basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación de IgE en suero. Algunos de los ejemplos más relevantes se recogen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4:** Resumen de estrategias basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación serológica de IgE. En la Tabla se muestra el método y los materiales empleados, así como el límite de detección (LOD) alcanzado para cada uno de ellos.

Método empleado	Materiales	LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )	Ref.
Inmunoensayo tipo sándwich heterogéneo con separación basada en magnetoforesis y detección fluorescente	NPs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> superparamagnéticas (Ab detección) y microesferas luminiscentes (Ab captura)	0,1	26
Inmunoensayo tipo sándwich heterogéneo con separación por electroforesis capilar de inmutafinidad con detección fluorescente	Microesferas magnéticas (Ab captura) y Ab detección marcado con fluoróforo Alexa®488	2,4	27
Inmunoensayo tipo sándwich donde el Ab de detección se sustituye por un aptámero para detección mediante aptasensor quimioluminiscente	Microesferas magnéticas (Ab captura) y microesferas de poliestireno que enlazan los aptámeros	0,87	28
Ensayo de inmutafinidad empleando aptámeros con separación electroforética y detección por fluorescencia	Chip microflúidico de poli(dimetilsiloxano)	7	29
Microarrays de flujo lateral con detección colorimétrica	Ab bioconjugado a AuNPs y enzima HRP	2,4	30
Aptasensor con detección por electroquimioluminiscencia	Nanoestructuras de CdS y AuNPs (para amplificación)	0,02	31
Inmunoensayo tipo sándwich donde el Ab de detección se sustituye por un aptámero modificado con AgNPs y se detecta visualmente	Aptámero modificado con AgNPs	20	32
Inmunoensayo competitivo basado en micropartículas y absorción UV/Vis	Complejos de partículas de poliestireno superparamagnéticas	24	33
Inmunoensayo competitivo con detección fluorescente	AuNCs bioconjugados a Ab específico	0,20	34

- <sup>26</sup> Y.K. Hahn, Z. Jin, J.H. Kang, E. Oh, M.K. Han, H.S. Kim, J.T. Jang, J.H. Lee, J. Cheon, S.H. Kim, H.S. Park, J.K. Park, Magnetophoretic immunoassay of allergen specific IgE in an enhanced magnetic field gradient. *Anal Chem.* 79, (2007), 2214–2220.
- <sup>27</sup> Q. Peng, Z. Cao, C. Lau, M. Kai, J. Lu, Aptamer-barcode based on immunoassay for the instantaneous derivatization chemiluminescence detection of IgE coupled to magnetic beads. *Analyst* 136, (2011) 140–147.
- <sup>28</sup> H.X. Chen, J.M. Busnel, G. Peltre, X.X. Zhang, H.H. Girault, Magnetic beads based immunoaffinity capillary electrophoresis of total serum IgE with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem.* 80, (2008), 9583–9588.
- <sup>29</sup> L.F. Cheow, J. Han, Continuous signal enhancement for sensitive aptamer affinity probe electrophoresis assay using electrokinetic concentration. *Anal Chem.* 83, (2011), 7086–7093.
- <sup>30</sup> T. Chinnasamy, L.I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelius, H. Andersson, A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst* 139, (2014), 2348–2354.
- <sup>31</sup> J. Cao, H. Wang, Y. Liu, Petal-like CdS nanospheres-based on electrochemiluminescence aptasensor for detection of IgE with gold nanoparticles amplification. *Spectrochim Acta A*, 151, (2015), 274–279.
- <sup>32</sup> Z. Li, Q. Niu, H. Li, M. Vuki, D. Xu, Visual microarray detection for human IgE based on silver nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem.* 239, (2017), 45–51.
- <sup>33</sup> T. Yescas-González, A. Leonard, V. Gaude, A. Delplanque, A. Barre, P. Rougé, L. Garnier, F. Bienvenu, J. Bienvenu, M. Zelsmann, E. Picard, D. Peyrad, IgE detection in allergic patient's serum by absorption analysis of biofunctionalised microparticles. *Microelectron Eng.* 207, (2019), 27–32.
- <sup>34</sup> M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Mede, Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens Bioelectron.* 77, (2016), 1055–1061.

## D.2. OBJETIVOS

En este capítulo se desarrolla un protocolo de síntesis de PtNCs para obtener nanoestructuras estables, fluorescentes y monodispersas para su bioconjugación a anticuerpos específicos y su evaluación como marcas (fluorescentes y elementales) para la cuantificación de una proteína diana en muestras de suero empleando inmunoensayos ELISA en placa. Este objetivo general puede dividirse en los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de la síntesis de nanoclústeres de platino, partiendo de estudios previos de nuestro Grupo de investigación, en cuanto a su fluorescencia y dispersión de tamaños.
2. Caracterización óptica, morfológica y elemental de los PtNCs para estudiar su tamaño, estabilidad, concentración en disolución y fluorescencia, así como para conocer el número de átomos de la etiqueta metálica.
3. Estudio de la bioconjugación de los PtNCs a anticuerpos específicos, evaluando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs con las que se consigan una elevada amplificación sin perjudicar la funcionalidad de la molécula de reconocimiento.
4. Caracterización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs para conocer el factor de amplificación conseguido.
5. Evaluación de los PtNCs como marcas bimodales en inmunosondas para la determinación de una proteína presente en baja concentración en suero, en particular un biomarcador de la enfermedad alérgica (IgE) llevando a cabo un inmunoensayo competitivo tipo ELISA directo en placa con detección por fluorescencia e ICP-MS.
6. Validación con un kit comercial ELISA de los resultados obtenidos con la metodología empleando los PtNCs como marcas elementales para la cuantificación de IgE en suero humano.

### D.3. EXPERIMENTAL

#### D.3.1. Materiales y reactivos

- Síntesis de PtNCs. El material y reactivos empleados durante la optimización de la síntesis, así como para su bioconjugación a un Ab tipo IgG, están recogidos en el apartado correspondiente de la **Sección C.2.2.1** del Experimental General.
- Síntesis de la inmunosonda e inmunoensayos ELISA. El Ab específico empleado en este Capítulo I, tanto para el estudio de la bioconjugación de los PtNCs a un Ab tipo IgG, como para generar la inmunosonda específica para llevar a cabo el inmunoensayo competitivo ha sido el Ab policlonal Anti-human IgE (Anti-h-IgE) producido en cabra (Ref: I6284, Sigma Aldrich). La proteína específica empleada como estándar analítico en el inmunoensayo competitivo fue la proteína nativa humana IgE (Azide free, Ref: ab65866 de Abcam). Adicionalmente, para el revelado del inmunoensayo no competitivo se utiliza un Ab secundario Anti-goat-IgG marcado con HRP (Ref: A6154, Sigma Aldrich) y el sustrato específico de la enzima 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, de Sigma Aldrich). Tanto los inmunoensayos de optimización de la inmunosonda como el inmunoensayo competitivo para determinar la biomolécula diana (biomarcador IgE) con detección elemental (ICP-MS), se llevaron a cabo en placas ELISA de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Sin embargo, el inmunoensayo competitivo para detección fluorescente se realizó en los portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences) con aislantes de silicona adhesivos a presión con los que se fabrican los “pocillos” en el portaobjetos (Grace bio-labs). El resto de los reactivos necesarios para llevar a cabo los inmunoensayos están recogidos en la **Sección C.2** del Experimental General.

---

### D.3.2. Instrumentación

Tal y como se comenta en la **Sección C.1.2** de la Instrumentación General, para la caracterización de los MNCs se recurre a diferentes equipos, atendiendo a la propiedad que se pretende evaluar en los mismos.

- Propiedades ópticas. La fluorescencia de los PtNCs en disolución se midió con el espectrofluorímetro LS-50-B (Perkin-Elmer). También se empleó el espectrofotómetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies) para medir la absorción de los precursores de síntesis y de las suspensiones de PtNCs. En ambos casos se usó una cubeta de cuarzo Suprasil modelo 101-Qs de Hellma® (Sigma-Aldrich).
- Caracterización morfológica y estructural. Se empleó el equipo de HR-TEM (JEOL JEM-2100) con un sistema de EDX.
- Potencial Z. La medición del potencial Z de las suspensiones de PtNCs a diferentes valores de pH se llevó a cabo con un Zetasizer Nano ZS (Malvern analytical Ltd.).

Para la detección de los PtNCs una vez utilizados como etiquetas en el inmunoensayo ELISA competitivo se usaron:

- Microscopio de láser confocal (TCS-SP8X; Leica) con el objetivo de inmersión en aceite de 63x. Se utilizó para llevar a cabo la detección fluorescente de los PtNCs en el inmunoensayo competitivo.
- La detección elemental se realizó con el ICP-MS 7500 (Agilent Technologies). Este instrumento fue usado para determinar la concentración de Pt, tanto en la caracterización de la síntesis de PtNCs y el bioconjugado, como para cuantificar la IgE en el inmunoensayo competitivo midiendo la señal de Pt en cada pocillo de la placa ELISA.

Adicionalmente se empleó un lector de microplacas de absorbancia (ELx800; Bio-Tek) para las lecturas de absorbancia tras los inmunoensayos ELISA con detección colorimétrica. Otro equipamiento al que se recurrió en distintas partes del expe-

rimental de este Capítulo I ha sido: baño de ultrasonidos (J.P. Selecta) para la digestión ácida; placa de agitación magnética (Fisher Scientific) durante la síntesis de los PtNCs y sus optimizaciones; agitador vórtex (Labbox Labware) durante la bioconjugación; ultracentrífuga (Gyrozen and Co.) para la purificación de las síntesis de PtNCs y las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs; y estufa de laboratorio (Memmert) para las etapas de incubación en los inmunoensayos.

El procesamiento de los datos de fluorescencia se llevó a cabo con el software Image J (National Institute of Health) y la representación de las curvas de inmunoensayo con la herramienta de análisis de datos on-line MyAssays Ltd.

### D.3.3. Procedimientos experimentales

Algunos de los protocolos experimentales han sido ya detallados en el **Experimental General**, como son el protocolo de síntesis de los PtNCs mediante estrategia *bottom-up* con ligando tiolado y un reductor fuerte (C.4.1), la estrategia de digestión ácida para la medida de los PtNCs por ICP-MS (C.4.2), las etapas para llevar a cabo una buena caracterización de los PtNCs (C.4.3), el protocolo de la reacción de la carbodiimida para la síntesis de las inmunosondas (C.4.4), y el protocolo de caracterización de la inmunosonda (C.4.5). Sin embargo, al ser la primera vez que los PtNCs sintetizados se usan como etiquetas de anticuerpos, se ha realizado un estudio detallado de su bioconjugación, por lo que en el siguiente apartado se describen las etapas experimentales detalladas de este estudio para la síntesis y la optimización de los PtNCs. Por otro lado, se detallan también los inmunoensayos ELISA competitivos desarrollados para la detección del biomarcador IgE en las muestras de suero humano de personas control.

#### D.3.3.1. Síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

Con el objetivo de encontrar la relación molar adecuada de Ab:PtNCs con la que generar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, una vez caracterizada la síntesis de PtNCs (en términos de concentración de PtNCs en la suspensión, tal y como se describe en la **Sección C.4.3.3** del Experimental General), se calculan los volúmenes de

disolución de síntesis PtNCs necesarios para llevar a cabo la bioconjugación utilizando las relaciones molares recogidas en la **Tabla 5**. Es necesario tener en cuenta que, tal y como se indica en el protocolo de bioconjugación, se parte de 0,1 mL de Ab (tipo IgG, 150 kDa) con una concentración de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $6,7\cdot 10^{-11}$  moles de Ab Anti-h-IgE).

**Tabla 5:** Tabla resumen donde se indica el volumen de síntesis de PtNCs empleado para llevar a cabo las diferentes bioconjugaciones con diferentes relaciones molares Ab:PtNCs

Relación Molar Teórica nAb:nPtNCs	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10	1:15	1:20	1:30	1:50
Moles PtNCs ( $10^{-11}$ )	6,7	20	33	47	67	100	130	200	330
Volumen suspensión de PtNCs necesaria ( $\mu\text{L}$ )	10	30	50	70	98	148	198	296	494

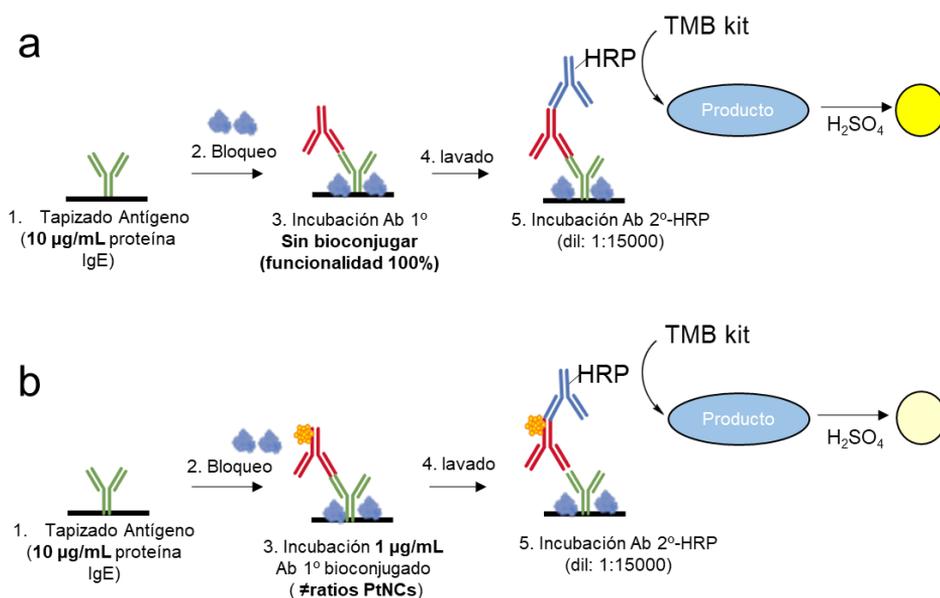
### D.3.3.2. Optimización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

La relación molar entre los PtNCs y el Ab específico ha sido optimizada mediante un inmunoensayo ELISA espectrofotométrico indirecto, no competitivo, empleando un Ab secundario antisuero de cabra (animal en el que se produce el Ab primario Anti-h-IgE) marcado con la enzima HRP (*horseradish peroxidase*). El protocolo seguido para realizar el inmunoensayo se ejemplifica en la **Figura 31**. Por un lado (a), se realiza el inmunoensayo empleando el Ab sin bioconjugado con los PtNCs para conocer cuál es la funcionalidad total del Ab. Por otro lado (b), se realiza el mismo inmunoensayo pero siendo bioconjugado (Anti-h-IgE:PtNCs) con diferentes relaciones molares Ab:PtNCs. Las etapas llevadas a cabo se pueden resumir de la siguiente manera:

- (1) Tapizado de los pocillos de la placa ELISA: se incuban durante 6 h a  $37^\circ\text{C}$  (en estufa)  $100 \mu\text{L}$  por pocillo de patrón de proteína nativa IgE ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).
- (2) Etapa de bloqueo: se retira por decantación la disolución remanente y se adicionan  $200 \mu\text{L}$  por pocillo de la disolución de bloqueo (10 mM PBS, pH 7,4, con un 1% de BSA). La etapa de bloqueo se deja durante 2 h a temperatura ambiente.

- (3) Incubación del Ab 1°: se decanta el volumen remanente de los pocillos y se incuban durante 2 h a 37 °C, 100 µL por pocillo del Ab Anti-h-IgE (1 µg·mL<sup>-1</sup>). Es en esta etapa es donde se puede añadir el Ab no marcado o el Ab marcado con los PtNCs en las diferentes relaciones molares.
- (4) Etapa de lavado: se lava (3 veces) con 200 µL de una disolución de PBS-Tween 20 al 0,05%.
- (5) Incubación del Ab 2°: 2 h a 37 °C 100 µL por pocillo de Anti-goat IgG-HRP (diluida 1:20000 en PBS con BSA 1% y Tween 20, 0,05%).

Tras un lavado para eliminar exceso de Ab2°-HRP, se añade el sustrato de la enzima (100 µL por pocillo de sustrato TMB) que provoca que la disolución empiece a tornarse azul (i.e., se inicia la reacción enzimática). Tras 10-15 min, se debe parar la reacción anzimática adicionando 50 µL por pocillo de ácido sulfúrico (2 M). La disolución cambia de color de azul a amarillo; y finalmente se detecta la absorbancia del producto colorimétrico resultante en un lector de placas ( $\lambda_{abs} = 450 \text{ nm}$ ).

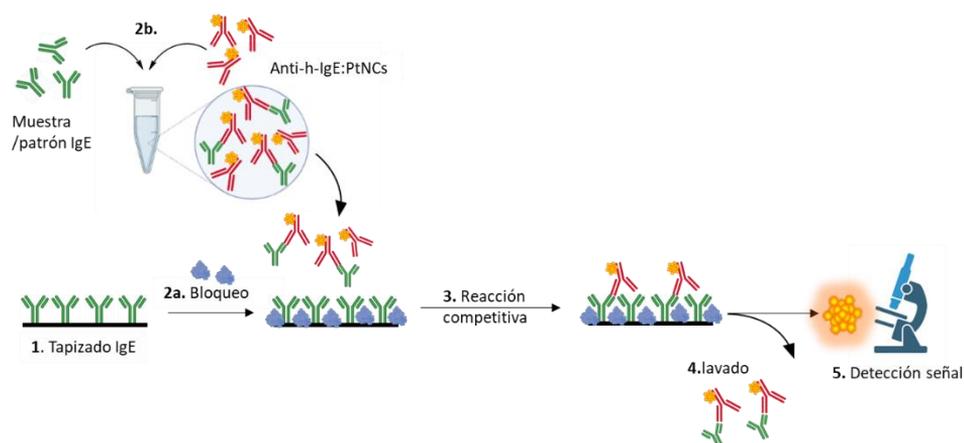


**Figura 31:** Estudio para optimizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs. Esquema de las etapas del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto para evaluar la pérdida de funcionalidad del Ab específico al ser bioconjugado con diferentes relaciones molares de PtNCs.

### D.3.3.3. Inmunoensayo ELISA competitivo

Tras la elección de la relación molar adecuada para la síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, se evalúa su uso en la determinación de una proteína diana (antígeno), en este caso la IgE. Para ello se aplica la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs a un inmunoensayo competitivo con detección fluorescente (microscopía confocal) y por ICP-MS. A continuación, se describen las etapas del inmunoensayo competitivo llevado a cabo para realizar una detección por fluorescencia, ejemplificado en la **Figura 32:**

- (1) Tapizado: se incuban durante 2 h a 37 °C, 100  $\mu\text{L}$  de patrón de proteína IgE ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en los pocillos de un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina. En este caso, las disoluciones de proteína contienen EDC en proporción molar 1500:1 EDC:IgE para mejorar su inmovilización en la superficie del soporte.
- (2) **a)** Bloqueo: se retira la disolución sobrante y se bloquean los sitios libres añadiendo 200  $\mu\text{L}$  por pocillo de BSA al 1% en PBS 10 mM (pH 7,4); incubándolo durante 2 h a temperatura ambiente.
- (2) **b)** Simultáneamente a la etapa (2a), se lleva a cabo la incubación durante 20 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, 100  $\mu\text{L}$  de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (expresada como concentración de Ab) con 100  $\mu\text{L}$  de las concentraciones ( $0\text{-}3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de patrón de proteína IgE (o las muestras de suero humano) en un tubo Eppendorf.
- (3) Reacción competitiva: tras retirar el líquido sobrante del bloqueo (2a), se añaden las disoluciones de la incubación (2b) en los pocillos y se dejan reaccionar durante 2 h a 37 °C (en estufa).
- (4) Lavado: se decanta la disolución sobrante (3) y se procede a tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%.
- (5) Se mide directamente la fluorescencia emitida por los PtNCs por microscopía confocal.

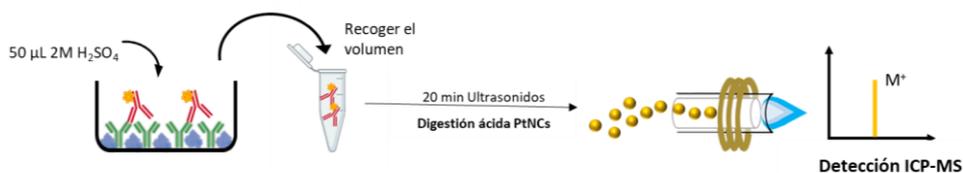


**Figura 32:** Esquema de las etapas del inmunoensayo competitivo empleando la inmunsonda Anti-h-IgE:PtNCs para la detección directa de la IgE por microscopía de fluorescencia láser confocal.

Cuando la detección de la proteína se lleva a cabo por ICP-MS, se deben realizar ligeras modificaciones en el protocolo del inmunoensayo competitivo descrito para la detección fluorescente. Por una parte, el soporte empleado es una placa ELISA de 96 pocillos en vez de los portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Por otra parte, es necesaria una etapa adicional en la que se recoge el contenido de cada pocillo, para lo cual se lleva a cabo una digestión ácida de los PtNCs. A continuación, se detalla esta etapa adicional necesaria para detectar la inmunsonda por ICP-MS.

Tal y como se resume en la **Figura 33**, tras el lavado final (etapa **(4)** de la **Figura 32**), se añade al pocillo un volumen de ácido sulfúrico (50  $\mu$ L, 2 M) con el objetivo de romper los enlaces/adhesiones a la placa. Después de 10 min, se recoge el contenido de cada uno de los pocillos en tubos Eppendorf individuales (contienen aquellas inmunosondas metálicas que reconocieron la proteína patrón que tapizaba la placa). A continuación, se lleva a cabo la digestión ácida (**Sección C.4.2**) donde se añaden 200  $\mu$ L de agua regia a cada una de las muestras (recolectadas en tubos Eppendorf) con el objetivo de disolver la nanoestructura metálica y favorecer su atomización en el ICP-MS (20 min en baño de ultrasonidos). Finalmente, se diluyen 1:200 con agua desionizada para minimizar el porcentaje de ácido introducido en el ICP-MS (<3% v/v). Las medidas de ICP-MS para determinar la concentración de Pt en

cada una de las disoluciones se realizaron mediante calibración externa con estándares de Pt (concentraciones de 0-20 ng·mL<sup>-1</sup>) utilizando Ir como patrón interno (concentración 5 ng·mL<sup>-1</sup>). En el ICP-MS se monitorizaron los isótopos <sup>194</sup>Pt<sup>+</sup> y <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> del platino y los <sup>193</sup>Ir<sup>+</sup> y <sup>191</sup>Ir<sup>+</sup> de iridio.



**Figura 33:** Esquema donde se recoge cómo es la última etapa del protocolo experimental para el inmunoensayo con detección por MS elemental. En la imagen se muestra cómo es la recogida y digestión de la muestra para su análisis por ICP-MS con nebulización convencional.

#### D.3.3.4. Determinación de IgE en muestras de suero humano

Como prueba de concepto, la metodología analítica desarrollada en este Capítulo I se evaluó empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs en inmunoensayos en placa para la determinación de IgE en un suero humano comercial y tres muestras de suero humano clínico (#Suero 1, #Suero 2 y #Suero 3). El procedimiento llevado a cabo ha sido el mismo que para el inmunoensayo utilizando los estándares de proteína nativa humana IgE descrito en el apartado anterior con detección por ICP-MS (Sección D.3.3.3). En cuanto a las muestras, los sueros no requieren de ningún pretratamiento previo más que ser diluidos para que la concentración de analito se ajuste al rango lineal de la recta de calibración. En el caso del suero comercial y el #suero 1, se aplica una dilución 1:1000 con PBS (pH 7,4), mientras que para los sueros #2 y #3 fue suficiente una dilución 1:500.

Los resultados obtenidos con la metodología desarrollada en este Capítulo I empleando los PtNCs como etiqueta se validaron utilizando un kit comercial ELISA basado en la detección espectrofotométrica (medidas de absorbancia) del producto colorimétrico formado tras la reacción enzimática de HRP al añadir el sustrato TMB.

### D.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de esta sección se describen los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo I de la Tesis Doctoral, así como una discusión de los mismos. En primer lugar, se explican las optimizaciones llevadas a cabo para lograr un protocolo adecuado de síntesis de PtNCs empleando ácido lipoico (AL) como ligando estabilizante. A continuación, se describe la caracterización de los PtNCs sintetizados estudiando su bioconjugación a un Ab específico con el objetivo de generar una inmunosonda bimodal (Anti-h-IgE:PtNCs) que pueda ser detectada tanto por fluorescencia como por ICP-MS. Finalmente, se evalúa la aplicación de dicha inmunosonda para la determinación de un biomarcador específico, la IgE (biomarcador de la enfermedad alérgica), para lo cual se ha desarrollado un inmunoensayo ELISA competitivo en placa con detección directa y dual (fluorescente y por MS elemental) de los PtNCs.

#### D.4.1. Síntesis y caracterización de PtNCs fluorescentes

Como se ha mencionado en la Introducción de este Capítulo I, para la síntesis de PtNCs se parte de un protocolo descrito previamente por García-Fernández et al.<sup>25</sup>. En dicha síntesis, se emplean relaciones molares elevadas metal:reductor (1:25) lo que provoca reacciones de reducción rápidas. Una cinética rápida implica la formación de MNCs con mayor heterogeneidad de tamaños y por ello menor calidad y baja fluorescencia. Con el objetivo final de emplear los PtNCs como etiqueta en aplicaciones biológicas se ha de mejorar su emisión fluorescente, disminuir la dispersión de tamaño de los NCs, a la vez que se debe profundizar en los estudios de estabilidad. Por ello se llevaron a cabo varias optimizaciones de la síntesis con el fin de conseguir PtNCs de elevada calidad, para lo cual se evaluó la concentración de reductor, el tiempo de síntesis, y el efecto del pH. Adicionalmente, se ensayaron síntesis alternativas empleando estructuras poliméricas (p.ej., polietilimina, PEI), pero debido a los elevados fondos de fluorescencia provenientes del polímero (la cual enmascara la fluorescencia de la nanoestructura) se excluye el empleo de estas estructuras para la síntesis de los PtNCs.

### D.4.2. Caracterización espectroscópica de los PtNCs

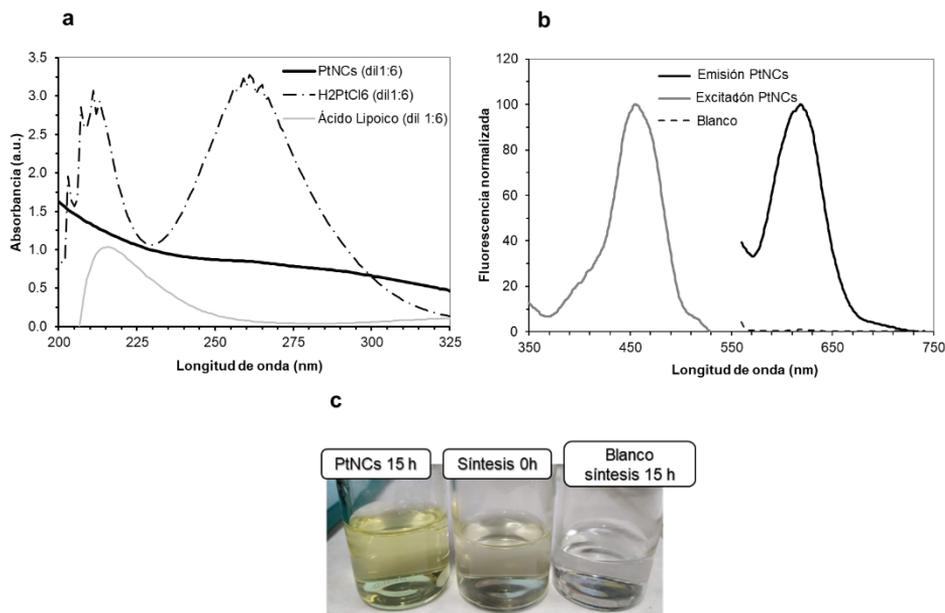
Para estudiar cómo influyen diferentes parámetros (p.ej., tiempo de reacción o pH de medio) en la síntesis de los PtNCs, se midió la fluorescencia de la síntesis para las diferentes condiciones ensayadas. La fluorescencia además de ser la propiedad característica de los MNCs, y por tanto la que puede proporcionar información relevante acerca de la reacción, es una herramienta rápida, accesible, y económica. Sin embargo, al cambiar el protocolo de síntesis con respecto al descrito previamente por García-Fernández et al.<sup>25</sup>, el par de fluorescencia característico de la nanoestructura sintetizada se puede ver afectado PtNCs  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 430$  ó  $470/680$  nm. Por ello, el primer estudio realizado fue la caracterización espectroscópica de los PtNCs.

Tal y como se describe en la **Sección C.4.1** (Experimental General) donde se encuentra recogido el protocolo *bottom-up* para sintetizar los PtNCs, tras las 15 h en agitación magnética constante a temperatura ambiente las nanoestructuras son caracterizadas ópticamente. Paralelamente, la misma suspensión es estudiada por espectrofotometría (medidas de absorbancia) y fluorescencia.

Por una parte, la formación de los PtNCs se confirma mediante espectrofotometría de absorción molecular. En la **Figura 34a** se recogen los espectros de absorbancia correspondientes a cada uno de los reactivos utilizados para la síntesis de los NCs, así como el espectro de la suspensión purificada de PtNCs ( $t = 15$  h y agua como disolvente). Se puede observar cómo los picos de absorbancia correspondientes a los reactivos disueltos en agua (212 nm o 260 nm para la sal precursora y 215 nm para el AL) desaparecen cuando se forman los PtNCs (línea negra en el espectro). En todos los casos los espectros se han adquirido al medir diluciones de los reactivos con un factor de dilución 1:6. Además, tal y como se observa en el espectro de absorbancia correspondiente a la suspensión purificada, en la disolución de PtNCs no se observa la banda de absorbancia característica, conocida como banda de resonancia plasmónica superficial (SPR). Este fenómeno físico es típico de las NPs de mayor tamaño donde la luz incidente provoca la polarización de los electrones deslocalizados de las capas más externas.

Por otro lado, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia con la suspensión purificada de PtNCs. Como se recoge en la **Figura 34b**, se observó que los PtNCs presentan un par  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  de fluorescencia característico. Con el objetivo de determinar la banda de emisión fluorescente característica de los PtNCs, se llevó a cabo un barrido espectral excitando en el rango de longitudes de onda comprendido entre 350 y 650 nm (excitando cada 20 nm) y midiendo la emisión fluorescente en el rango desde 380 a 800 nm. En la **Figura 34b**, se muestran los espectros de excitación y emisión máximos de los PtNCs sintetizados en disolución acuosa ( $\lambda_{\text{exc}} = 455$  nm y  $\lambda_{\text{em}} = 620$  nm). En ambos casos se representan las intensidades normalizadas, dando el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima observada a 620 nm. Cabe destacar cómo, a diferencia de las nanoestructuras estabilizadas con plantillas poliméricas (p.ej., PEI), la síntesis de PtNCs empleando AL presenta un blanco de fluorescencia prácticamente indetectable (en la figura se muestra también el espectro de emisión del blanco de síntesis,  $\lambda_{\text{exc}} = 455$  nm). Se debe tener en cuenta que el blanco de la síntesis fue preparado siguiendo exactamente los mismos pasos que la síntesis de PtNCs, con la excepción de que no se añadió la sal de platino. A simple vista (**Figura 34c**) se puede observar que las disoluciones presentan colores diferentes: desde el comienzo de la síntesis ( $t = 0$  h) hasta las 15 h, la suspensión pasa de un color anaranjado pálido a un amarillo transparente pálido, mientras que el blanco de síntesis (15 h, sin adición de la sal precursora de Pt) es incoloro.

De este modo, la ausencia de SPR sumada a la aparición de una banda de fluorescencia ( $\lambda_{\text{em}} = 620$  nm) son datos complementarios que confirman la presencia de nanoestructuras de tamaño cercano a la longitud de onda de Fermi, es decir, que permiten confirmar la formación de PtNCs.



**Figura 34:** Caracterización espectroscópica de la síntesis de PtNCs. a) Espectros de absorbancia de los reactivos utilizados para la síntesis de los PtNCs, así como de la suspensión de PtNCs sintetizada (línea negra continua: PtNCs, línea negra punteada: H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, y línea gris continua: ácido lipoico). Todos los reactivos han sido diluidos 1:6 en agua desionizada para llevar a cabo las medidas, b) Espectros de fluorescencia molecular característicos obtenidos para los PtNCs, y c) Fotografía de las disoluciones de síntesis tras 15 h de reacción, al inicio de la síntesis (0 h), y blanco de síntesis.

#### D.4.3. Optimización de la síntesis de PtNCs

Tal y como se ha mencionado, se han evaluado diferentes parámetros para la síntesis de PtNCs partiendo del protocolo publicado por García-Fernández et al.<sup>25</sup>. Para ello se ha disminuido la relación molar de metal:reductor (Pt:NaBH<sub>4</sub>), el tiempo de síntesis y el pH. La relación molar entre la sal precursora y el ligando no se ha estudiado puesto que relaciones molares superiores a 1:5 (Pt:AL) imposibilitan la reducción completa de AL a DHLA, mientras que relaciones más bajas pueden llegar a provocar una luminiscencia débil (incluso nula), debido en gran medida a que la

superficie de la nanoestructura no está totalmente pasivada por los ligandos y, por tanto, estos presentan baja estabilidad en disolución<sup>35</sup>.

**Disminución de la concentración de agente reductor.** El  $\text{NaBH}_4$  es un reductor fuerte y, por ello, su empleo como agente reductor puede dar lugar a reacciones con cinéticas rápidas, dificultando el control de la formación de las nanoestructuras. Teniendo en cuenta que se buscan síntesis de MNCs homogéneos (i.e., con baja dispersión de sus tamaños), son muchos los trabajos publicados que se focalizan en mejorar el control sobre la cinética de la reacción de reducción para favorecer el control de la formación de las nanoestructuras metálicas, generando MNCs de mayor calidad<sup>36</sup>. Típicamente, se suelen emplear concentraciones bajas de reductor (aunque puede no ser suficiente para reducir el metal precursor) o disminuir la eficacia de la reducción disminuyendo el pH de la disolución o empleando disolventes orgánicos (en lugar de acuosos)<sup>37</sup>.

En la presente Tesis Doctoral, se planteó la disminución de la concentración de  $\text{NaBH}_4$ . Para ello, se empleó una relación molar menor 1:5:1 (Pt:LA: $\text{NaBH}_4$ ) que la anteriormente publicada, es decir de 1:5:25<sup>25</sup> (Pt:LA: $\text{NaBH}_4$ ). Este cambio ha provocado el desplazamiento de la banda de fluorescencia característica de 680 nm a 620 nm, tal y como se observa en la **Figura 34b**. Además, se ha comprobado que la concentración empleada de  $\text{NaBH}_4$  (400  $\mu\text{L}$ , 25 mM) es suficiente para reducir tanto el puente disulfuro del AL (desaparición de la banda de absorbancia a 260 nm) como para reducir la sal de metal precursor: desaparecen las bandas típicas de estos compuestos en el espectro de absorbancia (**Figura 34a**). Se ensayaron adicionalmente diferentes relaciones molares para Pt: $\text{NaBH}_4$ , entre 1:1 y 1:25<sup>25</sup>, pero la ausencia de

---

<sup>35</sup> M. van der Linden, A. Barendregt, A.J. van Bunningen, P.T.K. Chin, D. Thies-Weesie, F.M.F. de Groot, A. Meijerink, Characterisation, degradation and regeneration of luminescent Ag29 clusters in solution. *Nanoscale*, 8, (2016), 19901-19909.

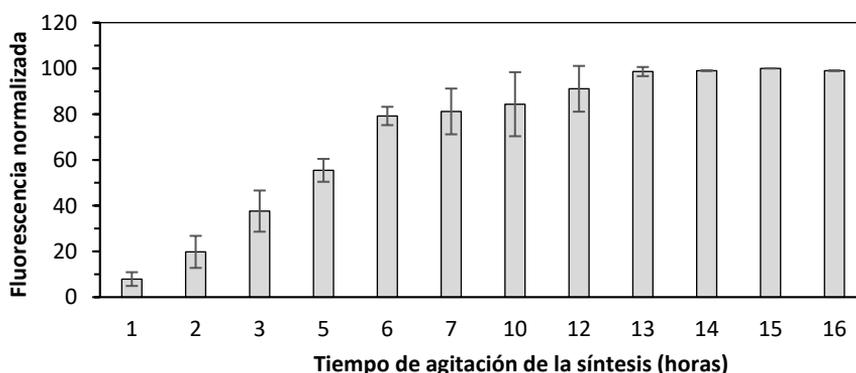
<sup>36</sup> K. Zheng, X. Yuan, N. Goswami, Q. Zhang, J. Xie, Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters. *RSC Adv.* 4, (2014) 60581–60596.

<sup>37</sup> Zhu, M., Qian, H., & Jin, R. Thiolate-Protected Au<sub>24</sub>(SC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Ph)<sub>20</sub> Nanoclusters: Superatoms or Not? *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6, (2010) 1003–1007.

bandas claras de fluorescencia en el rango de longitudes de onda del VIS (400-800 nm) hicieron que se descartaran el resto de las relaciones molares ensayadas.

Una vez encontrada una elevada emisión fluorescente para los PtNCs a 620 nm (**Figura 34b**) con la relación molar 1:1 (Pt:NaBH<sub>4</sub>), se evaluaron otras variables experimentales, como son: el tiempo de reacción, y el efecto del pH (expresado como volumen adicionado de NaOH 2 M).

**Tiempo de reacción.** La elección del tiempo de agitación necesario para conseguir una síntesis de PtNCs adecuada se lleva a cabo recogiendo a cada hora una alícuota de la síntesis (la cual se purifica) y midiendo la señal de emisión fluorescente. En la **Figura 35** se recogen las intensidades de fluorescencia normalizadas obtenidas para cada alícuota de la síntesis de PtNCs recogidas entre la primera hora de reacción y 16 h. Se puede observar que las señales máximas se comienzan a alcanzar tras 13 h de síntesis en agitación constante (trabajando a temperatura ambiente). De cara a la elección del tiempo adecuado, se decide establecer 15 h como el tiempo al cual la señal es estable.



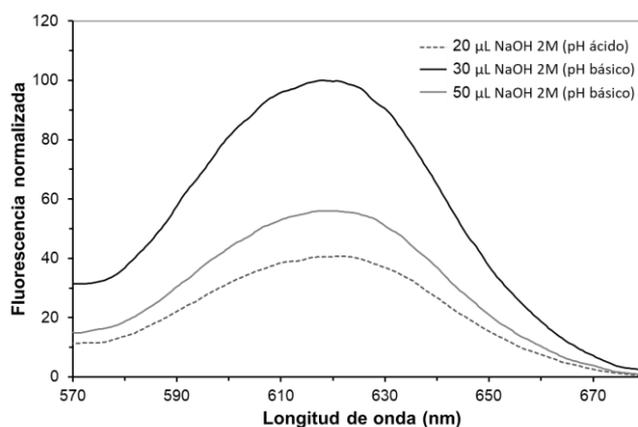
**Figura 35:** Efecto del tiempo de síntesis en la señal de fluorescencia de los PtNCs para una relación molar Pt:AL:NaBH<sub>4</sub> de 1:5:1 (intensidades normalizadas; dando el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima obtenida para 13 h). Las incertidumbres representan la desviación estándar de la media de tres medidas de tres síntesis diferentes de PtNCs.

En comparación con la síntesis de PtNCs previamente propuesta por García-Fernández et al.<sup>25</sup>, el periodo de tiempo óptimo encontrado para las condiciones de síntesis ensayadas es más largo (15 h *versus* 6 h). Esto puede justificarse por el efecto

de la menor concentración de  $\text{NaBH}_4$  en la síntesis que provoca la disminución de la cinética de la reacción de reducción. Una menor concentración de agente reductor hace que la reacción de reducción sea más lenta y por ello se necesite un mayor tiempo de agitación para una síntesis óptima de los PtNCs.

### **Efecto del pH: estudio del volumen de NaOH añadido en la síntesis.**

La adición de NaOH (2 M) a los 10 mL de agua desionizada inicial facilita la disolución de ligando (el AL tiene baja solubilidad en agua), además de disminuir la cinética de la reacción de reducción a pH básico. Por este motivo y con el objetivo de lograr un pH óptimo para la síntesis manteniendo una buena fluorescencia, se ensayaron tres volúmenes diferentes de NaOH: 20, 30 y 50  $\mu\text{L}$ , siendo el pH de cada disolución inicial (10 mL de agua desionizada + volumen de NaOH + ácido lipoico en una relación molar Pt:LA, 1:5) de 5,7, 11,0 y 11,5, respectivamente. En la **Figura 36** se muestra una comparación de los espectros de emisión de fluorescencia normalizados para cada síntesis de PtNCs empleando los tres volúmenes NaOH 2 M, tras ser purificadas y ajustadas el pH final a 3. La fluorescencia resultante parece indicar que realizar una síntesis a pH ácido (5,7 con 20  $\mu\text{L}$  de NaOH) no favorece la reacción, puesto que la fluorescencia resultante de la síntesis decrece en un 65% comparada con la emisión a un pH de 11.



**Figura 36:** Emisión fluorescente de los PtNCs sintetizados con diferentes volúmenes de NaOH (2 M) añadido a la mezcla de síntesis. Para fines comparativos, la fluorescencia se midió al mismo pH (pH final 3) para las tres síntesis.  $\lambda_{ex}=455$  nm.

Con el objetivo de seleccionar el pH más adecuado para la síntesis de PtNCs, se estudió, además, el rendimiento de cada una de las síntesis comparándolo con los resultados obtenidos por fluorescencia. Para ello se determinó la concentración de Pt en cada una de las síntesis por ICP-MS, tal y como se describe en el procedimiento Experimental General (**Sección C.4.3.3**). Se determinó la cantidad de Pt en las suspensiones de PtNCs purificadas y reconstituidas en agua (PtNCs retenidos en los filtros de ultracentrifugación) y se comparó con la concentración de Pt en la “disolución madre” (disolución de la sal precursora de platino).

Las concentraciones de Pt en las síntesis de PtNCs estudiadas empleando 20  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , y 50  $\mu\text{L}$  de NaOH (tras ser purificadas), fueron de  $5,64 \pm 0,10$   $\mu\text{moles}$ ,  $7,90 \pm 0,12$   $\mu\text{moles}$ , y  $6,85 \pm 0,15$   $\mu\text{moles}$ , respectivamente. Al comparar estos valores con los  $\mu\text{moles}$  de Pt en la “disolución madre”  $9,39 \pm 0,17$   $\mu\text{moles}$  se pueden conocer los rendimientos de las tres síntesis. Para ello, se aplicó la **Ecuación 1** descrita en la **Sección C.4.3.3** y los valores obtenidos son del 60% cuando se utilizan 20  $\mu\text{L}$  de NaOH (síntesis en pH ácido), mientras que el rendimiento de PtNCs empleando 30  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  de NaOH (pH~11, básico) es del 84% y 73%, respectivamente. Analizando estos resultados y comparándolos con los datos de fluorescencia (**Figura 36**) se puede afirmar que el pH ácido no favorece a la reacción de síntesis. Es probable que 20  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M no sean suficientes para disolver por completo el ácido lipoico en la disolución de partida y por tanto que haya nanoestructuras sin pasivar completamente que durante la purificación se desestabilizan y permiten filtrar su contenido metálico. Por otro lado, se considera que el pequeño cambio en el valor de pH observado al adicionar 30 ó 50  $\mu\text{L}$  de NaOH a la síntesis (11,0 y 11,5, respectivamente) puede ralentizar la reacción de reducción y por ello que 15 h no sean suficientes para completar la reacción de síntesis empleando 50  $\mu\text{L}$  de NaOH. De este modo se observa una fluorescencia más baja a las 15 h de reacción empleando 50  $\mu\text{L}$  de NaOH en comparación con la síntesis empleando 30  $\mu\text{L}$  de NaOH. Se debe señalar que, tal y como se representa en la **Figura 36**, el aumento de la fluorescencia es mayor que la diferencia en el rendimiento de la síntesis: en el caso de las síntesis

de 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  es de un 24% (60% frente al 84%, respectivamente), lo que indica que los PtNCs de mayor calidad se sintetizarían con 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M.

De cara a elegir el pH adecuado para la síntesis de PtNCs se debe estudiar con mayor profundidad cada una de ellas. Es decir, no sólo evaluar la fluorescencia o el rendimiento obtenido para la síntesis, sino también considerar la estructura, tamaño, y dispersión de tamaños de los PtNCs sintetizados en cada caso, puesto que la condición es obtener un protocolo que permita la síntesis de PtNCs lo más homogéneos posible siempre y cuando la fluorescencia sea elevada.

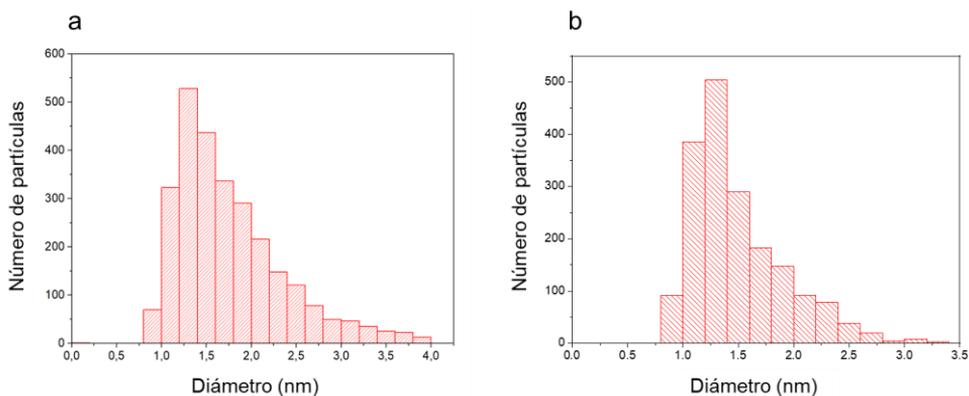
### D.4.4. Caracterización estructural de los PtNCs

A continuación, se estudiaron los PtNCs sintetizados con 20  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de NaOH mediante HR-TEM con el objetivo de evaluar posibles diferencias en su estructura (diámetro y dispersión de tamaños) debido al cambio de pH en el medio.

Las medidas por HR-TEM permitieron obtener imágenes en campo claro (*bright field*) de los PtNCs sintetizados en ambas condiciones de pH. Los diámetros promedio de las nanoestructuras se determinaron manualmente midiendo PtNCs individuales (observados al azar en las fotografías de HR-TEM) empleando la herramienta del software libre Fiji-ImageJ. Los histogramas obtenidos para la distribución de tamaños de las suspensiones de PtNCs se recogen en la **Figura 37** (**Figura 37a** PtNCs con 20  $\mu\text{L}$  de NaOH y **Figura 37b** PtNCs con 30  $\mu\text{L}$  de NaOH). Promediando el diámetro medido para el caso de los PtNCs sintetizados en pH básico (30  $\mu\text{L}$  NaOH), el diámetro resulta en  $1,49 \pm 0,03$  nm (para  $n = 1800$ , intervalo de confianza del 99%, con la distribución normal estándar), mientras que los PtNCs sintetizados en pH ácido (20  $\mu\text{L}$  de NaOH) mostraron un diámetro promedio mayor de  $1,73 \pm 0,05$  nm ( $n = 1800$ , intervalo de confianza del 99%, con la distribución normal estándar).

El mayor tamaño promedio, así como la mayor dispersión en el caso de los PtNCs sintetizados con 20  $\mu\text{L}$  de NaOH apoyan lo resultados experimentales obtenidos para el rendimiento de las síntesis. Un mayor tamaño de las nanoestructuras

empleando el pH más ácido corrobora la propuesta de que el AL no está disponible en su totalidad, es decir no disuelto completamente, y por lo tanto no permite el pasivado de la superficie de los núcleos metálicos de las nanoestructuras de manera eficaz.



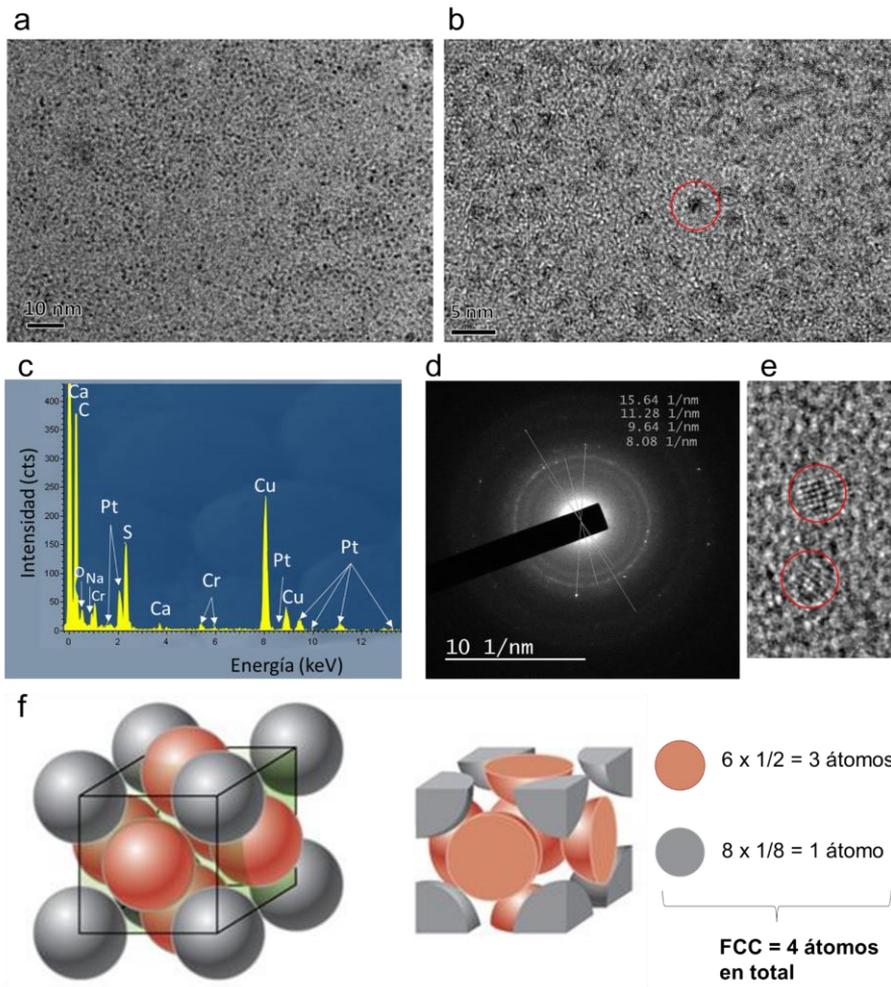
**Figura 37:** Histogramas obtenidos a partir de las imágenes por HR-TEM de las suspensiones coloidales de PtNCs sintetizados donde se muestra la distribución del diámetro empleando: (a) 20  $\mu\text{L}$  de NaOH, y (b) 30  $\mu\text{L}$  de NaOH. Los diámetros han sido medidos con el software Fiji-ImageJ.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente comentados junto con la baja resolución obtenida para las imágenes por HR-TEM de la síntesis de pH ácido (debido a “suciedad” proveniente del AL sin disolver), se decidió seleccionar la síntesis de PtNCs con 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2 M para ser empleados como etiqueta en la síntesis de inmunosondas con el objetivo de aplicarlos en la determinación de biomoléculas en muestras biológicas.

En la **Figura 38** se recogen las micrografías de los PtNCs con 30  $\mu\text{L}$  de NaOH resultantes durante su caracterización estructural por HR-TEM. Se puede observar cómo en color más oscuro (imágenes en BF) se distinguen los núcleos metálicos de las nanoestructuras sintetizadas (**Figura 38a** y **b**), así como la red cristalina (nanoestructura marcada con un círculo rojo, **Figura 38b** y **e**). Además, la gráfica de EDX (**Figura 38c**), confirma la presencia de Pt (núcleo metálico), y S (ligando tiolado) como elementos principalmente presentes en las suspensiones observadas por microscopía electrónica. Hay que hacer constar que la presencia de Cu se atribuye a las

rejillas empleadas en microscopía para depositar las muestras, y el Cr es un elemento constituyente de la estructura del microscopio.

Adicionalmente, el equipo HR-TEM empleado permitió obtener un patrón de difracción de área seleccionada SAED, donde se observan los puntos claros que forman los anillos (estructura cristalina). Tal y como se describe en el apartado de caracterización morfológica y estructural (**Sección C.4.3.2**), se puede conocer la estructura de la celda unidad de los PtNCs por comparación de los  $dLspacing$  obtenidos a partir de los diámetros de los anillos del patrón SAED con la bibliografía. De esta manera, la inversa de los radios ( $R$ ) de los anillos del patrón SAED corresponden a los valores del espaciado entre planos atómicos de la estructura cristalina, ( $dLspacing$ ). En el caso de los PtNCs sintetizados, se encontró un diámetro ( $d = 2R$ ) para los anillos de 80,8; 96,4; 112,8; y 156,4 Å<sup>-1</sup> (**Figura 38d**), donde los valores de  $dLspacing$  resultantes son 2,4 Å; 2,1 Å; y 1,3 Å. Estos valores coinciden con los encontrados en la bibliografía para la celda unidad cúbica centrada en las caras (FCC): 2,3 (dL1), 2,0 (dL2), 1,4 (dL3) Å. Con esta información, se puede conocer además el número de átomos que forman una celda unidad de la red cristalina FCC. Tal y como se recoge en la **Figura 38f**, seis medias partes de átomos y ocho octavas partes de átomos hacen un total de 4 átomos por FCC.



**Figura 38:** Imágenes obtenidas para la caracterización estructural de los PtNCs sintetizados empleando 30  $\mu\text{L}$  de NaOH 2M, a) imagen de HR-TEM (10 nm de escala), b) Imagen de HR-TEM (5 nm de escala), c) gráfico EDX con la composición elemental, d) patrón SAED, e) zoom de la imagen de HR-TEM donde se observan los planos atómicos de la estructura cristalina ( $d_{\text{spacing}}$ ), y f) representación teórica de la estructura cristalina FCC y cálculo del número de átomos por celda unidad.

#### D.4.5. Cálculo de la concentración de PtNCs en disolución

Como se ha indicado en el apartado anterior, la celda unidad de la estructura cristalina FCC está constituida por 4 átomos de metal por lo que, teniendo en cuenta la masa atómica del Pt ( $195,081 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  de átomos de Pt) y la constante de Avogadro ( $N_A$ ;  $6,022\cdot 10^{23} \text{ n}^\circ$  de partículas  $\cdot \text{mol}^{-1}$ ) se puede calcular la masa de la celda unidad

(**Ecuación 3**). Además, sabiendo que la densidad del Pt es de  $21,45 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , se puede calcular el volumen teórico de la celda (**Ecuación 4**), resultante en  $6,04\cdot 10^{-2} \text{ nm}^3$ .

$$Masa_{celda\ unidad} = \frac{4 \text{ átomos Pt} \times masa\ atómica\ Pt\ (g\cdot mol^{-1})}{NA\ (\text{átomos}\cdot mol^{-1})} = 1,296 \cdot 10^{-21} g \quad \text{Ecuación 3}$$

$$V_{celda\ teo.} = \frac{masa_{celda\ unidad}(g)}{densidad\ Pt\ (g\cdot cm^{-3})} \times \frac{1\cdot 10^{21}\ nm^3}{1\ cm^3} = 6,04 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^3 \quad \text{Ecuación 4}$$

Paralelamente, sabiendo del valor promedio del diámetro del núcleo metálico medido con el Fiji-ImageJ a partir de las imágenes obtenidas HR-TEM para los PtNCs, 1,49 nm y asumiendo forma esférica de las nanoestructuras, se encontró que el volumen que ocupa un único PtNCs es (**Ecuación 5**):

$$Volumen\ NC_{exp.} = \frac{4}{3} \times \pi \times R_{NC}^3 = 1.77 \text{ nm}^3 \quad \text{Ecuación 5}$$

Dividiendo el volumen experimental promedio de un PtNC por el volumen teórico de la celda unidad ( $V_{celda\ teo.}$ ) se obtiene que 1 único PtNC ocupa 29,25 celdas unidades FCC. Por lo tanto, si cada celda unidad está formada por 4 átomos, podemos saber que cada PtNC está compuesto por 117 átomos de Pt de media (29,25 celdas x 4 átomos de Pt por celda).

De este modo, conociendo el número de átomos que componen 1 único PtNC (117 átomos), los moles de Pt en la síntesis purificada determinados por ICP-MS ( $7,90\cdot 10^{-4}$  moles Pt  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), y teniendo en cuenta el n° de Avogadro se puede transformar la concentración molar de Pt iónico en concentración molar de PtNCs resultando en  $6,75\cdot 10^{-6}$  moles de PtNCs  $\cdot$  L<sup>-1</sup>.

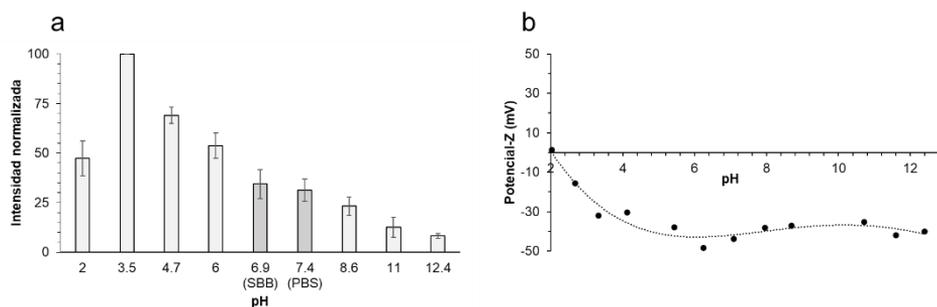
Adicionalmente, el número de átomos de Pt por NC será de interés en estudios posteriores (Capítulo II) para calcular el factor de amplificación al emplear los PtNCs como marcas elementales de anticuerpos específicos con detección por ICP-MS para la detección de las biomoléculas diana.

#### D.4.6. Estudios de estabilidad de los PtNCs

✓ Dependencia del pH en la fluorescencia y el potencial-Z

Es conocido que el pH es un parámetro que tiene una influencia directa en la emisión fluorescente y la estabilidad de las nanoestructuras. Por ello, uno de los primeros estudios llevados a cabo con los PtNCs sintetizados fue evaluar el efecto del pH en la fluorescencia.

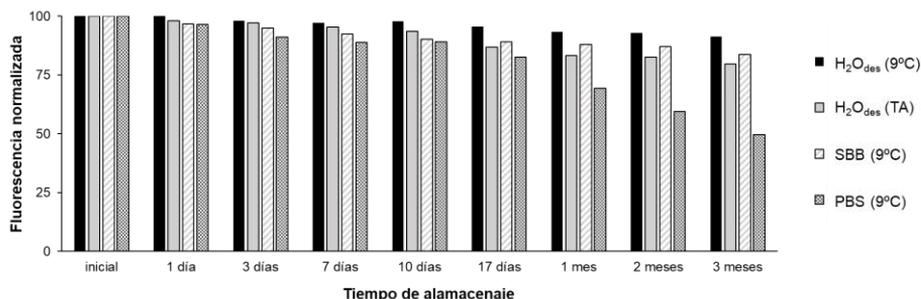
En la **Figura 39a** se recoge la fluorescencia observada para la suspensión coloidal de PtNCs a diferentes valores de pH (desde 2 a 12,4), ajustados una vez purificada la síntesis (todas ellas con una misma concentración). La señal de emisión fluorescente (recogida a 620 nm) para la suspensión de PtNCs aumentó al disminuir el pH de 12,4 a 3,5 (mayor emisión fluorescente a pH más ácido, entre 3-4,7). Por otra parte, y de manera complementaria, la **Figura 39b** muestra los valores obtenidos para el potencial-Z a los diferentes pH, dando información sobre la estabilidad de los PtNCs en suspensión acuosa. Se observa cómo la suspensión coloidal es estable en todo el rango de pH, exceptuando a pH ácidos ( $\text{pH} < 3$ ). La estabilidad viene indicada cuando los valores de mV son mayores de +30 o menores de -30 mV. Estos resultados pueden deberse al AL (ligando estabilizante de la nanoestructura), el cual presenta en su extremo un ácido carboxílico ( $\text{pK}_a \sim 4,5$ ) por lo que la nanoestructura se presenta desprotonada (con carga negativa) en todo el rango de pH básico. Teniendo en cuenta estos resultados se podría afirmar que, aunque la fluorescencia a un pH biológico ( $\text{pH} \sim 7$ , neutro) es en torno al 50% de la máxima, los PtNCs son estables en ese rango de pH, presentando valores de Potencial-Z alrededor de -50 mV. Esto indica que los PtNCs son adecuados para emplearlos como marcas en aplicaciones biológicas (se trabaja con medios en esos rangos de pH).



**Figura 39:** Gráficas donde se puede observar la influencia del pH en la emisión fluorescente y estabilidad de los PtNCs sintetizados y purificados. a) Influencia del pH en la fluorescencia de los PtNCs, y b) Medidas del potencial-Z (medida indirecta de la estabilidad de los PtNCs) a los diferentes valores de pH. Las barras de error en la figura a) representan la desviación estándar de tres medidas de fluorescencia para tres síntesis de PtNCs diferentes.

✓ Estabilidad de los PtNCs con el tiempo

Aunque se observó que la fluorescencia máxima de los PtNCs estaba a pH ácido, de cara a evaluar los PtNCs como marcas para la detección en muestras biológicas, la estabilidad de sus propiedades debe ser estudiada a los pH a los que se encuentran las muestras a analizar (pH~7). En este caso, la estabilidad de los PtNCs se estudió monitorizando su emisión luminiscente con el paso del tiempo (620 nm) al ser almacenadas, una vez purificadas, en diferentes condiciones (temperatura ambiente versus 9°C) y disolventes (agua, SBB, y PBS). En la **Figura 40** se recoge la fluorescencia normalizada obtenida para los PtNCs purificados y llevados a volumen con agua desionizada, tampón PBS (pH=7,4), y tampón SBB (pH=6,9).

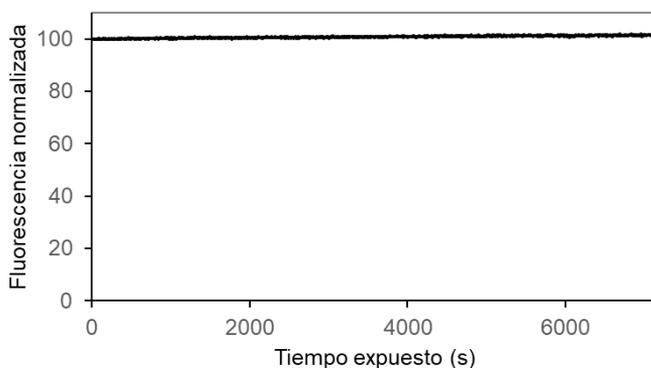


**Figura 40:** Gráfico comparativo de la fluorescencia medida a 620 nm para las suspensiones de PtNCs purificadas y almacenadas en diferentes condiciones a lo largo de tres meses. TA= temperatura ambiente.

De manera general, los PtNCs presentan elevada estabilidad fluorescente en un periodo máximo investigado de 3 meses (**Figura 40**). Por una parte, se observó que la temperatura no afecta a la fluorescencia de los PtNCs, siendo ligeramente más estable su almacenaje en nevera (9°C) que a temperatura ambiente. Respecto al disolvente empleado, aunque en el caso del PBS la emisión fluorescente disminuye cerca del 50% al permanecer almacenados durante 3 meses, su intensidad a corto y medio plazo (hasta 10 días) es comparable a lo observado en tampón SBB o agua desionizada. A la vista de los resultados experimentales, los PtNCs deben ser purificados en agua desionizada o SBB para su almacenaje a largo plazo (tal y como se recogía en la **Tabla 1** del Experimental General). Sin embargo, el tampón PBS es el medio empleado para llevar a cabo las bioconjugaciones e inmunoensayos. Para ello, sólo la alícuota (volumen de PtNCs necesario) que se va a emplear para llevar a cabo la bioconjugación es purificada y reconstituida en PBS durante un periodo corto de tiempo (no más de una semana en PBS) para asegurar así la estabilidad de su emisión fluorescente. Mencionar que de manera preventiva los PtNCs fueron guardados siempre en oscuridad y protegidos de la luz directa.

Paralelamente, resulta interesante estudiar la estabilidad de la señal fluorescente de los PtNCs al excitarlos durante un tiempo constante. Con este objetivo, se ha recogido la intensidad de emisión luminiscente a 620 nm de los PtNCs al excitarlos

a 455 nm durante 2 h (ver **Figura 41**). Como se muestra en la gráfica, no se observaron cambios significativos en la emisión de fluorescencia, por lo que se puede afirmar que la fluorescencia no se ve afectada a lo largo de este intervalo de exposición.



**Figura 41:** Gráfico de la evolución de la emisión fluorescente de los PtNCs (620 nm) monitorizada durante 2 h (7200 s) con excitación constante a 455 nm.

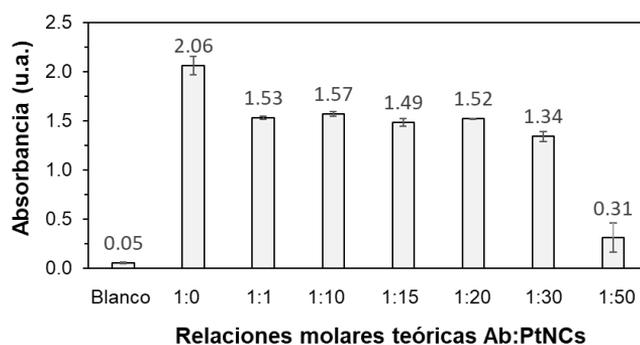
### D.4.7. Estudio y elección de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

Con el objetivo de encontrar una relación molar adecuada Ab:PtNCs con la que sintetizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, se estudió la funcionalidad del Ab así como la amplificación generada por la marca (PtNCs) empleando diferentes relaciones molares para su síntesis. En la **Tabla 5** se recogen las relaciones molares Ab:PtNCs ensayadas que van desde 1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, hasta 1:50. Una relación molar adecuada es aquella que no genera pérdida de la función de reconocimiento del Ab tras el etiquetado, manteniendo una elevada amplificación de la señal por parte de la marca. En el caso de los PtNCs se evaluó tanto la amplificación generada para su detección por fluorescencia como para su detección por ICP-MS (i.e., se debe elegir la relación molar Ab:PtNCs más alta, siempre que se mantenga la funcionalidad de la inmunosonda).

En primer lugar, se estudió cómo la funcionalidad del Ab tras la bioconjugación y purificación de la inmunosonda se ve afectada por el marcaje. Para ello, se

llevó a cabo el inmunoensayo ELISA espectrofotométrico indirecto con los diferentes bioconjugados (diferentes relaciones molares Ab:PtNCs) siguiendo las etapas descritas en la **Figura 31**. En este caso, se inmovilizó la proteína diana (IgE) en los pocillos de una placa ELISA y se empleó un Ab secundario marcado con HRP para su detección espectrofotométrica midiendo la absorbancia del producto colorimétrico resultante en un lector de placas a 450 nm ( $\lambda_{\text{abs}}$ ).

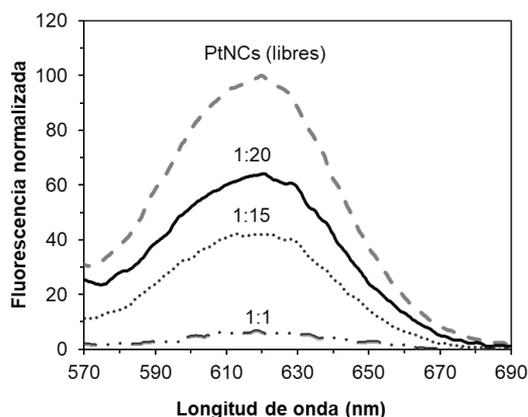
La **Figura 42a** muestra la absorbancia resultante de las diferentes relaciones molares Ab:PtNCs investigadas. En primer lugar, se observa una disminución de la absorbancia para las relaciones molares de 1:1, 1:10, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs frente a la absorbancia del Ab sin etiquetar (2,06). En todos los casos se muestra una absorbancia similar, con valores en el rango entre 1,49-1,57. Esta bajada detectada en la absorbancia puede atribuirse a la pérdida de inmunosonda (Ab:PtNCs) durante las etapas de purificación (p.ej., adsorción a las paredes del filtro o el Eppendorf). Si se sigue aumentando la relación molar Ab:PtNCs se observa una ligera disminución en la absorbancia con la relación 1:30. Sin embargo, a relaciones molares mayores (1:50) se produce una bajada drástica. Esta disminución puede atribuirse al bloqueo de los sitios de reconocimiento del Ab por parte de las nanoestructuras.



**Figura 42:** Estudio de la funcionalidad de la inmunosonda con las diferentes relaciones molares ensayadas Ab:PtNCs (1:0-1:50) mediante la medida de la absorbancia a 450 nm para el producto resultante tras el revelado colorimétrico del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de medida para cada relación molar.

Paralelamente, las bioconjugaciones sintetizadas empleando las diferentes relaciones molares fueron estudiadas en cuanto a su emisión fluorescente, así como la

amplificación conseguida mediante detección por ICP-MS. En la **Figura 43** se recoge una comparación de los espectros de emisión fluorescente para el bioconjugado con relaciones molares Ab:PtNCs de 1:1, 1:15, y 1:20, así como el espectro obtenido para una disolución de PtNCs en suspensión con el mismo factor de dilución que la relación 1:20 (en tampón PBS). Se observa cómo la mayor relación molar ensayada (Ab:PtNCs 1:20), que asegura la funcionalidad del Ab, presenta una buena señal fluorescente si se compara con las otras relaciones molares de menor concentración (1:15 y 1:1). Puede parecer extraña la bajada en la fluorescencia experimentada al comparar los PtNCs (libres) y el bioconjugado 1:20. Sin embargo, este hecho se puede comprender teniendo en cuenta los rendimientos de la síntesis de la inmunsonda los cuales se determinaron mediante el análisis elemental por ICP-MS.



**Figura 43:** Caracterización fluorescente de los PtNCs libres y los bioconjugados Ab:PtNCs con tres relaciones molares diferentes (1:1, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs). La medida de la fluorescencia se realiza a 620 nm.

El número real de PtNCs por Ab se pudo estimar midiendo la concentración de Pt por ICP-MS en las disoluciones de Ab etiquetado que contenían una cantidad conocida de Ab, es decir tras la síntesis y purificación de las inmunosondas. En la **Tabla 6** se recogen los resultados obtenidos por ICP-MS para la determinación de Pt en las diferentes suspensiones. Se puede observar cómo los rendimientos de etiquetado disminuyen a medida que aumenta la proporción de PtNCs. Por ejemplo, para la relación molar teórica de 1:1 Ab:PtNCs (en la disolución), no se llegó a eti-

quetar todo el Ab pues los resultados experimentales muestran un 77,6% de rendimiento de etiquetado, lo que corresponde a una relación molar real de 1:0,77 Ab:PtNCs. Sin embargo, para la relación molar teórica de 1:20 Ab:PtNCs el rendimiento de etiquetado disminuyó hasta el 55,7%, lo que corresponde a una relación molar real promedio de 1:11,13 Ab:PtNCs.

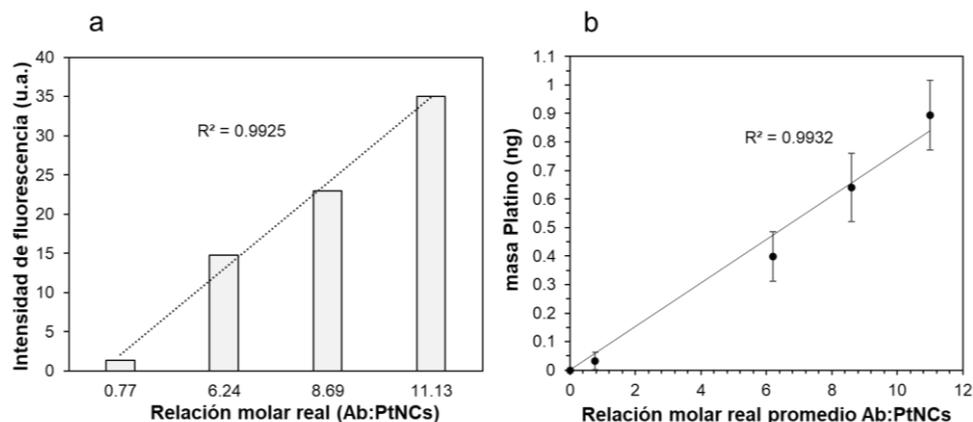
**Tabla 6:** Rendimiento del etiquetado del Ab con los PtNCs durante la síntesis de la inmunosonda mediante análisis de los bioconjugados una vez purificados por ICP-MS.

Relación molar Ab:PtNC (síntesis inmunosonda)	1:1	1:10	1:15	1:20
Rendimiento de la bioconjugación %	77,60%	62,41%	57,92%	55,67%
Relación molar “real” promedio Ab:PtNC	1:0,77	1:6,24	1:8,69	1:11,13

Teniendo en cuenta este estudio, la relación molar teórica 1:20 Ab:PtNCs es en realidad una relación molar promedio de 1:11,13 (i.e., el etiquetado es un 45% menos de lo esperado teóricamente). Por tanto, la pérdida de fluorescencia observada en la **Figura 43** para la relación molar 1:20, está en concordancia con el rendimiento estimado de la bioconjugación resultante (~40% menos de fluorescencia).

Por otro lado, hay que destacar que se observó una buena relación lineal (regresión lineal con un coeficiente de regresión de 0,9925) al representar las diferentes relaciones molares reales del bioconjugado (hasta 1:11,13 Ab:PtNCs) frente a la señal de fluorescencia medida a 620 nm en los bioconjugados en disolución tras su purificación (**Figura 44a**). Además, se estudió también la concentración de Pt que contienen los pocillos de la placa ELISA tras llevar a cabo el inmunoensayo espectrofotométrico (**Figura 42**). Para ello, tras recuperar el contenido de los pocillos (siguiendo el protocolo detallado en el experimental **Figura 33**) se determinó su contenido en Pt por ICP-MS. En la **Figura 44b** se muestra de manera gráfica la relación lineal obtenida al representar la masa de Pt detectada (en ng) frente a la relación molar real Ab:PtNCs para cada uno de los pocillos, es decir, que la cantidad creciente de Pt encontrada en cada pocillo de la placa ELISA para las relaciones molares promedio

Ab:PtNCs entre 1:0,77 y 1:11,13 es directamente proporcional a la relación molar real encontrada al medir el bioconjugado por ICP-MS.



**Figura 44:** Estudio de la inmunosonda Ab:PtNCs empleando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs mediante medidas por fluorescencia e ICP-MS. a) Relación lineal observada entre la fluorescencia detectada en los bioconjugados en disolución y la relación molar real Ab:PtNCs, y b) Relación entre la masa de Pt detectada por ICP-MS en los pocillos ELISA de los experimentos recogidos en la Fig. 44a y la relación molar real Ab:PtNCs. Las desviaciones corresponden a la desviación de  $n=3$  pocillos (réplicas del inmunoensayo).

De este estudio se puede concluir que la relación molar teórica Ab:PtNCs 1:20 (1:11,13 relación molar real promedio) es la relación que presenta una elevada amplificación de la señal tanto fluorescente como elemental (ICP-MS), manteniendo la funcionalidad de reconocimiento del Ab. Por tanto, se elige como la relación molar adecuada para la síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, la cual es aplicada a continuación para la determinación de la biomolécula diana, la proteína IgE.

#### D.4.8. Determinación de IgE mediante un inmunoensayo competitivo en placa basado en la detección bimodal de PtNCs

La determinación de IgE utilizando la inmunosonda que contiene PtNCs como etiqueta se llevó a cabo con un inmunoensayo competitivo directo. Para ello se evaluaron dos tipos de detecciones de la marca metálica. Por una parte, la detección por fluorescencia haciendo uso de la microscopía láser confocal y por la otra, la

detección elemental con ICP-MS. Posteriormente, se comparan las dos metodologías de análisis propuestas evaluando los límites de detección obtenidos y finalmente se selecciona aquella que muestre mejores prestaciones analíticas para cuantificación de la IgE en cuatro muestras de suero humano.

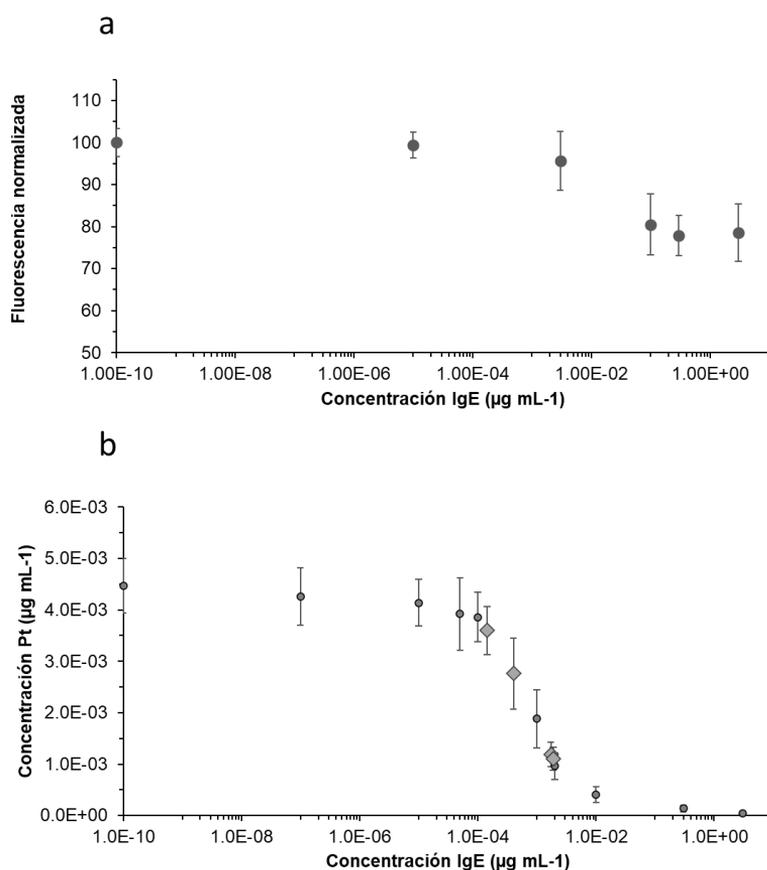
La **Figura 45a** muestra la curva de inhibición obtenida por detección fluorescente siguiendo el protocolo detallado en la sección Experimental empleando los estándares de proteína IgE (concentraciones desde  $0\text{-}3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La curva de calibración (**Figura 45a**) se ajustó con una ecuación de cuatro parámetros empleando el programa MyAssays Ltd., de la cual se ha podido extraer los valores de concentración de IgE inhibitoria (IC), el límite de detección (LOD), y el rango lineal. El LOD, correspondiente al IC10, fue de  $0,6\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE, mientras que el rango lineal (IC20-IC80) se extendió desde  $1,6\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $60\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE. Este valor para el LOD es ligeramente peor que el LOD publicado para una estrategia de análisis similar donde se emplean AuNCs como etiquetas fluorescentes ( $0,2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE)<sup>38</sup>. Esta diferencia observada para el LOD puede atribuirse en parte al instrumento empleado para llevar a cabo la detección de la fluorescencia en el caso de los PtNCs. Como se ha detallado en la Sección Experimental General, el microscopio confocal (TCS-SP8X, Leica) dispone de un diodo láser a 405 nm y un láser blanco con libre elección de líneas de excitación en un rango de longitudes de onda desde 470 a 670 nm. Esto implica que, al contrario de lo que ocurre con los AuNCs donde su  $\lambda_{\text{ex}}$  máxima es a 400 nm y estos pueden ser excitados a 405 nm (longitud de onda muy cercana a la máxima de excitación), los PtNCs con una  $\lambda_{\text{ex}}$  máxima de 455 nm no disponen de una longitud de onda cercana para poder ser excitados en máximo. Tras varios ensayos, se decide que la excitación de las muestras en el caso de los PtNCs se realizará a 470 nm (fijado en el láser blanco), teniendo en cuenta que, al no ser la longitud de excitación máxima de la etiqueta, la sensibilidad de la detección se ve disminuida.

---

<sup>38</sup> M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens Bioelectron.* 77, (2016), 1055–1061.

En el caso de la detección con ICP-MS, la curva de inhibición obtenida (detectando el Pt presente en cada pocillo de la placa ELISA) mostró unos resultados prometedores. El gráfico de calibración resultante (**Figura 45b**, círculos) se ajustó con una ecuación de cuatro parámetros empleando el programa MyAssays Ltd. El LOD (IC10) encontrado fue de  $0,08 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE, y el rango lineal (IC20-IC80) desde  $0,10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $2,6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE.

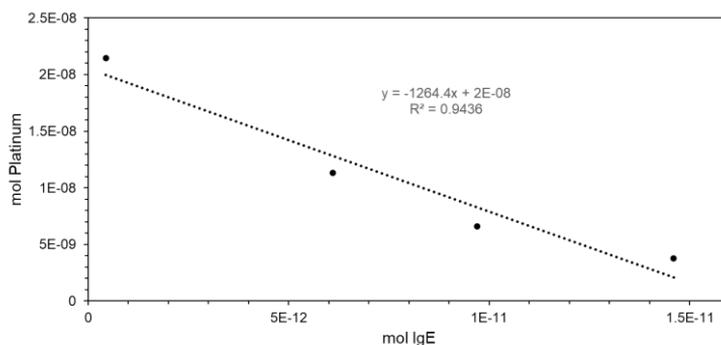
A la vista de los resultados experimentales obtenidos se puede decir que el LOD por ICP-MS es más bajo que el obtenido por detección fluorescente empleando la misma inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs y además es menor también que el LOD de  $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtenidos previamente con los AuNCs como marcas fluorescentes<sup>38</sup>.



**Figura 45:** Curvas de calibración obtenidas para la determinación de IgE empleando un inmunoensayo con formato competitivo en el que se utiliza la inmunosonda Anti-b-IgE:PtNCs (relación molar promedio 1:11,13 Ab:PtNCs). (a) Gráfico de calibración por detección de fluorescencia con microscopía láser confocal ( $\lambda_{\text{exc}}=470 \text{ nm}$ , rango  $\lambda_{\text{em}}=610\text{-}650 \text{ nm}$ ). El eje Y de la gráfica corresponde a la densidad integrada normalizada de la señal de fluorescencia de los PtNCs en cada pocillo empleando el programa Fiji-ImageJ. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de dos medidas independientes, (b) Gráfico de calibración por ICP-MS (isótopo medido  $^{195}\text{Pt}$ ). El eje Y corresponde a la concentración de Pt, calculada mediante una curva de calibración externa con patrón interno ( $^{193}\text{Ir}$ ). Las marcas negras circulares corresponden a los estándares de proteína IgE en solución PBS para construir la curva de calibración, mientras que las marcas con forma de rombo corresponden a los sueros enriquecidos (con diferentes concentraciones de estándar IgE). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de tres medidas independientes.

En la **Figura 46** se muestra la relación molar de Pt detectada en el ICP-MS en cada pocillo de la placa e IgE (moles) empleada para la calibración. Es interesante señalar que se obtiene una relación lineal para esta relación, con una pendiente de 1264 unidades, la cual concuerda con la amplificación de la señal esperada por ICP-

MS. La inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs contiene una media de 11,13 PtNCs por Ab y cada NC está compuesta por 117 átomos de Pt en promedio, es decir, la amplificación esperada es de  $\sim 1291$ , valor que similar al de la pendiente observada.



**Figura 46:** Factor de amplificación de la detección de IgE: representación de los moles de Pt determinados por ICP-MS por pocillo de la placa ELISA frente a los moles de IgE incubados durante el inmunoensayo competitivo

A la vista de los buenos resultados obtenidos para la detección elemental de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs que además presenta mejores LOD que los publicados con otros métodos de cuantificación de IgE en suero sanguíneo (**Tabla 4**), se optó por llevar a cabo la detección por ICP-MS para la determinación de IgE en cuatro muestras de suero humano, un suero comercial y tres clínicos.

Previamente, se estudió el efecto que la matriz del suero podría tener en la determinación de IgE con la metodología propuesta. Para ello, se añadieron concentraciones de  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-3}$ , y  $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de IgE a un suero comercial diluido 1:1000. Los resultados obtenidos para el análisis de estas muestras son mostrados en la curva de inhibición (**Figura 45b**) como rombos grises. Como se puede observar, los puntos correspondientes a las muestras con adiciones se ajustan perfectamente a la gráfica de calibración. Es decir, las pendientes de ambas curvas son idénticas, demostrando que no existen efectos de matriz al analizar las muestras de suero y por lo tanto que es posible cuantificar la IgE en muestras de suero diluidas mediante una calibración con patrón de IgE en PBS.

Los resultados obtenidos para las concentraciones de IgE en cuatro sueros humanos (tres de personas control y un suero comercial) se recogen en la **Tabla 7**. Como se puede observar, la concentración de IgE en las muestras de suero varía en un amplio rango de concentración, desde  $0,052 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hasta  $0,285 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para validar los resultados obtenidos en la determinación de IgE con la metodología de análisis propuesta, se analizaron las mismas muestras de suero con un kit ELISA comercial, proporcionando unos valores para la concentración de IgE que concuerdan con los obtenidos empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por espectrometría de masas elemental.

**Tabla 7:** Resultados obtenidos para la cuantificación de IgE en muestras de suero humano empleando la metodología desarrollada basada en el empleo de una inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por ICP-MS. Además, se incluye en la Tabla la concentración de IgE obtenida con un kit ELISA comercial. En ambos casos los valores de la desviación estándar corresponden a la incertidumbre asociada a la medida de tres réplicas independientes de la misma muestra.

Muestra	[IgE] - Anti-h-IgE:PtNCs & ICP-MS ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	[IgE] - Kit ELISA comercial ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
#Suero comercial	$0,285 \pm 0,030$	$0,280 \pm 0,025$
#Suero 1	$0,214 \pm 0,012$	$0,226 \pm 0,020$
#Suero 2	$0,0914 \pm 0,013$	$0,0893 \pm 0,012$
#Suero 3	$0,0520 \pm 0,0091$	$0,0536 \pm 0,0099$

### D.5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen de los estudios realizados en el Capítulo I de la Tesis Doctoral son las siguientes:

- ✓ Se han sintetizado PtNCs fluorescentes y solubles en agua mediante una estrategia de síntesis *bottom-up* empleando ácido lipoico como ligando y borohidruro sódico como agente reductor en una relación molar Pt:AL:NaBH<sub>4</sub>, 1:5:1. Los PtNCs sintetizados presentan un par fluorescente  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 455/620$  nm.
- ✓ Se ha realizado una caracterización de los PtNCs en términos de rendimiento, dispersión del tamaño, estabilidad, número de átomos de Pt por NC y concentración de Pt, mediante técnicas de fluorescencia, DLS, HR-TEM e ICP-MS. Se ha obtenido información sobre el rendimiento de la síntesis (84 %), su tamaño y distribución de tamaños ( $1,49 \pm 0,03$  nm), concentración de PtNCs ( $4,06 \cdot 10^{15}$  NCs/mL) y número de átomos promedio de Pt por NC (117 átomos). Esta información es crucial para desarrollar métodos de bioconjugación con los PtNCs que sean reproducibles.
- ✓ Se han evaluado los PtNCs sintetizados como marcas bimodales (detección fluorescente y por espectrometría de masas elemental) para su bioconjugación a un Ab tipo IgG. Como prueba de concepto se ha usado el anticuerpo anti-h-IgE para generar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs específica del biomarcador de la enfermedad alérgica IgE. Para ello se ha realizado:
  - La optimización de la bioconjugación a fin de lograr una relación molar óptima anticuerpo:PtNCs que mantenga tanto la funcionalidad del anticuerpo como las propiedades luminiscentes de los PtNCs (mediante medidas de fluorescencia y ELISA indirecto espectrofotométrico). Se ha observado que la relación

- 
- molar anticuerpo:PtNC que cumple estos requisitos es de 1:20 en la síntesis.
- Tras la caracterización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs se obtuvo que de media contiene  $\sim 11,13$  PtNCs por Ab (tipo IgG), correspondiendo a  $\sim 1200$  átomos de Pt por Ab (factor de amplificación) en medidas por ICP-MS.
  - ✓ Se ha evaluado el uso de los PtNCs como marcas con detección fluorescente y elemental el emplear las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs en el desarrollo de un inmunoensayo competitivo en placa para la determinación de IgE. Se ha encontrado que la detección elemental por ICP-MS presenta mejor límite de detección del biomarcador frente a la detección fluorescente ( $0,08$  y  $0,6$   $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente), si bien cabe destacar que en ambos casos los límites de detección son mejores que los obtenidos con los kits comerciales ELISA que se emplean actualmente para la determinación de IgE ( $12$   $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).
  - ✓ La amplificación de la señal de la detección de la IgE lograda con la detección por ICP-MS (pendiente de la curva de calibración) coincide en el factor de amplificación calculado que es  $\sim 1200$ .
  - ✓ Se ha evaluado la aplicación analítica de la metodología propuesta (inmunoensayo en formato competitivo) para el análisis de IgE en muestras de suero humano. Los resultados han demostrado que la determinación de IgE es factible con este método sin apenas pretratamiento de la muestra, mostrando además resultados de acuerdo con los obtenidos mediante un kit ELISA comercial.
  - ✓ A la vista de los resultados experimentales obtenidos, se demuestra el alto potencial que poseen el tipo de NPs sintetizadas (PtNCs) para su uso como marcadores altamente sensibles en inmunoensayos, especialmente por detección elemental. Además, en nuestros experimentos por detección elemental, se ha monitorizado el isótopo  $^{195}\text{Pt}$  que tiene una abundancia isotópica del 33,8%. Por lo tanto, el LOD por ICP-MS debería

mejorarse con PtNCs enriquecidos isotópicamente, tal y como se detalla en la Introducción de este capítulo.

- ✓ Además, la combinación de la inmunosonda PtNCs con la detección por ICP-MS abre la puerta al análisis múltiple de proteínas mediante el uso de NCs enriquecidos isotópicamente. En el caso particular del platino, es posible obtener hasta cinco inmunosondas diferentes por sus cinco isótopos estables que presenta:  $^{192}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$  y  $^{198}\text{Pt}$ , con el mismo protocolo de síntesis, aumentando así tanto la capacidad de *multiplexing* como la sensibilidad del análisis.





---

# E. CAPÍTULO II

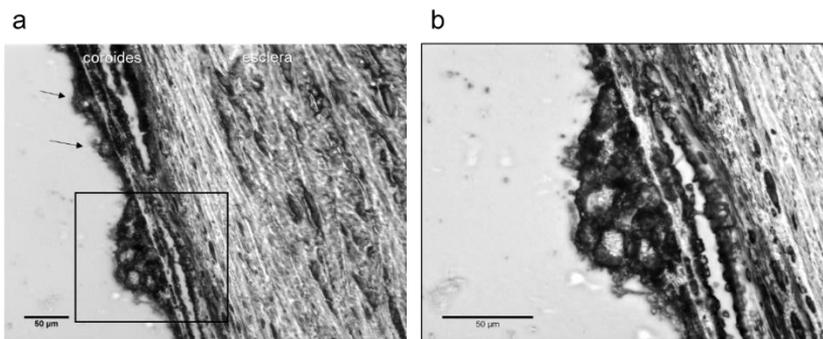
Estudios de *imaging* múltiple de proteínas relacionadas con la DMAE en secciones de tejidos oculares humanos empleando diferentes nanoclústeres metálicos como marca elemental y análisis por ablación láser ICP-MS

---



## E.1. INTRODUCCIÓN

En la Introducción General de esta Tesis Doctoral se describe detalladamente la fisiopatología de la DMAE, así como los signos estudiados para su diagnóstico clínico. En los primeros estadios de la enfermedad (DMAE temprana) aparecen depósitos extracelulares (denominados drusas) que están localizados entre la capa del EPR y la membrana de Bruch. Las drusas pueden estar presentes de manera basal en un ojo envejecido sano. Sin embargo, si su número y tamaño se ve incrementado de manera incontrolada, ocasionan dificultades en el transporte de nutrientes y oxígeno desde el torrente sanguíneo hasta las capas más internas de la retina. Esta limitación puede llegar a provocar la disfunción en los fotorreceptores (PR)<sup>1</sup>. En la imagen óptica de la **Figura 47** se muestra una sección de tejido humano (donante diagnosticado de DMAE) de la región ocular EPR-MBr-coroide. En esta imagen se observa claramente una acumulación de drusas (cuadrado), así como drusas individuales (flechas) a lo largo de la monocapa de células de EPR.



**Figura 47:** Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión para una sección de tejido ocular procedente de un donante que padece DMAE donde se pueden visualizar las acumulaciones de drusas en la región del EPR. a) Drusas individuales (señaladas con una flecha) y acumulación grupal de drusas (cuadrado) - zoom 20x, y b) Zoom 40x del grupo de drusas marcado en la imagen a).

Una DMAE en estado temprano (o inicial) evoluciona a un estado tardío el cual puede mostrarse en dos fenotipos diferentes: neovascularización (DMAE húmeda o exudativa) o atrofia geográfica (DMAE seca, o no exudativa) siendo este

<sup>1</sup> P. Mitchell, G. Liew, B. Gopinath, T.Y. Wong, Age-related macular degeneration. *Lancet* 392, (2018), 1147–1159.

último el más común y más grave de los dos. La DMAE seca implica una pérdida de visión irreversible y está relacionada directamente con la disfunción focal de las células del EPR debido al crecimiento incontrolado de las drusas, que finalmente provocan la muerte de los fotorreceptores y por ende la pérdida de la función visual<sup>2</sup>. Por ello, entender la formación de las drusas y, en particular, su composición, puede ayudar a comprender no sólo su crecimiento en la fase tardía de la enfermedad, sino también relacionarlo con la búsqueda de tratamientos eficaces para disminuir su progresión, los cuales son muy escasos a día de hoy para este fenotipo de DMAE<sup>3</sup>.

En la Introducción General se comenta además que se han identificado lípidos, proteínas, y minerales entre los componentes más abundantes de estos depósitos extracelulares<sup>4-6</sup>. En este sentido resulta interesante estudiar la acumulación y localización de ciertas proteínas en las drusas debido a su posible relación en procesos biológicos concretos que pueden estar implicados en el desarrollo de la enfermedad (p.ej., procesos de estrés oxidativo e inflamación consecuente del complejo celular EPR-MBr-PR). Teniendo en cuenta estudios previos del Grupo de investigación en esta temática junto a publicaciones recientes en la bibliografía<sup>6,7</sup>, en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se desarrolló una metodología analítica para estudiar la localización y determinar el contenido de tres proteínas implicadas en la formación de las drusas: la metalotioneína 1/2 (MT1/2), el factor H del complemento (CFH), y la

---

<sup>2</sup> H. Al-Hussaini, M. Schneiders, P. Lundh, G. Jeffery, Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells. *Exp Eye Res.* 88, (2009), 610–612.

<sup>3</sup> H.M. Zając-Pytrus, A. Pilecka, A. Turno-Kręcicka, J. Adamiec-Mroczek, M. Misiuk-Hojło, The dry form of age-related macular degeneration (AMD): The current concepts of pathogenesis and prospects for treatment. *Adv Clin Exp Med.* 6, (2015), 1099-104.

<sup>4</sup> C.A. Curcio, J. B. Presley, G. Malek, N.E. Medeiros, D.V. Avery, H.S. Kruth, Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Exp Eye Res.* 81, (2005), 731–741.

<sup>5</sup> J.M. Flinn, P. Kakalec, R. Tappero, B. Jones, I. Lengyel, Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration. *Metallomics* 6, (2014), 1223–1228.

<sup>6</sup> J.W. Crabb, The proteomics of drusen, *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 4, (2014), 17194.

<sup>7</sup> R.B. Thompson, V. Reffatto, J.G. Bundy, E. Kortvely, J.M. Flinn, A. Lanzirrotti, I. Lengyel, Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proc Natl Acad Sci.* 112, (2015), 1565–1570.

---

proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP). La relación de las estas proteínas con la DMAE está recogida en la Introducción General (**Sección A.1.2.1**).

Tradicionalmente, los métodos más utilizados para la localización de proteínas en tejidos biológicos son los métodos IHC basados en la reacción antígeno-anticuerpo. Estos pueden presentar una detección colorimétrica (deposición de un producto coloreado tras una reacción enzimática), o detección mediante IF empleando anticuerpos etiquetados con un fluoróforo (**Sección A.2.2.4**). Típicamente, la detección fluorescente presenta una mayor sensibilidad en comparación con los ensayos colorimétricos y son los más empleados en laboratorios clínicos. Sin embargo, tal y como se discute en la Introducción General, estos métodos presentan varias limitaciones en su uso, como son la dificultad para realizar ensayos de detección múltiple debido al solapamiento de las bandas espectrales de los fluoróforos, problemas para medir simultáneamente biomoléculas que difieren en su abundancia, así como problemas asociados a la fotosensibilidad y pérdida de fluorescencia de las marcas. Además, los procedimientos de IF están limitados también por la autofluorescencia de la propia muestra, especialmente en regiones de células pigmentadas, como ocurre con las células del EPR u otras zonas del tejido ocular (p.ej., región *pars plicata* de los cuerpos ciliares). Por tanto, las medidas por IF no permiten en algunos casos específicos identificar las moléculas diana o llevar cabo un análisis cuantitativo absoluto.

Estos problemas asociados a las medidas por IF pueden superarse en gran medida con la técnica de ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS. Esta técnica de *imaging* (**Sección A.4.2.1**) junto con la estrategia de marcaje específico de inmunosondas metálicas (anticuerpos etiquetados con marcas elementales) constituye una alternativa muy prometedora a la IHC e IF convencional<sup>8,9</sup>. Esta estrategia basada en la reacción antígeno-anticuerpo, empleando como Ab específico una inmunosonda

---

<sup>8</sup> 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.

<sup>9</sup> M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Anal Bioanal Chem.* 411, (2019), 549–558.

metálica permite la determinación específica de biomoléculas con una alta sensibilidad y posibilidad de análisis multiparamétrico<sup>10</sup>. Además, permite detectar la distribución de proteínas específicas dentro de los tejidos biológicos con una resolución micrométrica y en regiones que, debido a la autofluorescencia del tejido, no podrían ser analizadas por IF convencional.

En cuanto a las etiquetas metálicas más usadas en este campo, tal y como se recoge en la Introducción General, cabe destacar el empleo de complejos que enlazan metales, como los complejos de Ln (p.ej., DOTA y DTPA), y polímeros que contienen varios complejos quelantes de Ln para aumentar la sensibilidad de la detección (p.ej., MAXPAR®), los cuales permiten la detección múltiparamétrica de biomarcadores en diferentes tejidos biológicos<sup>11,12</sup>. Por otro lado, cabe destacar también el empleo de MNPs casi esféricas de 5 a 50 nm de diámetro<sup>13</sup>, que permiten una elevada amplificación de la señal, aunque se han descrito importantes adsorciones no específicas de las NPs en las muestras, además de que su elevado tamaño puede dificultar la detección del antígeno debido a impedimentos estéricos. En este contexto, los MNCs se presentan como marcas ideales para llevar a cabo el *imaging* en tejidos, puesto que permiten una elevada amplificación de la señal sin comprometer la funcionalidad del Ab (hay cientos de átomos de un mismo metal en un tamaño nanométrico).

Por lo tanto, en este Capítulo II se plantea la obtención de imágenes 2D de la distribución de tres proteínas (MT1/2, CFH y APP) de manera simultánea en la

---

<sup>10</sup> 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, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52.

<sup>11</sup> C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8177–8183.

<sup>12</sup> B. Neumann, S. Hosl, K. Schwab, F. Theuring, N. Jakubowski, Multiplex LA-ICP-MS bio-imaging of brain tissue of a parkinsonian mouse model stained with metal coded affinity-tagged antibodies and coated with indium-spiked commercial inks as internal standards, *J. Neurosci. Methods* 334 (2020) 108591.

<sup>13</sup> M. Tvrdonova, M. Vlcnovska, L.P. Vanickova, V. Kanicky, V. Adam, L. Ascher, N. Jakubowski, M. Vaculovicova, T. Vaculovic, Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 559–564.

misma región de tejido ocular empleando LA-ICP-MS y haciendo uso de las inmunosondas específicas etiquetadas con tres MNCs diferentes. En concreto, se emplean los PtNCs optimizados y evaluados como marcas metálicas en el Capítulo I de la Tesis Doctoral, así como AuNCs y AgNCs que ya han sido evaluados con éxito para el *imaging* de proteínas en secciones de tejidos por nuestro Grupo de investigación<sup>14,15</sup>. La metodología de análisis propuesta se aplica a la localización simultánea de MT1/2, CFH, y APP en diferentes regiones de secciones de tejido ocular de donantes control y donantes con DMAE (en drusas localizadas en el EPR).

---

<sup>14</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* 197, (2019), 413–421.

<sup>15</sup> E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim Acta* 186, (2019), 429.

### E.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es el desarrollo de una metodología para el *imaging* múltiple de tres proteínas relacionadas con la DMAE (MT1/2, CFH y APP) en secciones de tejidos oculares (FFPE) a través de una estrategia de inmunohistoquímica múltiple usando anticuerpos primarios etiquetados con tres MNCs diferentes: AuNCs, AgNCs y PtNCs para su medida por LA-ICP-MS. Este objetivo general se realizará a través de las siguientes etapas experimentales:

- ✓ Estudio de los PtNCs como marcas para su empleo en *bioimaging* de proteínas de tejidos. Bioconjugación de los PtNCs sintetizados en el Capítulo I, a los anticuerpos específicos de las tres proteínas: Anti-h-MT1 y 2, Anti-h-CFH y Anti-h-APP.
  - Evaluación de posibles interacciones inespecíficas con los tejidos biológicos durante los procedimientos de IHC mediante el uso de bloqueantes de los ácidos carboxílicos de los ligandos del recubrimiento del NCs.
- ✓ Síntesis de tres inmunosondas y su caracterización para conocer los factores de amplificación: anti-h-MT1/2:AuNCs, anti-h-CFH:Ag y anti-h-APP:Pt
- ✓ Optimización del método de LA-ICP-MS para obtener *imaging* múltiple con adecuada resolución lateral.
  - Estudio de los métodos de adquisición del ICP-MS de doble enfoque.
  - Evaluación de las condiciones de ablación (temperatura y velocidad de barrido).
- ✓ Obtención de *bioimaging*s múltiples en términos de concentración de las proteínas en estudio en regiones oculares de donantes control y con DMAE empleando una estrategia de IHC múltiple con las tres inmunosondas.

---

## E.3. EXPERIMENTAL

### E.3.1. Materiales y reactivos

#### E.3.1.1. Síntesis y caracterización de las inmunosondas metálicas

Los reactivos y materiales empleados para la síntesis, purificación, y bioconjugación de los MNCs solubles en agua están recogidos en la Sección Experimental General (**Sección C.2.2.1**). Los anticuerpos primarios utilizados para la síntesis de las tres inmunosondas fueron:

- Ab monoclonal de ratón Anti-MT1/2 humano (Anti-h-MT1/2) (Abcam)
- Ab policlonal de conejo Anti-CFH humano (Anti-h-CFH) (Abcam)
- Ab policlonal de conejo Anti-APP humana dominio KPI (Anti-h-APP) (Merck Millipore).

Adicionalmente, se empleó clorhidrato de hidroxilamina ( $\geq 99\%$  de polvo; Sigma-Aldrich) para bloquear los ácidos carboxílicos de los ligandos de los MNCs tras la bioconjugación, con el objetivo de disminuir las reacciones no específicas de los MNCs con las secciones de tejido ocular.

**Inmunoensayo ELISA directo no competitivo.** Los reactivos utilizados para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas son: el estándar de proteína IgG de conejo (Universidad de Oviedo), Ab secundario anti-IgG con HRP contra proteínas de conejo (Sigma-Aldrich), sustrato TMB (Sigma-Aldrich), y ácido sulfúrico (95-97%, Merck Millipore). Paralelamente, para determinar el contenido metálico de las inmunosondas (Pt, Au, y Ag) se utilizó ácido clorhídrico (34-37%, análisis de trazas; VWR chemicals) y ácido nítrico (67-69%, análisis de trazas; VWR chemicals) para la digestión de los MNCs antes de su análisis por ICP-MS.

**Calibrados para Au, Pt, y Ag empleando LA-ICP-MS.** Para determinar la concentración metálica de las inmunosondas (concentración de Au, Pt, y Ag) se prepararon estándares de laboratorio con una matriz similar a la muestra (*i.e. matrix-matched*). Para ello se utilizó polvo de gelatina (VWR chemicals) y disoluciones de

sales inorgánicas de los precursores metálicos de la síntesis de los MNCs (Au, Pt, y Ag).

**Muestras – Secciones de tejidos oculares.** Las muestras empleadas en este Capítulo II son cortes de secciones oculares FFPE, que fueron obtenidos y preparados tal y como se describe en la **Sección C.3** (Experimental General). Las secciones de tejido ocular de 5 y 10  $\mu\text{m}$  de grosor (para los análisis por IF y LA-ICP-MS, respectivamente) de los bloques FFPE se colocaron en portaobjetos de microscopio recubiertos en su superficie de poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences). Las secciones se desparafinaron con xileno (Sigma-Aldrich) y se deshidrataron con etanol absoluto (VWR Chemicals).

**Etapas de IHC con detección fluorescente.** Los reactivos empleados para las ensayos de IHC con detección fluorescente incluyen: cloruro de amonio (Panreac) para minimizar la autofluorescencia de los tejidos (sólo en el procedimiento de validación por IF), tritón X-100 (Sigma-Aldrich) para permeabilizar las secciones de tejido, BSA (polvo al 99%, Merck) y suero de cabra (Sigma-Aldrich) para bloquear las interacciones no específicas, y dihidrocloruro de 4'6-diamidino-2- fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) para teñir los núcleos celulares. Las etapas de lavado se llevaron a cabo con una solución salina tamponada con fosfato (10 mM PBS – 0,9% NaCl, pH 7,4) (Sigma-Aldrich) y un tensoactivo Tween 20 (Sigma-Aldrich). Además, se empleó un medio de montaje (Agilent Technologies) para proteger el tejido y mantener la señal de fluorescencia durante la visualización por microscopía. Como Ab secundario para los inmunoensayos indirectos en los procedimientos de validación se utilizó Alexa Fluor Plus (A32740) consistente en Alexa® 594:IgG anti-conejo de cabra o Alexa Fluor Plus (A32742) consistente en Alexa® 594:IgG anti-ratón de cabra, ambos de Thermo Fisher.

### E.3.2. Instrumentación

En este capítulo, los análisis por LA-ICP-MS se llevaron a cabo con el sistema LSX-213 (@213 nm) acoplado al ICP-MS de doble enfoque Element 2 (Thermo Fisher Scientific) trabajando en modo de baja resolución de masa. Como se describe en la Instrumentación General, la cámara de ablación del sistema láser fue una cámara refrigerada para mantener la temperatura de la muestra constante a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>16</sup>. Los parámetros experimentales aplicados para el análisis LA-ICP-MS se recogen en la **Tabla 8**, tanto para los estudios en los que se obtiene *imaging* individual de una única proteína, como para el *imaging* múltiple (3 proteínas en la misma sección de tejido).

En cuanto a las medidas por fluorescencia y microscopía óptica, se utilizaron un microscopio Leica (DM6000, cámara digital DFC 310 Fx Leica) para obtener imágenes de las secciones de tejido tras los inmunoensayos. El microscopio está equipado con objetivos de 10×, 20×, y 40× y se utilizó un filtro RGB (rojo, verde, azul) para excitar la tinción DAPI ( $\lambda_{\text{ex}}=358$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=461$  nm, emisión azul) y el fluoróforo Alexa® ( $\lambda_{\text{ex}}=594$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=620$  nm, emisión roja). También se obtuvieron imágenes de fase de contraste de los tejidos. Con el fin de ajustar la exposición y la ganancia del microscopio para la adquisición de las imágenes, se analizó primero un control negativo del inmunoensayo (sin adición de Ab primario). Las imágenes de fluorescencia se procesaron con el software Fiji-ImageJ (National Institute of Health). Además, la detección de los ELISA se llevó a cabo con un lector de placas de absorbancia (ELX800; Bio-Tek).

---

<sup>16</sup> I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 88–96.

**Tabla 8:** Condiciones de operación de los sistemas de ablación láser e ICP-MS para el análisis de proteínas en secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS utilizando inmunosondas con MNCs (AuNCs, PtNCs, y AgNCs).

ICP-MS Element II (Thermo Fischer Scientific)		
Parámetros	Imaging individual	Imaging múltiple
RF potencia	1350 W	
Flujo de gas - <i>plasma</i>	16 L·min <sup>-1</sup>	
Flujo de gas - auxiliar	1,15 L·min <sup>-1</sup>	
Flujo de gas de nebulización	0,7 L·min <sup>-1</sup>	
Isótopos monitorizados	<sup>107</sup> Ag o <sup>195</sup> Pt o <sup>197</sup> Au	<sup>107</sup> Ag & <sup>195</sup> Pt & <sup>197</sup> Au
<i>Dwell time</i>	0,01 s	
Ventana de masas	75	
Tiempo de adquisición	0,23 s	1,74 s
Nº de medidas por pico	30	
Resolución	Baja resolución	
Sistema LA LSX-213 (Teledyne Cetac Technologies)		
Diámetro del <i>spot</i>	10 µm	
Energía del láser	1,68 mJ → retina and RPE 2,4 mJ → cuerpos ciliares	
Velocidad de barrido	5 µm·s <sup>-1</sup>	
Frecuencia de repetición	20 Hz	
Modo de ablación	Multi line scan	
Gas de transporte (He)	1,0 L·min <sup>-1</sup>	
Temperatura de la muestra	-20°C	

**Análisis de microarrays de proteínas.** Los análisis de microarrays de las proteínas humanas APP, CFH, y MT1/2 en ojos de donantes *post-mortem* se realizó utilizando la plataforma de array Illumina BeadChip (HumanHT-12 v4.0 Expression BeadChip Kit). El marcaje de ARNc y la hibridación al chip y el análisis de los datos del array se realizaron en la Plataforma de Análisis Genómico (CIC bioGUNE, Derio).

**Inmunofluorescencia.** Las imágenes obtenidas tras el IHC con detección fluorescente para el estudio de penetración del Ab en el tejido (estudio de la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs) fueron llevadas a cabo con el microscopio láser confocal (TCS-SP8X; Leica) usando el objetivo de inmersión en aceite de 40× y utilizando un fotomultiplicador y un detector híbrido. Las mediciones del bioconjugado y el DAPI se realizaron con una línea de excitación de luz de diodo fija a 405 nm.

### **E.3.3. Procedimientos experimentales**

#### **E.3.3.1. Síntesis de los MNCs (PtNCs, AuNCs, y AgNCs)**

Los protocolos llevados a cabo para la síntesis de los tres MNCs tiolados solubles en agua siguen una estrategia *bottom-up* por reducción química del metal mediante el empleo de borohidruro de sodio (ver sección Experimental donde están recogidos los tres protocolos). Para la síntesis de los PtNCs el protocolo seguido es el descrito con detalle en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral, los AuNCs fueron sintetizados siguiendo el protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.<sup>14</sup>, y los AgNCs siguiendo el protocolo descrito por Valencia et al.<sup>15</sup>. Los MNCs fueron purificados por ultracentrifugación utilizando unidades de filtro Amicon de 3 kDa de tamaño de poro y posteriormente fueron llevados a volumen inicial con disoluciones tampón adecuadas para realizar la bioconjugación a los anticuerpos específicos: tampón PBS para PtNCs y AuNCs, y TRIS-EDTA para AgNCs. Las caracterizaciones de cada tipo de MNC fueron realizadas mediante medidas de fluorescencia, HR-TEM e ICP-MS.

#### **E.3.3.2. Síntesis y bloqueo de las inmunosondas metálicas**

Inicialmente, el etiquetado de los anticuerpos primarios específicos (Anti-h-MT1/2, Anti-h-CFH, y Anti-h-APP) se llevó a cabo con los PtNCs a fin de evaluar las capacidades de las nuevas nanoestructuras sintetizadas. Para ello se estudian las distribuciones individuales de cada una de las proteínas en tres secciones de tejido ocular consecutivas del mismo donante siguiendo la señal del platino. La bioconjugación de los PtNCs a cada uno de los anticuerpos primarios (todos ellos tipo IgG,

150 kDa) se realizó siguiendo la reacción de la carbodiimida y empleando la relación molar Ab:PtNCs optimizada en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral (relación molar 1:20 Ab:PtNCs en la disolución de síntesis). Para ello, se mezclaron 198  $\mu\text{L}$  de la disolución de PtNCs (en tampón PBS) con 100  $\mu\text{L}$  de cada Ab primario ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A continuación, se inició la agitación mecánica en el vórtex y se añadieron los reactivos para llevar a cabo el enlace amida entre el ácido carboxílico del ligando tiolado (AL) y la amina primaria del Ab (proporción molar 1:1500:1500 Ab:EDC:NHS). Tras 2 h de agitación en vórtex a temperatura ambiente, se procedió a la purificación por ultrafiltración (Amicon de 100 kDa de tamaño de poro), eliminando así el exceso de PtNCs no conjugados.

Además, para evitar interacciones inespecíficas entre los PtNCs y los tejidos biológicos, fue necesario una última etapa de bloqueo de los grupos carboxílicos libres (que recubren la nanoestructura). Para ello, se añadió una amina primaria (hidroxilamina) a las soluciones de las inmunosondas marcadas purificadas con una proporción molar de 1:50 PtNCs:hidroxilamina. Tras 2 h de agitación, las disoluciones que contienen las inmunosondas metálicas bloqueadas, se vuelven a purificar por ultrafiltración (utilizando Amicon de 100 kDa de tamaño de poro). Las inmunosondas purificadas (Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) se almacenaron por separado en tampón PBS a 4 °C (a una concentración de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , referida al Ab).

Para el análisis múltiple simultáneo (*imaging* múltiple) de MT1/2, CFH, y APP en la misma sección de tejido, cada Ab se marcó con un tipo diferente de MNCs (AuNCs como etiqueta de Anti-h-MT1/2, AgNCs como etiqueta de Anti-h-CFH, y PtNCs como etiqueta de Anti-h-APP), siguiendo un protocolo similar al descrito previamente para los PtNCs (se emplearon relaciones molares de Ab:MNCs de 1:3 para AuNCs, 1:3 para AgNCs, y 1:20 para PtNCs). En cuanto a la etapa de bloqueo con hidroxilamina, se utilizó una relación molar de 1:50 Ab:MNCs para los AuNCs y PtNCs, mientras que para los AgNCs se seleccionó una relación molar de 1:20. Por último, las suspensiones de las inmunosondas marcadas con MNCs purificadas se

---

añadieron en el mismo tubo Eppendorf y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior (a concentración de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  referida al Ab).

### **E.3.3.3. Caracterización de las inmunosondas**

Para obtener el *imaging* de las proteínas por LA-ICP-MS con MNCs como etiquetas, las inmunosondas marcadas deben ser caracterizadas para conocer sus factores de amplificación. Para ello, se debe calcular tanto la concentración de Ab disponible para el reconocimiento como la concentración de metal en cada una de las inmunosondas. Así, para los tres MNCs empleados se realizó un procedimiento similar al descrito por Cruz-Alonso et al.<sup>17</sup> para los AuNCs. Para la caracterización de las inmunosondas, fueron necesarios dos tipos de experimentos. Por un lado, se utilizó un ELISA directo con un estándar de proteína IgG de conejo (producido con una concentración conocida en la unidad de "Biotecnología y cultivos celulares" de los SCTs de la Universidad de Oviedo) a fin de determinar la concentración disponible de Ab en las inmunosondas. Por otro lado, las inmunosondas marcadas fueron digeridas con agua regia (PtNCs y AuNCs) o ácido nítrico (AgNCs) durante 20 min en un baño de ultrasonidos y posteriormente diluidas en ácido nítrico al 2% para determinar la concentración de metal por inmunosonda mediante análisis por ICP-MS (nebulización convencional).

### **E.3.3.4. Protocolos para los inmunoensayos en tejidos empleando las inmunosondas marcadas con MNCs o fluoróforos**

Los tejidos (secciones de 10  $\mu\text{m}$  o 5  $\mu\text{m}$  de espesor para análisis por MS o fluorescencia, respectivamente) previamente depositados en los portaobjetos de microscopio se deben desparafinar para proceder a la etapa de IHC. El protocolo de desparafinación e rehidratación de los cortes se recoge en la **Sección C.4.6**. Tras

---

<sup>17</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Anal Chem.* 90, (2018), 12145–12151.

lavar los cortes tres veces (3x10 min) con PBS 1x, estos estarían listos para llevar a cabo las etapas del inmunoensayo para la detección de las proteínas diana.

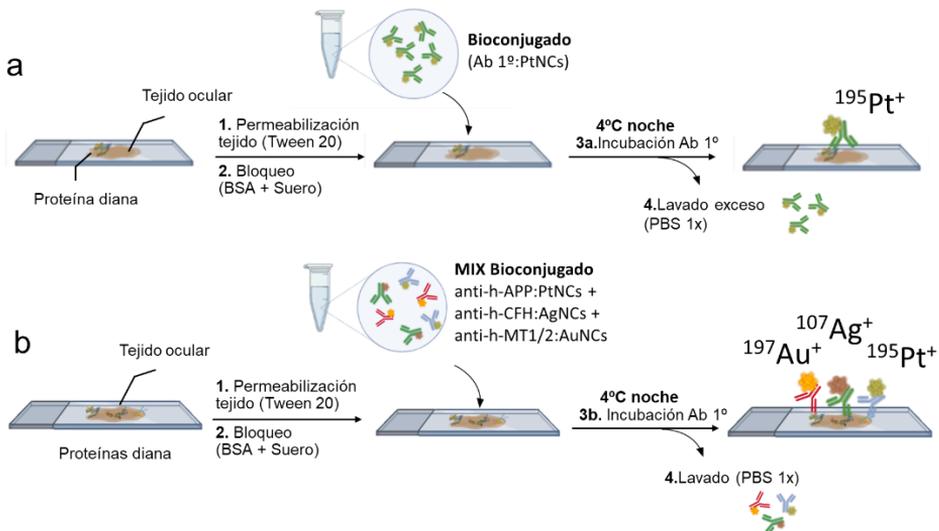
**Protocolo de IHC con detección por LA-ICP-MS.** En la **Figura 48** se muestran las etapas que se llevan a cabo en el inmunoensayo para la detección por LA-ICP-MS, tanto para la determinación de una única proteína como para el caso de tres proteínas (parte superior e inferior de la imagen, respectivamente). De manera resumida las etapas necesarias están recogidas a continuación. Comentar que el volumen añadido de cada disolución en las diferentes etapas es 500  $\mu\text{L}$ , volumen suficiente para asegurar que toda la superficie del corte tisular esté cubierta. Además, tras el tiempo requerido de incubación en cada etapa, el líquido se retira siempre por decantación y se seca con papel de filtro con la precaución de no tocar el tejido:

- (1) Permeabilización del tejido: se añade una disolución de Tritón X-100 al 0,1% en PBS 1x durante 5 min. Se lava el tejido 3 veces con PBS 1x (3 x 10 min).
- (2) Bloqueo: se incuba el tejido durante 30 min a temperatura ambiente con una disolución de BSA al 0,1% y suero de cabra al 10% en PBS 1x.
- (3) Incubación de la inmunosonda a 4°C en una cámara humidificada toda la noche (15 horas): las inmunosondas se diluyen hasta la concentración de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (concentración de Ab) en una disolución de PBS con 0,1 % de BSA y 10% de suero de cabra.
  - a. *Imaging individual* (**Figura 48a**): se emplean los PtNCs como marca para generar tres inmunosondas específicas (Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) para la identificación de MT1/2, CFH, y APP, respectivamente, de manera independiente en tres secciones de tejido ocular diferentes.
  - b. *Imaging múltiple* (**Figura 48b**): se emplean los tres MNCs como etiquetas para generar las tres inmunosondas específicas (Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) para la detección de MT1/2, CFH, y APP, respectivamente. Se

añade a una misma sección de tejido una disolución que contiene las tres inmunosondas marcadas.

- (4) Etapa de lavado: se realizan cinco etapas de lavado con PBS de tiempos cortos (2, 5, 10, 5, 2 min respectivamente) para favorecer la eliminación de las inmunosondas añadidas en exceso y/o posibles interacciones inespecíficas con el tejido.
- (5) Almacenamiento de las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis por LA-ICP-MS.

Las imágenes 2D para visualizar la distribución de las proteínas se construyeron siguiendo las señales de intensidad para el isótopo  $^{195}\text{Pt}^{+}$  en el caso del *imaging* individual y con los isótopos  $^{107}\text{Au}^{+}$ ,  $^{195}\text{Pt}^{+}$ , y  $^{107}\text{Ag}^{+}$  para el *imaging* múltiple.



**Figura 48:** Esquema del protocolo IHC empleado con las inmunosondas metálicas para detección de las proteínas de interés por LA-ICP-MS (se monitorizan las señales  $^{195}\text{Pt}^{+}$ ,  $^{197}\text{Au}^{+}$  y  $^{107}\text{Ag}^{+}$ ). a) *Imaging* individual empleando los PtNCs bioconjugados a cada uno de los anticuerpos primarios, y b) *Imaging* múltiple empleando AuNCs, AgNCs, y PtNCs para crear tres inmunosondas independientes para cada proteína (Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs).

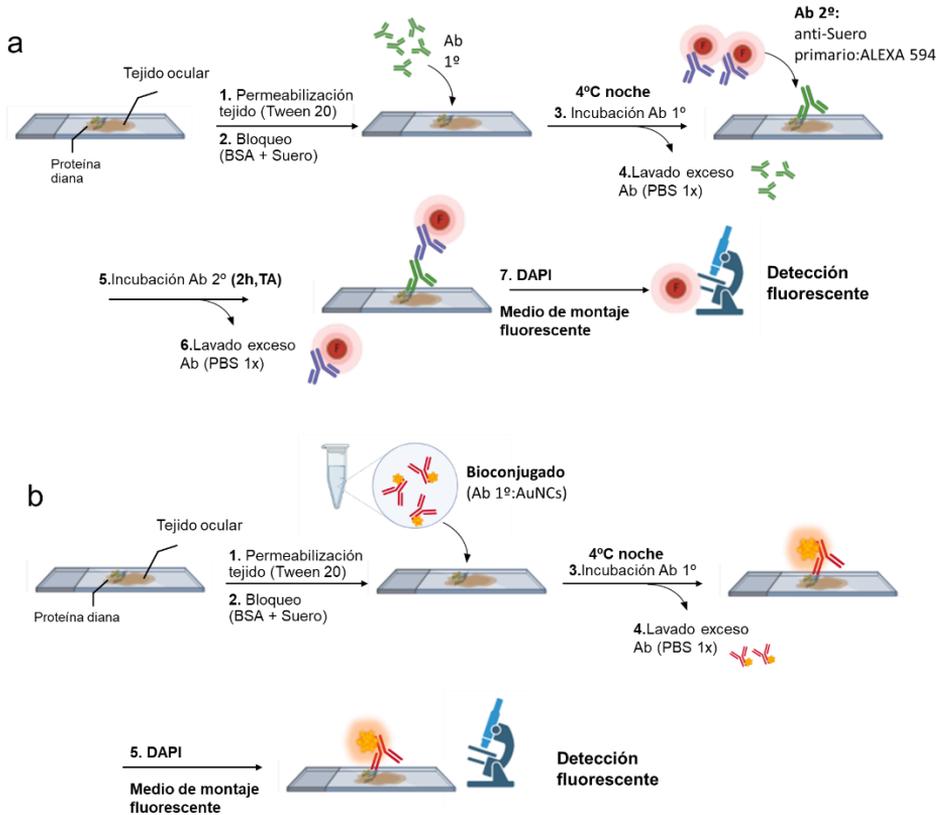
### Protocolo de IHC con detección fluorescente empleando un fluoróforo.

Para validar la distribución de las proteínas estudiadas en las secciones de tejido ocular mediante la metodología de análisis propuesta por LA-ICP-MS utilizando los

MNCs como etiqueta, se realizó un protocolo de IF con Alexa® 594 como etiqueta de un anticuerpo secundario. En la **Figura 49a** se muestra el protocolo seguido para realizar el *imaging* de una proteína por detección fluorescente debida a la emisión de un fluoróforo convencional. Tras la desparafinación de los cortes de FFPE y los correspondientes lavados con PBS (3 x 10 min), el tejido debe ser tratado con una disolución de NH<sub>4</sub>Cl 0,5 M en PBS con BSA al 0,1 % para disminuir la autofluorescencia (15 min). Se llevan a cabo 3 lavados con PBS 1x (3 x 10 min), y a continuación se procede a las etapas de permeabilización **(1)** y bloqueo **(2)** añadiendo las mismas disoluciones y aplicando los mismos tiempos que los descritos en el protocolo para detección por LA-ICP-MS.

- (3)** Incubación del Ab 1º: se añadieron de manera independiente (i.e., en tres secciones de tejido consecutivas (tejidos de 5 µm de grosor de un mismo donante) 20 µg·mL<sup>-1</sup> del Ab primario: Anti-h-CFH, Anti-h-APP o Anti-h-MT1/2 sin bioconjugar, y se incubaron durante toda la noche a 4°C (15 h).
- (4)** Etapa de lavado: 3 lavados de 10 min con disolución de PBS 1x-BSA al 0,1%.
- (5)** Incubación Ab 2º marcado con fluoróforo: se añadió el correspondiente Alexa® 594 (diluido 1:500 en un tampón PBS que contenía 0,1% de BSA + 10% de suero de cabra) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 h.
- (6)** Etapa de lavado: 3 x 10 min con PBS 1x
- (7)** Tinción de los núcleos celulares: se incuban los tejidos con una solución de DAPI durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
- (8)** Etapa de lavado y montaje para detección por fluorescencia: se lava 3 x 10 min con PBS 1x, se seca con cuidado el tejido con un papel de filtro (sin tocar el tejido) y se añade una gota de medio de montaje de fluorescencia (Dako) sobre la superficie tisular. Se coloca finalmente el cubreobjetos sobre el medio y se deja secar durante 1 h.
- (9)** Almacenaje: se guarda a -20°C hasta su análisis por fluorescencia.

La detección se lleva a cabo mediante microscopía láser confocal ( $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm para DAPI y 595 nm para el fluoróforo).



**Figura 49:** Esquema del protocolo de IHC seguido con los tejidos oculares para la detección fluorescente de las proteínas. a) Empleando un fluoróforo Alexa® 594, y b) Empleando la inmunosonda Anti-b-MT1/2:AuNCs donde se realiza la detección directa de la fluorescencia de los AuNCs. TA = temperatura ambiente.

**Protocolo de IHC con detección fluorescente empleando MNCs como marca.** Teniendo en cuenta las propiedades luminiscentes de los MNCs, también se puede llevar a cabo una detección fluorescente. De este modo también se realizaron estudios donde se empleó detección por fluorescencia siguiendo la emisión de la marca (como prueba de concepto se aplicaron los AuNCs). En concreto, este protocolo se utilizó para llevar a cabo el estudio de la penetración de las inmunosondas en las secciones de tejido de 10  $\mu\text{m}$ . Las etapas del ensayo se resumen en la **Figura 49b**

y son similares a las descritas en el apartado anterior (Protocolo IHC con detección fluorescente empleando fluoróforo Alexa®). Sin embargo, en este caso se produce una detección directa de la fluorescencia donde el Ab primario (Anti-h-MT1/2) es etiquetado con los AuNCs (i.e., el Ab secundario marcado con el fluoróforo Alexa® 594 no es necesario). Las demás etapas son las mismas que se describen en la **Figura 49a**. La detección se lleva a cabo mediante microscopía láser confocal ( $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$  tanto para DAPI como para los AuNCs).

### E.3.3.5. *Imaging* de proteínas en secciones de tejido ocular mediante LA-ICP-MS

Para llevar a cabo los análisis de los tejidos empleando LA-ICP-MS, tanto el sistema láser como el ICP-MS deben ser optimizados diariamente. La puesta a punto del ICP-MS se realizó utilizando una disolución multielemental de  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para conseguir una intensidad máxima de la señal y una baja formación de óxidos ( $\text{ThO}^+/\text{Th}^+$ ). Por otra parte, para la optimización del sistema LA-ICP-MS se realizó el análisis de vidrio SRM NIST 612, asegurando la máxima intensidad de señal, una buena estabilidad (desviación estándar relativa  $< 4\%$ ), una relación  $^{238}\text{U}^+ / ^{232}\text{Th}^+ \sim 1$ , y una relación  $\text{ThO}^+/\text{Th}^+$  inferior al 2%. A continuación, se optimizaron las condiciones de medida con los tejidos oculares, garantizando una ablación completa del espesor total del tejido (escaneo múltiple línea por línea), así como una buena resolución lateral y sensibilidad. En la **Tabla 8** se recogen las condiciones de análisis optimizadas.

Por otra parte, para determinar la distribución cuantitativa de los metales de los MNCs usados como marcas (Pt, Au, y Ag) en las secciones de tejido por LA-ICP-MS se realizó una estrategia de calibración basada en el empleo de patrones de calibración *matrix-matched*. En este caso se utilizaron estándares de gelatina elaborados en el laboratorio y suplementados con los metales de interés ( $0\text{-}25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de Pt, Au, y Ag), los cuales fueron analizados por LA-ICP-MS a las mismas condiciones optimizadas para las muestras. Las gelatinas suplementadas con los metales se midieron

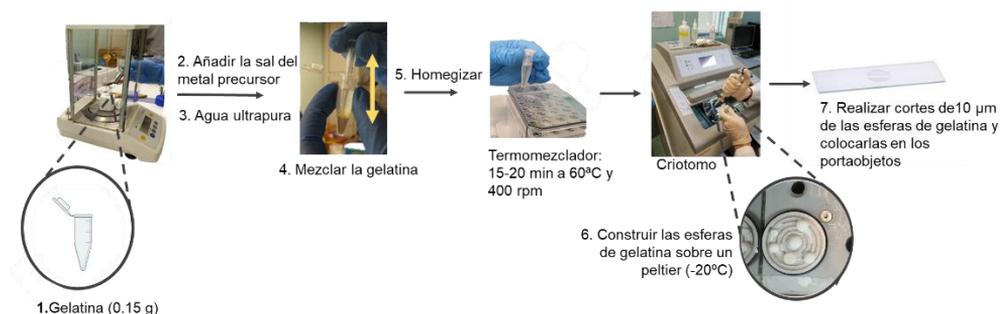
diariamente, antes y después de los tejidos oculares para compensar los posibles efectos de deriva del instrumento LA-ICP-MS, así como para realizar las curvas de calibrado y poder determinar la concentración de las marcas.

Las imágenes 2D con la distribución de las tres proteínas (MT1/2, CFH, y APP) a lo largo de las estructuras oculares analizadas con LA-ICP-MS se construyeron empleando el software Fiji-ImageJ. A fin de trabajar en intensidades netas para cada isótopo (cuentas por segundo, cps), durante el tratamiento de los datos, se eliminó la contribución del blanco de gas (30 primeros segundos de adquisición). Finalmente, las intensidades de cada metal pudieron ser transformadas en concentración de proteína conociendo las estequiometrías de las inmunosondas (i.e., número de átomos de metal por Ab específico). El protocolo llevado a cabo para la caracterización de las inmunosondas se recoge en la Sección Experimental General (C.4.5).

#### □ Preparación de los patrones de gelatina para los análisis por LA-ICP-MS

En la **Figura 50** se detalla el protocolo experimental llevado a cabo para la producción de las gelatinas empleadas como patrones de calibración *matrix-matched* ( $0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a  $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) para determinar la concentración de Pt, Au, y Ag en las secciones de tejidos. Para ello, se pesaron 0,15 g de gelatina (15% en peso de gelatina) en un tubo Eppendorf y se añadieron diferentes volúmenes de una disolución acuosa previamente preparada de las sales precursoras ( $\text{NaAuCl}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ , y  $\text{AgNO}_3$ ) para obtener la concentración de metal final deseada (etapas 1, 2, y 3 de la **Figura 50**). A continuación, se mezcló lenta y cuidadosamente con una punta de plástico (Etapa 4) y se llevó a un termomezclador a  $60^\circ\text{C}$  durante 20 min para completar su homogenización (Etapa 5). Finalmente, para generar esferas de gelatina homogéneas, se cogieron  $500 \mu\text{L}$  de cada disolución y se depositaron lentamente en la superficie de la herramienta Peltier dentro del criostato (Microm HMSSO, Thermo Fisher Scientific) a  $-20^\circ\text{C}$  donde se construyeron las pequeñas esferas (Etapa 6). A continuación, las esferas criogénicas se cortaron con la cuchilla del criotomo y las secciones ( $10 \mu\text{m}$  de grosor al igual que los tejidos oculares) se colocaron en portaobjetos de microscopio

recubiertos con poli-L-Lisina. Finalmente, se almacenaron en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso para las medidas por LA-ICP-MS.



**Figura 50:** Protocolo llevado a cabo para preparar los patrones de gelatina para realizar la calibración por LA-ICP-MS. La gelatina es suplementada con los metales (Au, Pt y Ag) que ha sido empleados como marcas en las inmunosondas con MNCs.

Una vez preparadas las gelatinas, estas deben ser caracterizadas, es decir, se debe determinar su contenido metálico para poder emplearlas como patrones en los análisis por LA-ICP-MS. Se utilizó el ICP-MS con nebulización convencional para cuantificar la concentración de Au, Ag y Pt en cada patrón de gelatina utilizando una calibración externa con patrones inorgánicos ácidos de Au, Ag y Pt, y empleando Ir o Rh como patrón interno. Las gelatinas deben ser mineralizadas mediante una digestión ácida: 0,5 g de esfera de gelatina se digirieron añadiendo 2 mL de  $\text{HNO}_3$  (65% ultra trace) y  $400\ \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% p/p, Merck) asistidos por un baño de ultrasonidos (JP selecta SA) durante 15 min.

## E.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Capítulo I se describió la síntesis de PtNCs empleados para la determinación de IgE en muestras de suero humano utilizando ICP-MS con nebulización convencional. Es decir, se ha utilizado una inmunosonda metálica (PtNCs) para determinar la concentración promedio de una proteína en un fluido. En este Capítulo II se propone el uso de varios MNCs como marcas para la detección de tres proteínas de manera simultánea en secciones de tejidos biológicos. El uso de estas marcas para estudios de *imaging* en tejido plantea varios retos, como son las posibles uniones inespecíficas de los MNCs al tejido, y el obtener una buena resolución espacial para evaluar la distribución de las proteínas en las estructuras de las muestras por LA-ICP-MS. Los AuNCs y AgNCs empleados en este Capítulo II ya han sido aplicados con éxito como marcas para el *imaging* de proteínas en nuestro Grupo de investigación<sup>17,18</sup>, por lo que inicialmente se plantea un estudio más exhaustivo con los PtNCs por no haber sido todavía aplicados en análisis por LA-ICP-MS. De esta manera, primero se recogen los estudios por IHC y LA-ICP-MS con los PtNCs como marca elemental para la inmunolocalización de una única proteína, si bien finalmente se emplean los tres tipos de MNCs para la determinación simultánea de tres proteínas (MT1/2, CFH, y APP) en las secciones de tejidos oculares.

### E.4.1. Optimización de los procedimientos de bioconjugación e IHC utilizando PtNCs como marca

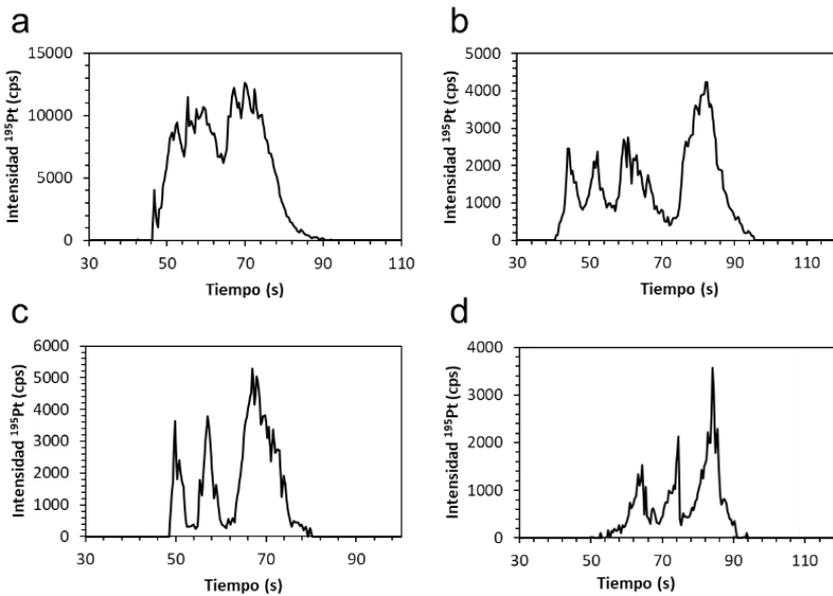
A la hora de aplicar los PtNCs (y en general, los MNCs) como etiquetas para llevar a cabo *imaging* en tejidos biológicos, resulta ventajoso el bloqueo de los ácidos carboxílicos libres (grupo externo de los ligandos que protegen los MNCs) tras la síntesis de la inmunosonda. Se sabe que los ácidos carboxílicos pueden generar adsorciones inespecíficas de los MNCs al tejido, de hecho, ya han sido evaluados por

---

<sup>18</sup> E. Valencia, B. Fernández, M. Cruz-Alonso, M. García, H. González-Iglesias, M.T. Fernández-Abedul, R. Pereiro. Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters, J Anal At Spectrom. 35, (2020), 1868-1879.

otros autores en aplicaciones de tejidos oculares y de cerebro<sup>14,17,17</sup>. Así mismo, se demostró con éxito que las aminas primarias, como la hidroxilamina, bloquean los grupos carboxílicos de las AuNCs y AgNCs, disminuyendo estas adsorciones inespecíficas al tejido y permitiendo la obtención de imágenes fiables y reproducibles.

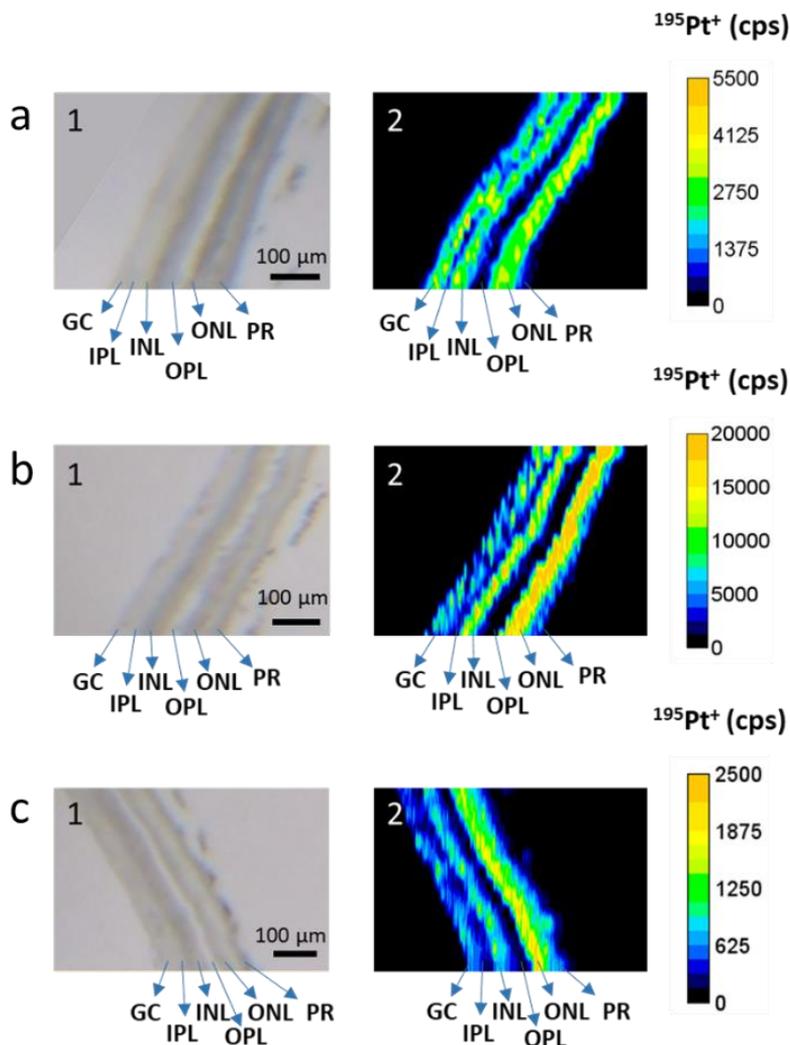
Partiendo de los estudios previos existentes para AuNCs y AgNCs, se estudiaron varias relaciones molares PtNCs:hidroxilamina (1:100, 1:50, y 1:20) tras la síntesis de la inmunosonda Anti-h-APP:PtNCs. Para elegir la concentración de hidroxilamina necesaria para disminuir eficazmente las interacciones inespecíficas de los PtNCs con el tejido, se estudió la inmunolocalización de la proteína APP en la región de la retina de tres tejidos oculares consecutivos, incubándose con cada uno de ellos la inmunosonda con diferentes bloqueos con hidroxilamina (PtNCs:hidroxilamina 1:100, 1:50, y 1:20). Además, también se estudió un tejido en el que se emplea la inmunosonda sin bloqueo con hidroxilamina. La **Figura 51** muestra el perfil de una línea de ablación obtenido por LA-ICP-MS para la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$  (proteína APP) a lo largo de las diferentes capas de la retina neurosensorial utilizando unas relaciones molares PtNCs:hidroxilamina de 1:0 (sin bloqueo), 1:20, 1:50, y 1:100 (**Figura 51a**, **51b**, **51c** y **51d**, respectivamente). En general, se puede observar cómo al disminuir la relación molar entre los PtNCs y la amina primaria, tanto la intensidad de la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$  como la unión inespecífica aumentaron, dando lugar a un perfil de  $^{195}\text{Pt}^+$  casi continuo en el que no es posible distinguir entre las diferentes capas de la retina (**Figura 51a**). Los resultados mostraron que la relación molar 1:50 permitía diferenciar la distribución de APP entre las diferentes capas, a la vez que se mantenía una elevada sensibilidad para la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$ . Por lo tanto, esta fue la relación molar empleada para todos los experimentos posteriores con los PtNCs.



**Figura 51:** Perfil obtenido para la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$  en el análisis por LA-ICP-MS de una línea de ablación a lo largo de las capas de la retina en secciones consecutivas de tejido ocular humano control tras el protocolo de IHC empleando la inmunosonda Anti-h-APP:PtNCs y utilizando diferentes relaciones molares PtNCs:hidroxilamina: a) 1:0, b) 1:20, c) 1:50, y d) 1:100.

#### E.4.2. *Imaging* de proteínas en tejidos oculares por LA-ICP-MS empleando PtNCs como marca elemental

Una vez seleccionada la relación molar adecuada para el bloqueo de los PtNCs, se procedió a la síntesis de las inmunosondas para las tres proteínas de interés (i.e., Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) con el objetivo de estudiar la distribución de las proteínas en diferentes zonas de los tejidos oculares siguiendo para todas ellas la señal del  $^{197}\text{Pt}^+$  (procedente de la etiqueta metálica). Aplicando las condiciones experimentales de LA-ICP-MS descritas en la **Tabla 8** (condiciones del *imaging* individual) se obtuvieron las distribuciones cualitativas individuales de las tres proteínas en la región de la retina neurosensorial. En las **Figura 52a, b, y c** se muestran respectivamente las distribuciones cualitativas de MT1/2, CFH, y APP obtenidas por LA-ICP-MS siguiendo la intensidad de la señal de  $^{195}\text{Pt}^+$ .



**Figura 52:** Distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las capas de la retina en tres secciones consecutivas de tejido ocular humano de un donante control empleando los PtNCs como etiqueta en la inmunosonda y detección por LA-ICP-MS. La columna 1 muestra en todos los casos las imágenes ópticas de la región analizada obtenidas con la cámara del sistema láser. La columna 2 muestra la imagen elemental de  $^{195}\text{Pt}^+$  (señal de intensidad en cps) obtenida por LA-ICP-MS para la detección individual de tres proteínas (14 líneas ablación): a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. Abreviaturas, GC: células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; OPL: capa plexiforme externa; PR: fotorreceptores.

En el caso de la MT1/2, la distribución obtenida para la proteína siguiendo la señal del  $^{195}\text{Pt}^+$  (**Figura 52a**) fue comparada con las imágenes obtenidas en trabajos

previos en los que se emplearon AuNCs<sup>19</sup> y AgNCs<sup>17</sup> como etiquetas metálicas. De acuerdo con los estudios previos, la MT1/2 fue localizada en la capa nuclear externa (ONL), capa nuclear interna (INL) y células ganglionares (GC), con menor presencia en las capas plexiforme interna y externa (IPL u OPL, respectivamente). En el caso de la CFH y APP, estas proteínas no habían sido estudiadas previamente con inmunosondas marcadas con MNCs. Para la CFH, el *imaging* por LA-ICP-MS mostró que se localiza principalmente en la ONL y en el segmento externo de los fotorreceptores (PR), así como en la INL, con una distribución cualitativamente menor en el GC (**Figura 52b**). En el caso de la APP (**Figura 52c**), se encuentra principalmente en la ONL, con una menor presencia en la INL y el GC, de forma similar a lo observado para MT1/2 y APP. Cabe mencionar que la ausencia de expresión de las proteínas en el IPL y el OPL debe considerarse con cautela, ya que no se puede descartar pérdida de algunos tejidos o estructuras celulares durante el procesamiento de las muestras.

Para el caso de CFH y APP, las distribuciones obtenidas por LA-ICP-MS fueron validadas llevando a cabo las IHC empleando un Ab secundario marcado con Alexa® 594 para la inmunolocalización fluorescente. Los resultados experimentales obtenidos, que confirman la distribución obtenida por LA-ICP-MS, se recogen en el siguiente Sección.

### **E.4.3. Microarrays de expresión de las proteínas y estudios por inmunofluorescencia empleando Fluor Alexa®**

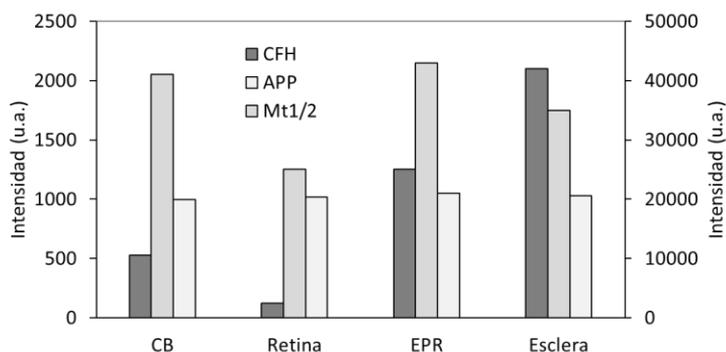
Con el objetivo de comprobar las localizaciones obtenidas empleando los PtNCs como marcas elementales y detección por LA-ICP-MS para la MT1/2, CFH, y APP, se llevaron a cabo otros dos tipos de estudios: (1) Análisis de *microarrays* de

---

<sup>19</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Álvarez, H. González-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Peireiro, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags, *Microchim. Acta* 185 (2018) 64.

expresión de los genes que codifican las proteínas diana en diferentes regiones oculares, y (2) IHC convencional por IF para la validación de las distribuciones empleando un Ab secundario marcado con fluoróforo Alexa® 594.

En primer lugar, según los resultados obtenidos para el análisis de microarrays (**Figura 53**), las isoformas MT1/2 se expresan de manera elevada en la retina neurosensorial, seguidas de la APP, mientras que los niveles de expresión de CFH en la retina son mucho menores. Además de la retina, se estudió la expresión de los genes en otras tres regiones de los tejidos oculares: CB, EPR y esclera. La expresión de la CFH es menor comparada con la APP y MT1/2 en CB, retina y EPR, a excepción de la esclera donde su expresión es más elevada. Como se extrae de los análisis realizados, la expresión de los genes puede variar significativamente dependiendo de la proteína, así como de la región del ojo.

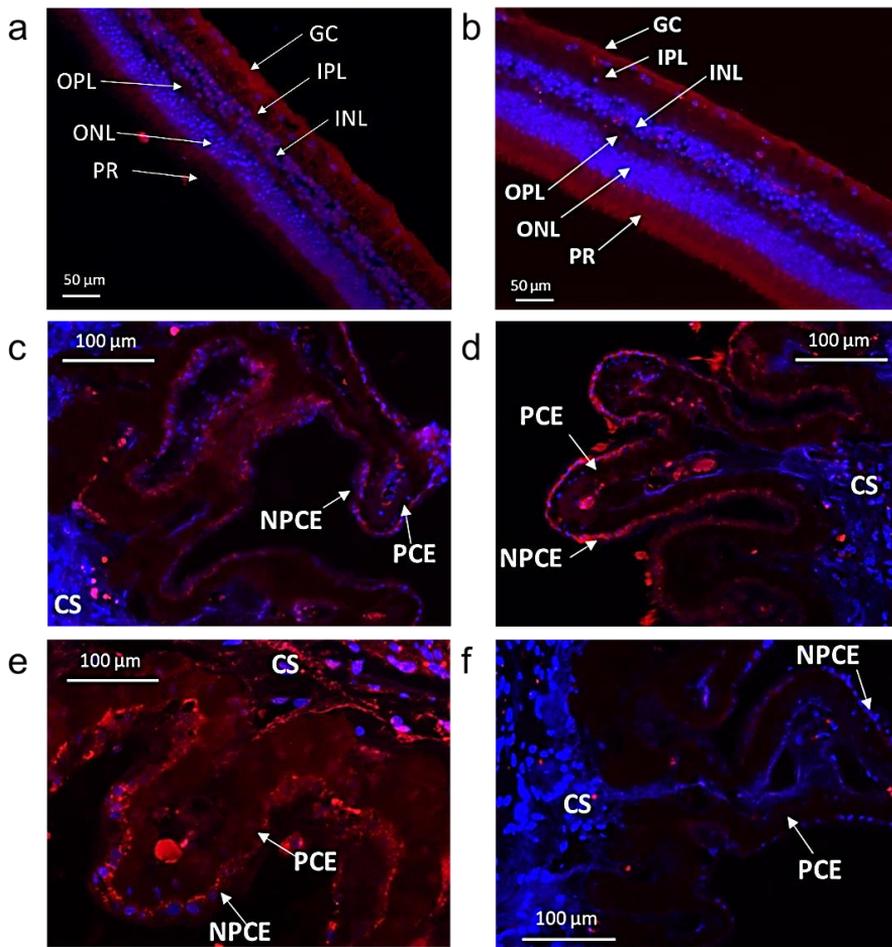


**Figura 53:** Perfil de expresión génica de las isoformas MT1/2 (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M Y MT1X, y MT2A), CFH, y APP en diferentes regiones de tejidos oculares humanos [cuerpo ciliar (CB), retina, EPR, y esclera]. La señal de hibridación relativa obtenida para cada gen se normalizó con los controles internos y se expresó como unidades arbitrarias (u.a.). La barra de escala de MT1/2 corresponde al eje secundario.

Por otro lado, se validaron las distribuciones observadas para la CFH y APP en la retina neurosensorial empleando IF convencional utilizando Alexa® 594 (en el caso de la MT1/2 se confirmaron los resultados obtenidos con trabajos previamente publicados<sup>19</sup>). Aunque la detección por fluorescencia sólo permite un análisis cualitativo, la distribución de las proteínas a lo largo de las estructuras micrométricas (e incluso submicrométricas) de los tejidos oculares puede identificarse fácilmente en

las imágenes obtenidas. La **Figura 54** muestra las imágenes mediante microscopía de epifluorescencia para la CFH y APP (**Figura 54a** y **Figura 54b**, respectivamente) en la región de la retina de las secciones de tejido ocular, las cuales son consecutivas a las empleadas para los análisis por LA-ICP-MS. En ambos casos se observó una correlación en la localización de las proteínas a lo largo de las capas neurosensoriales de la retina mediante LA-ICP-MS e inmunofluorescencia. Adicionalmente, en las **Figura 54c-f** se muestran las imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de los procesos ciliares mediante IF convencional, mostrando una inmunolocalización celular específica preferente de CFH en el epitelio ciliar no pigmentado (NPCE), con ausencia de tinción en el epitelio ciliar pigmentado (PCE) y el estroma ciliar (CS). Sin embargo, la distribución de la APP presenta baja intensidad (poca acumulación de proteína), aunque se observó una ligera tinción en el NPCE, mientras que MT1/2 está presente con mayor acumulación (mayor intensidad) en el NPCE y el CS. Hay que destacar que la autofluorescencia del PCE puede superponerse a cualquier señal existente (lo cual es una limitación intrínseca de la microscopía de fluorescencia), dificultando la distinción de la localización correcta de las proteínas en dicha región.

La inmunolocalización obtenida por fluorescencia para la MT1/2, CFH y APP en los cuerpos ciliares, se empleó como validación a las distribuciones obtenidas mediante LA-ICP-MS en esta región (detallado posteriormente en la **Sección E.4.4**).



**Figura 54:** Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia para MT1/2, APP, y CFH en diferentes regiones de tejidos oculares humanos (donante control) donde se ha llevado a cabo IHC empleando anticuerpos secundarios de cada suero primario marcados con Alexa® 594 (emisión roja) y tinción DAPI de los núcleos celulares (emisión azul). Las imágenes a) y b) muestran la región de la retina neurosensorial, mientras que las imágenes c-f muestran la zona de los cuerpos ciliares (zona pars plicata). a) CFH, b) APP, c) APP, d) CFH, e) MT1/2, y f) Control negativo donde se ven zonas con autofluorescencia (zonas pigmentadas). Abreviaturas, CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado.

De acuerdo con los datos obtenidos por microarray (**Figura 53**), que muestran una baja expresión de CFH en la retina, podría resultar extraño la elevada señal obtenida por IF para la CFH en los tejidos oculares. Los niveles de expresión más altos de CFH observados en la retina neurosensorial por IF podrían indicar la existencia de uniones inespecíficas del Ab primario empleado en el tejido. En la actualidad los trabajos publicados que estudian la localización por IHC de CFH en la retina

humana son limitados. La presencia de CFH en la retina neurosensorial fue confirmada mediante estudios por *western blot*<sup>20</sup>, y recientemente Bhutto et al.<sup>21</sup> encontraron una tinción negativa para la CFH en la retina neurosensorial. Por otra parte, estudios previos mostraron también una elevada expresión de CFH en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores humanos y en la capa de células ganglionares<sup>22</sup>. Por lo tanto, toda esta información previa avala los resultados obtenidos, si bien es cierto que no se puede descartar la limitación inherente a la especificidad del Ab de la CFH empleado en los experimentos. En futuros estudios se debería abordar el uso de otros anticuerpos alternativos para confirmar la localización de la CFH. En cualquier caso, aun teniendo en cuenta estas limitaciones, la validación de la metodología analítica propuesta por LA-ICP-MS no se ve comprometida, ya que se obtuvieron resultados similares utilizando este Ab particular por IF y LA-ICP-MS.

#### **E.4.4. Optimización de las condiciones para el *imaging* múltiple de proteínas por LA-ICP-MS**

A continuación, se llevó a cabo la optimización de las condiciones experimentales para el análisis simultáneo de tres proteínas por LA-ICP-MS. Para ello, se utilizaron los tres MNCs como etiquetas: PtNCs, AgNCs y AuNCs. Para lograr imágenes de distribuciones simultáneas de las tres proteínas con elevada resolución lateral fueron necesarios estudios tanto con el sistema de ablación láser (p.ej., temperatura de la muestra, frecuencia de repetición, y velocidad de barrido) como con el ICP-MS de doble enfoque (método de adquisición).

---

<sup>20</sup> M.D. Nawajes, A. Mandal, R. Ayyagari, Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47, (2006), 4091–4097.

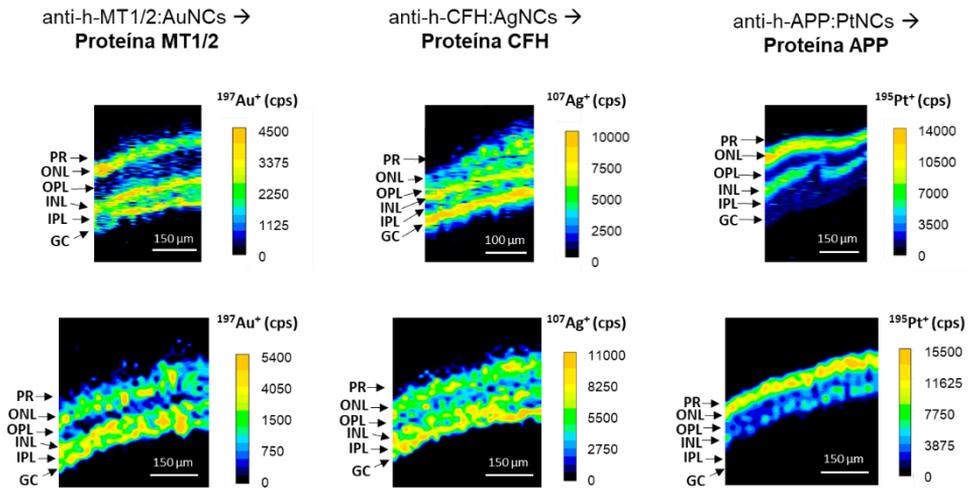
<sup>21</sup> I.A. Bhutto, T. Baba, C. Merges, V. Juriasinghani, D.S. McLeod, G.A. Luttly, C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 95, (2011), 1323–1330.

<sup>22</sup> S.D. Martin, E. Bodek, L. Geng, S. Schaal, H.J. Kaplan, T.H. Tezel, Complement factor H (CFH) expression in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, (2008), 206.

### E.4.4.1. Optimización del método de adquisición del ICP-MS

Se estudió el efecto de la adquisición secuencial de los isótopos en la resolución de los *imaging*s. Para ello se compararon las imágenes resultantes tras el análisis simultáneo de MT1/2, CFH y APP en la misma región del tejido (i.e., se monitorizaron  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$ , y  $^{195}\text{Pt}^+$  en el mismo método del ICP-MS) con las obtenidas en tres regiones adyacentes de la misma sección de tejido (i.e., se emplearon tres métodos diferentes del ICP-MS en los que se monitorizó un solo isótopo en cada *imaging*). Se debe tener en cuenta que en ambos casos se llevó a cabo un protocolo de IHC múltiple (las tres inmunosondas metálicas se incuban a la vez en el mismo tejido). Se comparan las condiciones de *imaging* múltiple e *imaging* individual recogidas en la **Tabla 8**.

La **Figura 55** muestra las imágenes por LA-ICP-MS para la distribución de MT1/2 ( $^{197}\text{Au}^+$ ), CFH ( $^{107}\text{Ag}^+$ ) y APP ( $^{195}\text{Pt}^+$ ) en la retina neurosensorial humana (donante control) para el *imaging* individual o múltiple (imágenes de la fila superior e inferior, respectivamente). Como se puede observar, la distribución de MT1/2, CFH y APP puede distinguirse en ambos casos, con una localización preferente en la INL, la ONL y el GC para la MT1/2 y CFH, con una menor extensión en la INL y el GC para la APP, tal y como se había observado con anterioridad en los *imaging*s individuales empleando los PtNCs como etiqueta metálica para las tres proteínas, así como en las imágenes obtenidas por IF empleando Fluor Alexa® 594. Sin embargo, el empleo del método de adquisición de un isótopo individual permite reducir el tiempo de adquisición del ICP-MS y, por tanto, se puede discriminar mejor la distribución de MT1/2, CFH y APP a lo largo de las capas retinianas (se obtiene una mejor resolución lateral en las imágenes de la fila superior). Por otra parte, la adquisición múltiple permite co-localizar en el mismo punto de medida las tres proteínas, lo que proporciona información muy valiosa a la vez que se reduce el tiempo de análisis.



**Figura 55:** Imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, APP, y CFH en la región de la retina de un donante control obtenidas por LA-ICP-MS empleando los MNCs como marca elemental. Las imágenes de la fila superior han sido obtenidas con el método de ICP-MS de adquisición individual (tres secciones de retina adyacentes, monitorizando sólo 1 isótopo por región; tiempo de adquisición = 0,23 s). Las imágenes de la fila inferior fueron obtenidas empleado el método del ICP-MS de adquisición múltiple (una sola región en un solo tejido, monitorizando 3 isótopos secuencialmente; tiempo de adquisición = 1,74s).

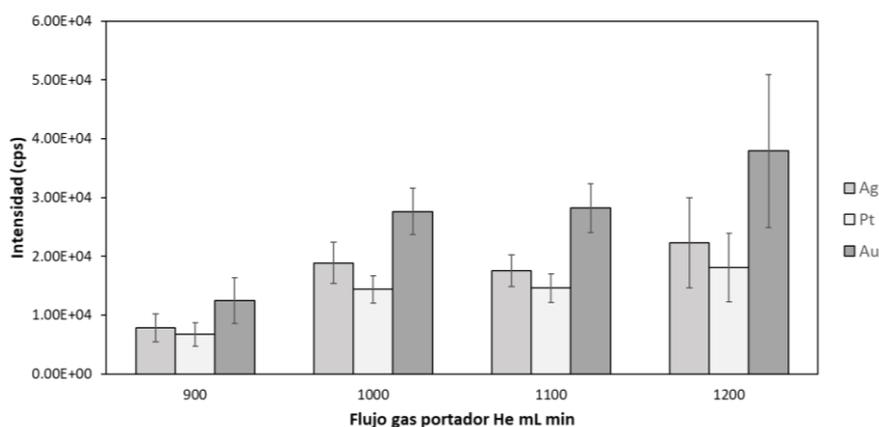
#### E.4.4.2. Optimización de los parámetros de ablación

Seleccionando el método de adquisición del ICP-MS que permite llevar a cabo el *imaging* múltiple, a continuación, se optimizaron las condiciones de ablación para intentar mejorar la resolución lateral de las imágenes manteniendo una buena sensibilidad en la detección. Para ello, se parte de unas condiciones de ablación previamente empleadas para la detección de MT1/2 en tejidos oculares<sup>17</sup>. Los parámetros evaluados fueron: la temperatura de la muestra durante el muestreo por ablación láser, la velocidad de barrido, y el flujo de gas portador.

- ✓ Flujo de gas portador (He)

Una de las primeras optimizaciones que se realizaron a la hora de obtener una señal estable con una buena sensibilidad fue el flujo de gas portador (He). En principio, a mayor flujo, mayor es la sensibilidad obtenida (mayor arrastre). Sin embargo, trabajando a flujos altos de gas portador el ruido también aumenta y las señales son menos estables, incrementándose notablemente el valor de la desviación estándar

asociada a las mismas. Para realizar este estudio se empleó como muestra un patrón de calibración de gelatina suplementada con Au, Ag y Pt ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que permite obtener señales estables con el tiempo (los tejidos oculares son muy heterogéneos por lo que no son los más adecuados para este tipo de optimizaciones). Empleando la gelatina se puede evaluar la sensibilidad, así como la estabilidad de la señal adquiriendo líneas de una duración de 250 s. Se emplearon las condiciones de ablación recogidas en la **Tabla 8** con una velocidad de barrido de  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  y ensayando diferentes flujos para el gas portador: 900, 1000, 1100 y 1200  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de He (**Figura 56**). Se seleccionó el flujo de 1000  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de He como el más adecuado puesto que, a excepción del  $^{197}\text{Au}^+$ , las intensidades obtenidas son comparables con las de 1100 y 1200  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y se descarta un aumento de la desviación y el ruido en la señal.



**Figura 56:** Estudio del efecto que tiene el flujo de He (gas portador) en la intensidad de las señales ( $^{107}\text{Ag}^+$ ,  $^{195}\text{Pt}^+$ , y  $^{197}\text{Au}^+$ ) para el análisis en un patrón de gelatina ( $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por LA-ICP-MS. Las intensidades representan la señal promedio obtenida para la señal neta de cada isótopo al ablacionar una línea en la gelatina con una duración de 250 s. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar del valor promedio de la intensidad a lo largo de una línea de ablación.

- ✓ Temperatura de la muestra y velocidad de barrido.

Varios autores<sup>16,23-25</sup> han estudiado la influencia de la temperatura en la resolución espacial de imágenes 2D para el análisis de diferentes heteroátomos en tejidos biológicos. En todos los casos se recoge que el análisis de las muestras a temperaturas inferiores a 0°C ofrece una mayor resolución lateral en comparación con los análisis realizados a temperatura ambiente. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que al disminuir la temperatura se observa un menor efecto térmico en el proceso de ablación, por lo que la región de la muestra afectada es menor y hay una menor redistribución de partículas en las estructuras adyacentes a la región ablacionada durante todo el tiempo de análisis.

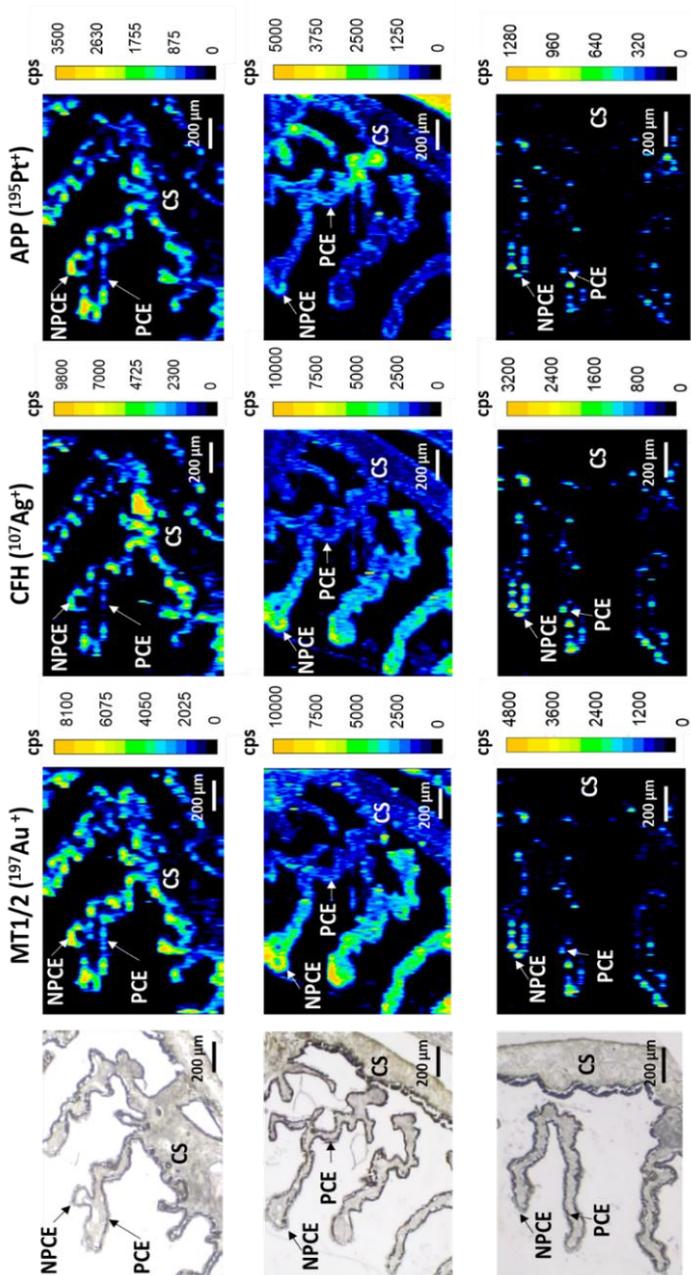
En el caso de los tejidos oculares, para estudiar el efecto de la temperatura de la muestra durante el análisis por LA-ICP-MS, se compararon condiciones en frío (-20°C) y condiciones a temperatura ambiente (25°C). Para este estudio se realizó el análisis múltiple de MT1/2, CFH y APP en la región de los cuerpos ciliares. En concreto se seleccionó la región del *pars plicata*, ya que la forma sinuosa de dicha microestructura (como se puede observar en las imágenes ópticas de la **Figura 57**) hace que la selección de los parámetros de ablación sea crítica para obtener imágenes con una buena resolución. La presencia de MT1/2, CFH y APP en la estructura del cuerpo ciliar fue corroborada mediante IF convencional (en secciones de tejido consecutivas a las empleadas para los análisis LA-ICP-MS, **Figura 54**). Además, los análisis de microarray de expresión también confirmaron la expresión de estas proteínas en esta región (**Figura 53**).

---

<sup>23</sup> M. Zoriy, A. Matuch, T. Spruss, J.S. Becker, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin. *Int J Mass Spectrom.* 260, (2007), 102–106.

<sup>24</sup> S. Hamilton, E.L. Gorishek, P.M. Mach, D. Sturtevant, M.L. Ladage, N. Suzuki, P.A. Padilla, R. Mittler, K.D. Chapman, G.F. Verbeck, Evaluation of a custom single Peltier-cooled ablation cell for elemental imaging of biological samples in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *J Anal At Spectrom.* 31, (2016), 1030–1033.

<sup>25</sup> J.S. Becker, A. Matusch, C. Depboylu, J. Dobrowolska, M.V. Zoriy, Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slugs-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 79, (2007), 6074–6080.



**Figura 57:** Imágenes obtenidas por L-A-ICP-MS para la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las regiones adyacentes de la pars plicata del cuerpo ciliar de un donante humano control tras el protocolo de IHC con inmunosondas marcadas con MNCs (*Anti-h-MT1/2: AuNCs*, *Anti-h-CFH: AgNCs*, y *Anti-h-APP: PtNCs*). La primera columna recoge en todos los casos la imagen óptica de la región analizada. La fila superior corresponde a las condiciones a baja temperatura de ablación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) con una velocidad de barrido de  $5\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , la fila intermedia corresponde a los análisis a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) con una velocidad de  $5\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , y la fila inferior a condiciones criogénicas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y velocidad de  $2,5\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado.

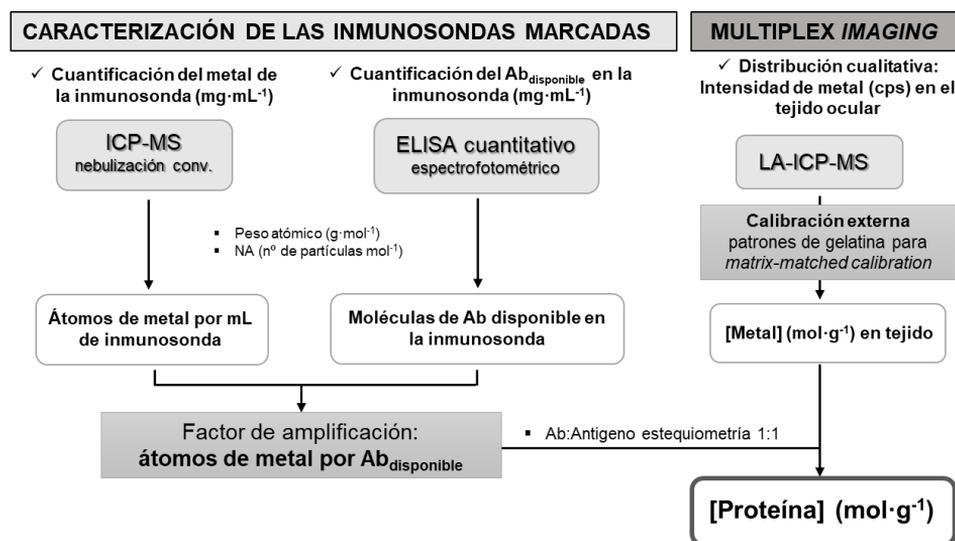
Las imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para los procesos ciliares utilizando las inmunosondas de MNCs permitieron visualizar la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las diferentes estructuras de la región de la *pars plicata* (**Figura 57**). Las imágenes de la fila superior y la fila intermedia muestran, respectivamente, los *imagings* para la distribución de las proteínas trabajando en condiciones criogénicas (-20°C) y a temperatura ambiente (25°C). En ambos casos se observó que la MT1/2, CFH, y APP se localizaban principalmente en las células epiteliales ciliares, tanto en el epitelio ciliar no pigmentado (NPCE) como en el epitelio ciliar pigmentado (PCE). Sin embargo, el uso de bajas temperaturas ofreció imágenes con mayor resolución y así la MT1/2, CFH, y APP se identificaron específicamente en las células NPCE y PCE. La mejor resolución observada a baja temperatura puede atribuirse a un menor daño tisular, así como a una menor contaminación de las líneas vecinas utilizando la celda criogénica y manteniendo la muestra a baja temperatura durante todo el análisis.

Adicionalmente, trabajando en condiciones a baja temperatura (-20°C) se estudió una velocidad de barrido menor para evaluar su influencia en la resolución espacial ( $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  frente  $2,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Las imágenes de la fila inferior de la **Figura 57** muestran la distribución de la MT1/2, CFH, y APP a lo largo de los procesos ciliares utilizando  $2,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . Aunque se consiguió una mejor resolución lateral disminuyendo a la mitad la velocidad de barrido (filas superior e inferior de la imagen, respectivamente), la sensibilidad disminuyó drásticamente, haciendo casi imposible la identificación de las proteínas en algunas regiones del tejido (p.ej., el epitelio ciliar en la parte basal del proceso ciliar). Por lo tanto, se seleccionó una velocidad de barrido de  $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  para los análisis posteriores por LA-ICP-MS.

E.4.5. *Imaging* múltiple de proteínas en secciones de ojo humano

E.4.5.1. Caracterización de las inmunosondas

Con el objetivo de obtener no sólo la distribución de las proteínas a lo largo de las estructuras de las secciones de los tejidos oculares mediante LA-ICP-MS, sino también su concentración, es necesario conocer la amplificación proporcionada por cada una de las inmunosondas marcadas con los MNCs. Los pasos necesarios para la caracterización de las inmunosondas metálicas pueden seguirse en el diagrama de la **Figura 58**. Para ello, debe determinarse la relación entre el metal detectado por ICP-MS (p.ej., Au, Ag o Pt) y el anticuerpo seleccionado en cada caso para la inmunosonda (p.ej., Anti-h-MT1/2, Anti-h-CFH o Anti-h-APP). Para conocer el factor de amplificación proporcionado por cada inmunosonda de MNCs (número de átomos de metal unidos a cada Ab disponible) es necesario realizar medidas por ICP-MS, así como un ELISA cuantitativo.



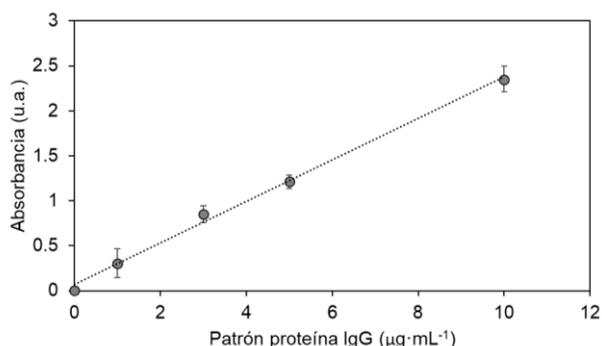
**Figura 58:** Esquema de las etapas experimentales llevadas a cabo para obtener el *imaging* cuantitativo de proteínas en secciones de tejidos biológicos empleando LA-ICP-MS y MNCs como marca elemental. Como se muestra en la parte de la izquierda del esquema, previamente al análisis por ICP-MS es necesario realizar la caracterización de las inmunosondas marcadas para conocer el factor de amplificación de cada inmunosonda.

El factor de amplificación (N) de los Ab disponibles tras la síntesis de la inmunosonda metálica puede calcularse experimentalmente, tal y como se describe

---

en la **Sección C.4.5** del Experimental General siguiendo la estrategia previamente aplicada por Cruz-Alonso et al.<sup>17</sup>.

La determinación del factor de amplificación se realizó individualmente para cada inmunosonda marcada (y tras la etapa de bloqueo con hidroxilamina) empleado los anticuerpos específicos de las proteínas de interés (inmunosondas: Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). Por una parte, la cantidad de Ab disponible en la reacción antígeno: anticuerpo se investigó primero mediante un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo utilizando IgG de conejo (Anti-h-APP: PtNCs y Anti-h-CFH: AgNCs) e IgG de ratón (Anti-h-MT1/2: AuNCs) como estándares para generar la curva de calibración (en el rango de 0-10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A modo de ejemplo, en la **Figura 59** se muestra la curva de calibrado obtenida para las inmunosondas Anti-h-APP: PtNCs y Anti-h-CFH: AgNCs. La concentración de Ab obtenida para las inmunosondas Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-APP: PtNCs, y Anti-h-CFH: AgNCs (bloqueados con hidroxilamina y purificadas) está recogida en la **Tabla 9**. Teniendo en cuenta la masa molecular del Ab (Ab tipo IgG, 150 kDa) y la constante de Avogadro ( $N_A = 6,022\cdot 10^{23}$  moléculas $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) es posible determinar el número de Ab por mL. Se encontró un valor promedio de  $2,20\cdot 10^{-13}$  moléculas de Anti-h-MT1/2,  $2,07\cdot 10^{-13}$  moléculas de Anti-h-APP, y  $1,84\cdot 10^{-13}$  moléculas de Anti-h-CFH por mL para las inmunosondas Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-APP: PtNCs, y Anti-h-CFH: AgNCs, respectivamente.

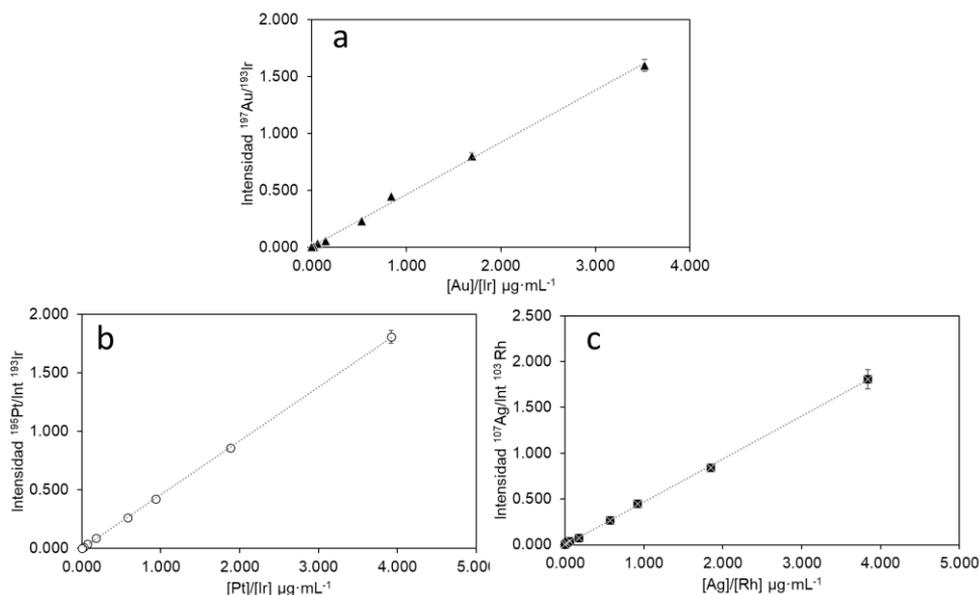


**Figura 59:** Curva de calibrado empleada para la caracterización de las inmunosondas *Anti-h-CFH:AgNCs* y *Anti-h-APP:PtNCs*. La representación muestra la curva de calibrado de patrón IgG de conejo para la cuantificación del Ab disponible en las inmunosondas.

**Tabla 9:** Resultados obtenidos para la caracterización de las inmunosondas metálicas, en términos de concentración de Ab disponible en la inmunosonda determinada por un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo, concentración del metal determinada por ICP-MS, factor de amplificación (N), y relación molar Ab:MNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Inmunosonda	[Ab] disponible ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	[Metal] ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	N	Ab:MNCs
Anti-h-MT1/2:AuNCs	$5,47 \pm 0,23$	$2,17 \pm 0,18$	310	1:1
Anti-h-CFH:AgNCs	$4,58 \pm 0,03$	$2,38 \pm 0,32$	723	1:1
Anti-h-APP:PtNCs	$5,14 \pm 0,15$	$7,99 \pm 0,22$	1194	1:11

Por otro lado, la concentración de Au, Pt, y Ag se determinó mediante análisis por ICP-MS con nebulización convencional empleando una calibración externa con patrones en disolución y utilizando Ir como patrón interno para Au y Pt, y Rh para Ag. La **Figura 60** muestra las rectas de calibrado para los tres metales. Las inmunosondas *Anti-h-MT1/2:AuNCs*, *Anti-h-APP:PtNCs*, y *Anti-h-CFH:AgNCs* tenían una concentración para dichos metales en el rango de  $2.17\text{-}7.99 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En la **Tabla 9** se recogen las concentraciones obtenidas para Au, Pt y Ag en las tres inmunosondas.



**Figura 60:** Curvas de calibrado obtenidas por ICP-MS para determinar la concentración de Au, Pt, y Ag en las Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Con todos los datos experimentales obtenidos, y teniendo en cuenta los pesos moleculares de los anticuerpos IgG, el peso atómico de cada metal, así como el número de Avogadro, se obtuvo el número de moléculas de Ab y número de átomos metálicos por inmunosonda. Al hacer el cociente entre estos valores se puede obtener el factor de amplificación promedio para cada una de las inmunosondas: 310 para Anti-h-MT1/2:AuNCs, 723 para Anti-h-CFH:AgNCs, y 1194 para Anti-h-APP:PtNCs que corresponde a las relaciones molares Ab:MNCs de 1:1, 1:1, y 1:11, respectivamente. Cabe destacar que el factor de amplificación encontrado para la inmunosonda con PtNCs está de acuerdo con el valor previamente determinado para la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs utilizada en el Capítulo I para la cuantificación de IgE. Esto nos indica que independientemente del Ab 1° empleado para la síntesis de la inmunosonda, siempre que se bioconjugue un Ab tipo IgG a la misma suspensión de MNCs, el factor de amplificación promedio debería ser el mismo.

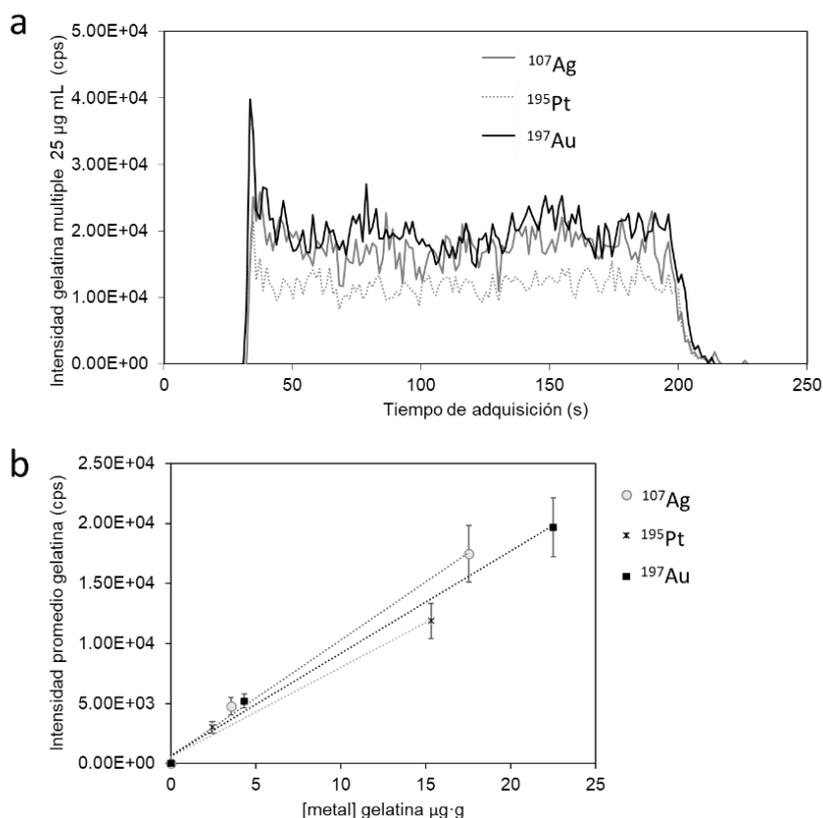
**E.4.5.2. Caracterización de los patrones de laboratorio de gelatina**

Tal y como se describe en el esquema de trabajo de la **Figura 58**, además de llevar a cabo la caracterización de las inmunosondas es necesario caracterizar los patrones de gelatina fabricados en el laboratorio que serán empleados como patrones en la calibración por LA-ICP-MS. Para ello, tras la digestión de las gelatinas, el contenido metálico de las mismas fue determinado por ICP-MS empleando una calibración externa con patrón interno (al igual que realizó para la caracterización del contenido metálico de las inmunosondas). En la **Tabla 10** se recoge la concentración de Au, Pt, y Ag determinada por ICP-MS para los patrones de gelatina.

**Tabla 10:** Concentraciones de Au, Pt, y Ag encontradas en los patrones de laboratorio de gelatina analizados por ICP-MS tras su digestión ácida. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Patrón de Gelatina	[Au] ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	[Pt] ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	[Ag] ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
#Patrón 1	22,50	15,22	17,53
#Patrón 2	20,3	14,45	18,56
#Patrón 3	23,65	15,89	15,90
Promedio (n=3)	22,15 $\pm$ 1,70	15,19 $\pm$ 0,72	17,33 $\pm$ 1,34

Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos, las intensidades de los metales en los perfiles obtenidos para las gelatinas por LA-ICP-MS (**Figura 61a**) se pueden relacionar con la concentración de cada metal para construir las rectas de calibrado por LA-ICP-MS. La **Figura 61b** muestra las rectas de calibrado obtenidas con las gelatinas suplementadas con Au, Ag, y Pt, las cuales serán empleadas para la cuantificación de los metales de las inmunosondas en los estudios de *imaging* en las secciones de tejido ocular.



**Figura 61:** a) Perfil de ablación obtenido para el análisis de un patrón de gelatina por LA-ICP-MS empleando las condiciones optimizadas para el imaging de proteínas, y b) Curvas de calibración obtenidas para el Au, Pt, y Ag obtenidas tras el análisis por LA-ICP-MS de los patrones de gelatina dopados con los tres metales (la concentración metálica en la gelatina fue determinada previamente por ICP-MS con nebulización convencional – **Tabla 10**). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Adicionalmente, conociendo las curvas de calibrado de gelatina para los tres metales se pueden calcular los límites de detección del método para cada uno de ellos ( $LOD_{Au}$ ,  $LOD_{Ag}$  y  $LOD_{Pt}$ ). El LOD se define como la concentración de metal que proporciona una señal igual a la señal del blanco ( $y_B =$  ordenada en el origen) más tres veces la desviación del blanco ( $3\sigma_B$ ). Los resultados obtenidos expresados en ng de metal por g de gelatina se recogen en la **Tabla 11** (primera columna). Además, teniendo en cuenta el peso atómico de los metales, el NA y el número de átomos promedio que componen cada NCs (310, 723 y 117 para AuNCs, AgNCs y PtNCs

respectivamente), se puede transformar dichos valores en número de NCs por g de gelatina.

Sin embargo, se considera más adecuado expresar el LOD en número de NCs referido a un pulso de haz láser, es decir, volumen de gelatina arrancado por pulso. Para ello, se asume que el volumen de material arrancado por pulso de haz láser es cilíndrico ( $\pi \cdot R^2 \cdot \text{espesor del tejido}$ ) siendo el diámetro de este correspondiente a la resolución lateral obtenida con las condiciones del láser usadas. Si la velocidad de barrido del láser está fijada en  $5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  y el tiempo de evacuación de la celda de ablación es de  $\sim 1$  s, la resolución lateral resulta en  $5 \mu\text{m}$ . Por tanto, el volumen de gelatina ( $10 \mu\text{m}$  de espesor) arrancado por pulso es de  $1,66 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^3$ . Entonces, sabiendo la densidad de la gelatina ( $1,14 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$ ) y el volumen del pulso se obtiene que los  $\text{LOD}_{\text{NCs}}$  son 226, 974 y 214 AuNCs, AgNCs y PtNCs por pulso respectivamente.

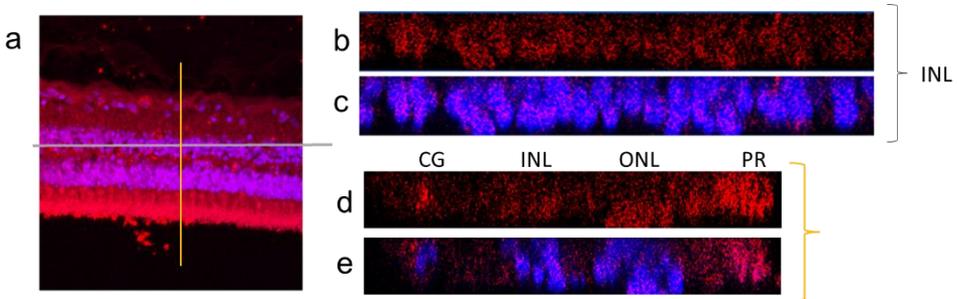
**Tabla 11:** Límites de detección del método de análisis expresados en concentración de metal, en número de NCs por g de gelatina y en número de NCs por volumen de pulso, teniendo en cuenta que se tienen una resolución lateral de  $5 \mu\text{m}$ .

Metal	$\text{LOD}_{\text{M}^+}$ ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$\text{LOD}_{\text{NCs}}$ ( $\text{n}^\circ \text{NCs} \cdot \text{g}^{-1}$ )	$\text{LOD}_{\text{NCs}}$ ( $\text{n}^\circ \text{NCs} \cdot \text{pulso}^{-1}$ )
<b>Au</b>	115	$1,13 \cdot 10^{12}$	226
<b>Ag</b>	206	$1,59 \cdot 10^{12}$	974
<b>Pt</b>	195	$5,14 \cdot 10^{12}$	214

### E.4.5.3. Estudio sobre la penetración de la inmunosonda en las secciones de tejido

Conocer si las inmunosondas penetran completamente a lo largo de todo el espesor del tejido ( $10 \mu\text{m}$ ) es crucial de cara a asegurar que se detecta toda la proteína en el tejido ablacionado. Para ello se evaluó la penetración de la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs en las secciones oculares de  $10 \mu\text{m}$  de grosor. Después de llevar a cabo el procedimiento IHC con la inmunosonda, se visualizó la distribución de la MT1/2 empleando detección fluorescente y siguiendo para ello la emisión directa de

la etiqueta metálica (AuNCs). Se empleó el microscopio láser confocal ( $\lambda_{\text{ex}}=405$  nm, rango  $\lambda_{\text{em}}=700-730$  nm) a lo largo de la superficie del tejido (plano XY), así como a lo largo del eje Z. Para obtener una imagen en profundidad del tejido (eje Z), se tomaron 45 planos focales paralelos desde la superficie del tejido hasta el fondo del mismo en intervalos de  $0,4 \mu\text{m}$ . En la **Figura 62a** puede verse la suma de las 45 imágenes de intensidad máxima a lo largo de las capas de la retina. En las **Figura 62b** y **Figura 62c** se muestran las imágenes en profundidad (en  $10 \mu\text{m}$  de espesor) justo en la INL de la retina (posición marcada por una línea naranja en la **Figura 62a**), mientras que las **Figura 62d** y **e** recogen las imágenes en profundidad obtenidas de la región transversal (región marcada con una línea gris en la **Figura 62a**), que corresponde con la capa nuclear interna, INL. Con este estudio se pudo localizar la MT1/2 a lo largo de los  $10 \mu\text{m}$  de espesor siguiendo la emisión fluorescente de los AuNCs, y por tanto se confirmó la total penetración del Ab primario en el tejido.



**Figura 62:** Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para la región de la retina neurosensorial en un tejido ocular (donante control) para estudiar la penetración de la inmunosonda Anti-b-MT1/2:AuNCs en todo el espesor del tejido. La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de MT1/2) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). a) Imagen de máxima intensidad construida a partir de las 45 secciones realizadas cada de  $0,4 \mu\text{m}$  de profundidad, b) y c) Imágenes en profundidad de  $10 \mu\text{m}$  de espesor justo en la INL de la retina (región marcada con línea amarilla), d) y e) Imágenes de una sección transversal y donde se observa la distribución de la MT1/2 a lo largo de las diferentes capas de la retina (corte marcado con línea naranja).

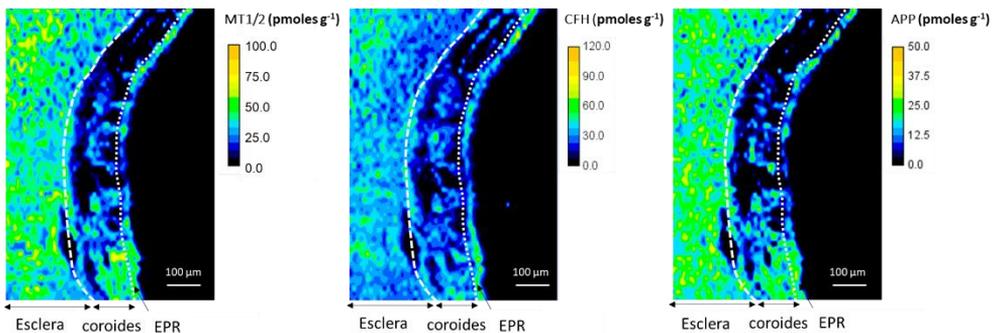
### E.4.5.4. *Imaging* en concentración de proteína por LA-ICP-MS

Para obtener el *imaging* múltiple de las tres proteínas se ablacionaron secciones transversales de 10  $\mu\text{m}$  de espesor de ojos humanos de donantes *post-mortem* control y con DMAE utilizando las condiciones experimentales recogidas en la **Tabla 8** (*imaging* múltiple). A diferencia de lo que ocurre en los procedimientos tradicionales de IHC e IF, las etiquetas de MNCs combinadas con LA-ICP-MS permiten evaluar no sólo la distribución cualitativa de las proteínas (señales de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$ , y  $^{195}\text{Pt}^+$  en cps), sino también su concentración a lo largo de las estructuras tisulares. Siguiendo las etapas descritas en el diagrama de flujo recogido en la **Figura 58** se pueden transformar las señales de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$ , y  $^{195}\text{Pt}^+$  (MNCs) en concentraciones de MT1/2, CFH, y APP, respectivamente. De este modo, tras la caracterización de las inmunosondas y la calibración por LA-ICP-MS con los estándares de gelatina se pudieron obtener las imágenes cuantitativas para la distribución de las tres proteínas en los tejidos oculares. Por lo tanto, para todas los *imaging*s mostrados a continuación se obtuvieron en primer lugar los mapas 2D con la distribución cualitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región RPE-coroides-esclera siguiendo las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  y  $^{195}\text{Pt}^+$  (MNCs). Los estudios se realizaron en secciones oculares de donantes *post-mortem* control y con depósitos drusenoides (donantes con DMAE) para evaluar si existe acumulación preferencial de proteínas específicas en pacientes con DMAE. A continuación, las intensidades fueron transformadas en concentración de metal con los calibrados de gelatina y, finalmente, la concentración de metal se transforma en concentración de proteína teniendo en cuenta el factor de amplificación de cada inmunosonda.

Sin embargo, las concentraciones de proteína en los tejidos no han sido validadas con metodologías analíticas complementarias. Por ejemplo, digiriendo secciones de tejido consecutivas y determinando la concentración de las proteínas con un kit ELISA. Por ello, aunque sí se puede decir que obtenemos valores cuantitativos de los metales detectados (Au, Ag y Pt) al aplicar la calibración externa con patrones de gelatina dopados con las sales de dichos metales, puede que sea más adecuado indicar que los valores de concentración de las proteínas en los tejidos ablacionados no son

concentraciones absolutas y por ello se podrían expresar como distribuciones semi-cuantitativas.

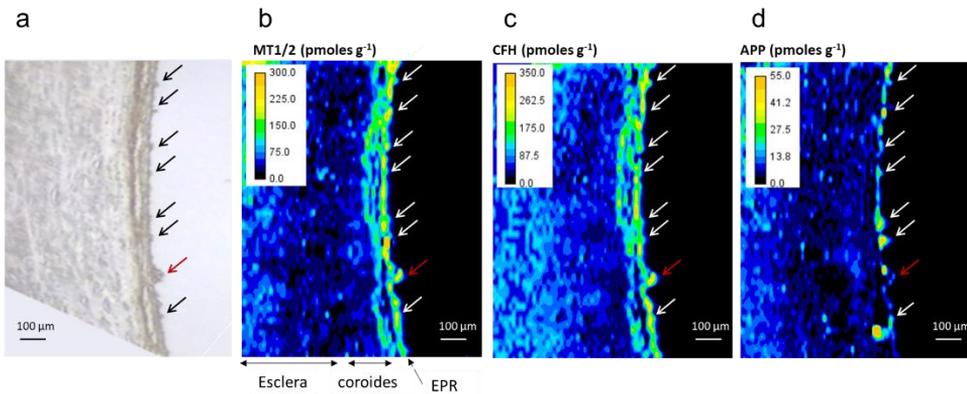
En la **Figura 63** se muestra la determinación simultánea de MT1/2, CFH, y APP para un donante control en la región RPE-coroides-esclera. La MT1/2 está ampliamente distribuida en la esclera, y se concentra en la monocapa del EPR. Los niveles observados en el estroma de la coroides son más bajos, con algunas regiones (coincidentes con los vasos sanguíneos) sin MT1/2. La proteína CFH está ampliamente distribuida y enriquecida en algunas partes de la capa del EPR, mostrando una concentración similar en la región de la esclera y niveles más bajos en el estroma del coroides. Por su parte, la APP está distribuida de forma similar en la región de la esclera y el EPR, pero con una menor concentración si se compara con la MT1/2 y la CFH. La amplia distribución de las proteínas seleccionadas en la muestra del donante control es similar a los resultados obtenidos con el análisis de microarrays (**Figura 53**).



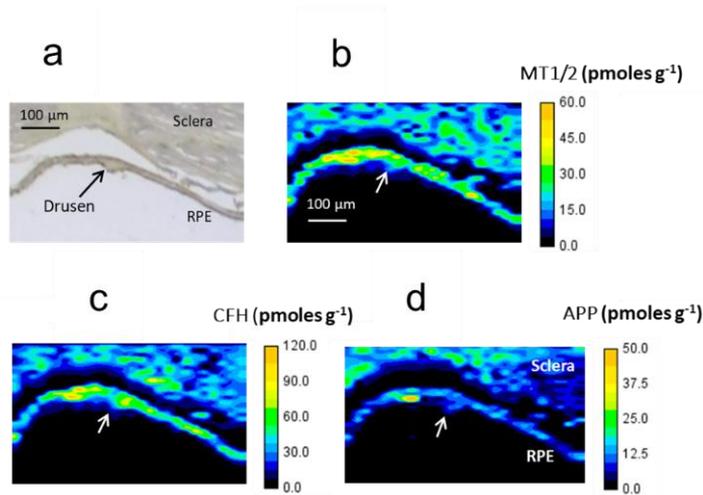
**Figura 63:** *Imaging cuantitativo de proteínas obtenido por LA-ICP-MS para un tejido ocular en la región del EPR de un donante control tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-b-MT1/2: AuNCs, Anti-b-CFH: AgNCs, y Anti-b-APP: PtNCs) (60 líneas de ablación). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. Las imágenes 2D se construyeron con el software Image J después de convertir las señales de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  y  $^{195}\text{Pt}^+$  en concentración de proteínas (con el programa Excel).*

Las **Figura 64** y **Figura 65** muestran las imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la MT1/2, CFH, y APP para dos donantes con DMAE (#1 y #2). Como se puede observar, las proteínas MT1/2 y CFH estaban ampliamente distribuidas a lo largo de la monocapa del EPR, de manera similar al donante control, aunque con una

mayor acumulación en los depósitos sub-EPR en agregados hemisféricos específicos. Los depósitos de drusas están marcados con flechas en las imágenes para una mejor localización. La proteína APP se localizó de forma llamativa en los depósitos sub-RPE. En general, existe una acumulación preferencial de las proteínas seleccionadas en los depósitos drusenoides subretinianos con un enriquecimiento específico en los agregados anómalos. Se debe tener en cuenta que se fijaron diferentes escalas para las imágenes obtenidas en los tejidos de DMAE y de donantes control para observar adecuadamente la distribución de las proteínas en ambos casos (p.ej., la escala para la MT1/2 varía entre 60-300 pmoles·g<sup>-1</sup>). Destacar que algunas diferencias observadas en la distribución y el contenido de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las estructuras oculares pueden atribuirse a las características de diversidad biológica o a la gravedad de la enfermedad de cada paciente.



**Figura 64:** *Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH y APP en la región del EPR-corioides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-b-MT1/2: AuNCs, Anti-b-CFH: AgNCs, y Anti-b-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (60 líneas de ablación).*



**Figura 65:** *Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroideas-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (30 líneas de ablación).*

A la vista de los *bioimaging* múltiples obtenidos expresados en concentración de proteína, se puede decir que esta estrategia que combina la inmunohistoquímica múltiple y la detección por LA-ICP-MS, permite localizar simultáneamente en una misma sección de tejido ocular tres proteínas de interés en relación con la DMAE, y en concreto en regiones del EPR de donantes control y donantes con DMAE que presentan drusas en dicha región. La metodología de detección múltiple desarrollada en este trabajo no sólo permite la amplificación de la detección de proteínas diana MT1/2, CFH y APP debido a los cientos de átomos metálicos por etiqueta metálica empleada (AuNCs, AgNCs y PtNCs) sino que además se puede proporcionar un valor de concentración de dichas proteínas por píxel de tejido ablacionado.

### E.5. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha descrito un método inmunohistoquímico para localizar simultáneamente en una misma sección de tejido ocular tres proteínas de interés en relación con la DMAE (MT-1/2, CFH y APP) mediante LA-ICP-MS. La metodología de detección múltiple desarrollada en este trabajo permite no sólo obtener una gran amplificación de la detección de proteínas debido a los cientos de átomos metálicos por etiqueta metálica empleada (AuNCs, AgNCs y PtNCs), sino también expresar en términos de concentración las distribuciones de las mismas a lo largo de los tejidos oculares. De manera específica las conclusiones extraídas de este capítulo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- ✓ Se ha evaluado el uso de los PtNCs como marcas elementales en la síntesis de inmunosondas específicas para la obtención de *biomimaging*s proteicos en diferentes regiones oculares para MT-1/2, CFH y APP de manera individual.
- ✓ Se ha determinado una relación molar PtNCs:hidroxilamina, 1:50 para asegurar la no adsorción inespecífica de los PtNCs a los tejidos para la realización de manera fiable y reproducible de los procedimientos de IHC.
- ✓ Se ha realizado una caracterización de las tres inmunosondas: Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs y Anti-h-APP:AuNCs para conocer sus factores de amplificación (N) siendo 310, 723 y 1194 respectivamente.
- ✓ Se ha confirmado mediante IHC por IF la distribución de las proteínas en retina y cuerpos ciliares, y además se confirmó la penetración de los Ab usando la inmunsonda Anti-h-Mt1/2:AuNCs como referencia al realizar un seguimiento de su fluorescencia ( $\lambda_{em} = 720$  nm) mediante su medida con microscopía de láser confocal ( $\lambda_{ex} = 405$  nm) en la sección transversal de un corte de 10  $\mu\text{m}$ .
- ✓ Se han estudiado y optimizado las condiciones del sistema de ablación para lograr una buena sensibilidad en la detección y resolución lateral de los *imaging* múltiples. Para ello se ha elegido a baja temperatura (uso de celda a 20°C) durante las medidas y una velocidad de barrido de 5  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

- ✓ Se ha evaluado y optimizado el método de adquisición empleando un ICP-MS de tipo sector magnético para lograr una buena sensibilidad y resolución en los *imaging* múltiples. Para ello se opta por la adquisición secuencial de los tres isótopos ( $^{197}\text{Au}$ ,  $^{107}\text{Ag}$  y  $^{195}\text{Pt}$ ) en el mismo método de medida sacrificando resolución frente al ahorro de tiempo en la medida y a la posibilidad de obtener información de las tres proteínas exactamente en la misma región ablacionada. Se obtuvieron las mejores condiciones posibles en cuanto a resolución lateral y sensibilidad teniendo en cuenta las limitaciones instrumentales de los equipos disponibles.
- ✓ Se han usado patrones de gelatina suplementados con los metales (Au, Ag y Pt) como estándares de calibración *matrix-matched* para conocer la concentración de los metales en los *bioimaging*s. Finalmente, conociendo el número de átomos de la etiqueta por inmunosonda marcada, se logra expresar en términos de concentración de proteína las distribuciones en las secciones de tejido ocular.
- ✓ Cabe destacar que la combinación de MNCs como etiquetas de inmunosondas y LA-ICP-MS ha permitido la localización simultánea de las tres proteínas en un mismo tejido ocular cuya autofluorescencia limita el uso de técnicas basadas en la inmunofluorescencia para detectar la distribución de proteínas. En particular, en el presente trabajo se ha logrado la detección de MT1/2, CFH y APP en tejidos oculares que incluyen el EPR y el PCE, donde la autofluorescencia de estas células pigmentadas dificulta la visualización de la distribución de proteínas por IF. De esta manera, los *bioimaging* han permitido localizar acumulaciones de estas proteínas de en términos de concentración en las drusas formadas en las regiones de tejido EPR-MBr de donantes *post-mortem* con DMAE, así como en las zonas conflictivas debido a la autofluorescencia del propio tejido (EPR y PCE). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar la localización de CFH empleando otro Ab distinto u otra técnica de análisis.



---

# F. CAPÍTULO III

Desarrollo de una estrategia de cuantificación para la determinación de proteínas en células individuales por LA-ICP-MS empleando inmunosondas marcadas con AuNCs y estándares de calibración *matrix-matched*

---



## F.1. INTRODUCCIÓN

En este Capítulo III se aborda la determinación de proteínas relacionadas con la DMAE en células individuales mediante su análisis por LA-ICP-MS empleando inmunosondas marcadas con AuNCs. La resolución lateral requerida para poder obtener distribución subcelular de las proteínas trae consigo la limitación que presenta la dispersión asociada al diámetro de los MNCs. Dicha variabilidad está directamente asociada con el número de átomos metálicos por marca y, por lo tanto, tiene un efecto directo en la concentración de la proteína determinada durante el análisis por MS elemental. En el Capítulo II de esta Tesis Doctoral se observó que los LOD, expresados por n° de NCs detectados por pulso de haz láser con una resolución lateral de 5  $\mu\text{m}$ , fueron de 214, 226 y 974 NCs de Au, Ag y Pt respectivamente. Al disminuir los diámetros de haz láser para conseguir mejor resolución lateral, disminuirá a su vez el número de NCs detectado por pulso de láser por lo que la desviación asociada a la variabilidad de sus diámetros provocará mayor incertidumbre en las concentraciones de proteína detectada. Por todo esto, el empleo de suspensiones de MNCs con tamaños lo más homogéneos posible es crítico para obtener concentraciones exactas y precisas cuando se reduce la cantidad de materia introducida en el plasma por pulso de láser.

Tal y como está recogido en la Introducción General, los nuevos avances tecnológicos han permitido el desarrollo de sistemas de medida de células individuales empleando ICP-MS: *single cell* (sc) ICP-MS. Este tipo de análisis permite medidas célula a célula en diferentes tipos de aplicaciones al introducir suspensiones celulares intactas en el plasma ICP-MS<sup>1,2</sup>. Sin embargo, en los análisis por sc-ICP-MS no se puede obtener una distribución subcelular de los analitos y, además, pueden producirse riesgos de muestreo no representativo debido a pérdidas celulares dependientes

---

<sup>1</sup> M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernández, F. Vanhaecke. Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events. *Chem Sci* 13, (2022), 4436.

<sup>2</sup> 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.

del tamaño en el transporte hacia la ICP-MS (p.ej., las células más grandes se depositan más fácilmente y no llegan al plasma ICP-MS) o a la fragilidad de las membranas celulares (crítico en células animales). Ambos aspectos pueden ser superados mediante el análisis de células empleando un sistema de ablación láser acoplado al ICP-MS.

Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos sobre células publicados empleando LA-ICP-MS se centran en la distribución de elementos presentes de forma natural o suplementados en las células, así como en la captación y el procesamiento de MNPs<sup>34</sup>. Además, también hay publicaciones donde se estudian distribuciones de proteínas empleando estrategias de etiquetado con metales<sup>5</sup>. Para ello se han utilizado los ya mencionados complejos de Ln, las etiquetas poliméricas que contienen varios Ln, y MNPs. Aunque los estudios cualitativos donde se obtiene la distribución espacial de los heteroátomos en las células por LA-ICP-MS se han realizado con éxito para diferentes aplicaciones, los trabajos relacionados con la obtención de imágenes cuantitativas son aún escasos. Los efectos de matriz que afectan a las medidas por LA-ICP-MS, junto con la persistente falta de materiales de referencia adecuados para la calibración (especialmente para las matrices biológicas), siguen dificultando aún la determinación de elementos y biomoléculas en células por LA-ICP-MS<sup>6</sup>.

Actualmente, las estrategias de cuantificación para metales y biomoléculas en células empleando LA-ICP-MS se basan en la generación de patrones de calibración

---

<sup>3</sup> O. Reifschneider, A. Vennemann, G. Buzanich, M. Radtke, U. Reinholz, H. Riesemeier, J. Hogeback, C. Köppen, M. Großgarten, M. Sperling, M. Wiemann, U. Karst, Revealing Silver Nanoparticle Uptake by Macrophages Using SR- $\mu$ XRF and LA-ICP-MS. *Chem Res Toxicol.* 33, (2020), 1250–1255.

<sup>4</sup> J. A. Ko, N. Furuta, H.B. Lim, New approach for mapping and physiological test of silica nanoparticles accumulated in sweet basil (*Ocimum basilicum*) by LA-ICP-MS. *Anal Chim Acta* 1069, (2019), 28-35.

<sup>5</sup> D. Clases, R. Gonzalez de Vega, P. A. Adlard, P.A. Doble, On-line reverse isotope dilution analysis for spatial quantification of elemental labels used in immunohistochemical assisted imaging mass spectrometry via LA-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 34, (2019), 407-412.

<sup>6</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90, (2018), 12145–12151.

donde se intenta ajustar la matriz de los patrones a la matriz de la muestra (calibraciones *matrix-matched*). Drescher et al.<sup>7</sup> proponen el uso de membranas de nitrocelulosa con suspensión de NPs para la determinación de AuNPs y AgNPs en células eucariotas. Posteriormente, esta estrategia fue mejorada por Arakawa et al.<sup>8</sup> utilizando un microarray para generar *spots* de los patrones con dimensiones bien controladas y reducir así el tamaño de las gotas secas de suspensión de NPs. En esta aplicación se obtuvo la distribución cuantitativa de AgNPs en esferoides 3D. Por otro lado, Wang et al.<sup>9</sup> propusieron el empleo de residuos secos de pico-gotas impresas (generadas con una impresora comercial) para la cuantificación de AuNPs internalizadas en una línea celular de macrófagos monocíticos de ratón. Además, el grupo del Prof. Vanhaecke<sup>10</sup> ha utilizado gelatinas enriquecidas con metales como estándares para la cuantificación del Cu o para la determinación de una biomolécula en células de cáncer de mama empleando un Ln quelato como etiqueta elemental. También se pueden encontrar otros trabajos centrados en la cuantificación de biomoléculas específicas de la membrana celular utilizando clústeres de péptidos-Au como etiquetas y empleando residuos secos de gotas de metal como estándares de calibración<sup>11,12</sup>. En todas las estrategias propuestas se intenta imitar la matriz de las células individuales,

---

<sup>7</sup> D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, N. Jakubowski, Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS. *Anal Chem.* 84, (2012), 9684–9688.

<sup>8</sup> A. Arakawa, N. Jakubowski, S. Flemig, G. Koellensperger, M. Ruzs, D. Iwahata, H. Traub, T. Hirata, High-resolution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry used to study transport of metallic nanoparticles through collagen-rich microstructures in fibroblast multicellular spheroids. *Anal Bioanal Chem.* 411, (2019), 3497–3506.

<sup>9</sup> M. Wang, L.N. Zheng, B. Wang, H.Q. Chen, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W.Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chem.* 86, (2014), 10252–10256.

<sup>10</sup> S.J.M. van Malderen, E. Vergucht, M. De Rijcke, C. Janssen, L. Vincze and F. Vanhaecke, Quantitative determination and subcellular imaging of Cu in single cells via laser ablation-ICP-mass spectrometry using high-density microarray gelatin standards. *Anal Chem.* 88, (2016), 5783–5789.

<sup>11</sup> J. Zhai, Y. Wang, C. Xu, L. Zheng, M. Wang, W. Feng, L. Gao, L. Zhao, R. Liu, F. Gao, Y. Zhao, Z. Chai, X. Gao, Facile approach to observe and quantify the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin on a single-cell. *Anal Chem.* 87, (2015), 2546–2549.

<sup>12</sup> J. Zhai, L. Zhao, L. Zheng, F. Gao, L. Gao, R. Liu, Y. Wang, X. Gao, Peptide–Au cluster probe: precisely detecting epidermal growth factor receptor of three tumor cell lines at a single-cell level. *ACS Omega* 2, (2017), 276–282.

sin embargo, ninguna de ellas logra alcanzar en su totalidad las características de la compleja naturaleza que presenta la matriz celular.

Dentro de esta línea, en el Capítulo III de la Tesis Doctoral se plantea el desarrollo de una metodología de calibración *matrix-matched* para determinar el contenido de dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células individuales del epitelio pigmentario de la retina (EPR) mediante LA-ICP-MS. El interés de enfocar el estudio en las células del EPR es debido a que al ser esta la capa más externa sometida a un constante estrés oxidativo por factores externos (p.ej., luz solar), una mejor comprensión de los procesos biológicos involucrados con estas células puede aportar información adicional sobre el inicio y desarrollo de la DMAE. Se sabe que altos niveles de estrés oxidativo derivan en una respuesta inflamatoria crónica que provoca en gran medida la aparición de la DMAE (debido a la degeneración y muerte de las células fotorreceptoras). Durante el estrés oxidativo y la posterior inflamación, proteínas relevantes (p.ej., las MTs o la APOE) muestran cambios en sus niveles de expresión<sup>13,14</sup>. Por ello, ensayar diferentes tratamientos inflamatorios en células de EPR inmortalizadas y estudiar los posibles cambios en la expresión de las proteínas puede proporcionar información relevante directamente relacionada con la DMAE.

Sin embargo, la gran heterogeneidad biológica limita muchos ensayos y en concreto aquellos que implican estudios a nivel celular. Es bien sabido que las células aun siendo de un mismo tipo, incluso bajo las mismas condiciones fisiológicas o estímulos externos, pueden responder de manera diferente, generando variaciones a nivel de célula a célula<sup>15</sup>. Por lo tanto, el desarrollo de metodologías analíticas capaces de estudiar el contenido de metales y biomoléculas a nivel de células individuales es un campo de gran interés actualmente.

---

<sup>13</sup> A. Álvarez-Barrios, L. Álvarez, M. García, E. Artime, R. Pereiro, H. González-Iglesias, Antioxidant Defenses in the Human Eye: A Focus on Metallothioneins. *Antioxidants* 11, (2021), 11-89.

<sup>14</sup> M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between Apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration. *Life* 11, (2021), 635.

<sup>15</sup> P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells. *Anal Chem.* 91, (2019), 588-621.

## F.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Capítulo III es el desarrollo de una estrategia de cuantificación de proteínas en células individuales del epitelio pigmentario de la retina (línea celular HRPEsv40) combinando metodologías de IHC en las que se emplean inmunosondas marcadas con AuNCs y LA-ICP-MS. Este objetivo general se llevará a cabo a través de las siguientes etapas experimentales:

1. Síntesis de las inmunosondas específicas para IHC.
  - a. Búsqueda de una ruta sintética de AuNCs que logre disminuir la desviación asociada a la dispersión de tamaños de las nanoestructuras.
  - b. Síntesis y caracterización de las inmunosondas específicas de las proteínas MT2A y APOE: Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs.
2. Optimización de los cultivos celulares HRPEsv40. Estudio de diferentes tratamientos inflamatorios y tiempo de incubación en los niveles de expresión de las proteínas MT2A y APOE mediante RT-qPCR (expresión genética) y ELISA cuantitativos (expresión proteica).
3. *Bioimaging* de la distribución de las proteínas MT2A y APOE en las células HRPEsv40 control y sometidas al tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$  mediante dos estrategias:
  - a. IHC directa empleando (de manera independiente) las inmunosondas metálicas sintetizadas y detección elemental LA-ICP-MS.
  - b. IHC indirecto con detección fluorescente empleando anticuerpos secundarios con fluoróforo Alexa® 594 y Alexa® 488, para la detección de MT2A y APOE respectivamente.
    - i. Estudio de la concentración de anticuerpo primario
    - ii. Validación de la distribución de las proteínas encontrada por LA-ICP-MS.

4. Estudio de la penetración de la inmunosonda en las células y obtención de una distribución transversal mediante medidas de inmunofluorescencia empleando IHC directa con los AuNCs como marcas fluorescentes o los fluoróforos Alexa® 488.
5. Estudio de las interacciones inespecíficas de los AuNCs en las células individuales mediante medida por fluorescencia.
6. Desarrollo de la estrategia de cuantificación por LA-ICP-MS de las proteínas MT2A y APOE en las células individuales de HRPEsv40 control y sometidas a tratamiento inflamatorio con IL1 $\alpha$  durante 48 h.
  - a. Generación de los patrones de calibración para llevar a cabo una estrategia *matrix-matched*.
    - i. HRPEsv40 suplementadas con diferentes concentraciones de AuNCs (0, 5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) durante 24 h.
    - ii. Caracterización elemental de los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs mediante ICP-MS para conocer el contenido de oro.
  - b. Transformación de los *biomimaging*s unicelulares de las proteínas bajo estudio en las células HRPEsv40 control y tratadas de intensidades cualitativas de  $^{197}\text{Au}$  a concentración de proteína (MT2A o APOE) por célula ablacionada. Tratamiento de datos mediante el software Iolite (v4)
7. Validación de los resultados de concentración de proteína por célula con los obtenidos en células lisadas por cuantificación por inmunoensayo ELISA comerciales.

---

## F.3. EXPERIMENTAL

### F.3.1. Materiales y reactivos

En esta Sección se detallan los materiales y reactivos específicos empleados en el desarrollo del Capítulo III de la Tesis Doctoral. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que la mayor parte de los reactivos han sido previamente recogidos en el Experimental General.

#### F.3.1.1. Síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas

Los reactivos para la síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas metálicas se recogen en la **Sección C.2.2.1**. Sin embargo, en el Capítulo III se llevan a cabo diferentes estrategias de síntesis para los AuNCs con el objetivo de disminuir la desviación asociada a su diámetro. A continuación, se recogen los reactivos empleados durante estos ensayos:

**Síntesis de AuNCs.** Se empleó  $\text{NaAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (99% polvo; Sigma-Aldrich) como sal precursora del metal. Como agentes de estabilización se evaluaron el ácido lipoico – AL (> 98% en polvo; Across Organics), ácido dihidrolipoico (DHLA), y L-glutación reducido – GSH (>98% polvo; Sigma-Aldrich). Como reductor se empleó  $\text{NaBH}_4$  (> 98% polvo; Sigma-Aldrich). Además, se utilizaron diferentes disolventes, como propan-2-ol (Fisher Scientific), acetona y metanol (ambos de VWR chemicals).

**Síntesis de las inmunosondas metálicas.:** Los anticuerpos primarios empleados para la síntesis de las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs son:

- Anticuerpo policlonal de cabra contra la APOE (Anti-h-APOE) de Fisher Scientific.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la MT2A (Anti-h-MT2A) de la casa comercial Cloud Clone Corporation.

### F.3.1.2. Cultivo y expansión de la línea celular y tratamientos inflamatorios de las células

Los reactivos empleados durante la expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular de células inmortalizadas del epitelio pigmentario de la reina (HRPEsv40) está descrito en la **Sección C.4.7**. Adicionalmente, en este Capítulo III se evalúan diferentes tratamientos inflamatorios en las células HRPEsv40 con el objetivo de estudiar la expresión de las proteínas bajo su efecto. Los reactivos empleados durante este estudio fueron el factor de crecimiento transformante beta humana recombinante (TGF $\beta$ 1) y la dexametasona (DEX), ambos de Sigma Aldrich, y la citoquina Interleuquina-1 $\alpha$  humana recombinante (IL1 $\alpha$ , Gold Bio).

### F.3.1.3. Protocolos de inmunocitoquímica

Los reactivos generales necesarios para llevar a cabo los protocolos de ICC en las células inmortalizadas tanto por IF convencional como empleando los AuNCs como marcas están recogidos en la **Sección C.2.2.4**. A fin de aplicar los protocolos de ICC, sean estos para realizar una detección por fluorescencia o elemental empleando LA-ICP-MS, las células se hacen crecer en dispositivos portaobjetos con el sistema Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Thermo Fisher Scientific). Este tipo de soporte se denominará “cámaras portaobjetos” a lo largo del Capítulo III.

En los protocolos de ICC por IF indirecta siguiendo la emisión del fluoróforo Alexa® se emplearon los anticuerpos primarios sin AuNCs y, adicionalmente, se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo Alexa® Fluor Plus (A32731 y A32814): IgG de cabra anti suero de conejo:Alexa® 594 (emisión en el rojo) e IgG de burro anti suero de cabra:Alexa® 488 (emisión en el verde) para la detección de los anticuerpos Anti-h-MT2A y Anti-h-APOE, respectivamente.

### F.3.1.4. Análisis mediante RT-qPCR

Para conocer la expresión génica de la MT2A y APOE en las células HRPEsv40 bajo el efecto de diferentes tratamientos inflamatorios, se llevó a cabo la

reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). El material y reactivos necesarios para estos análisis incluye el RNeasy Mini Kit (Quiagen) que proporciona los reactivos y material necesarios para el lisado (buffer de lisis) de las células y posterior aislamiento del contenido total de ARN. Para evaluar la calidad y la concentración del ARN se usó el espectrofotómetro Picodrop™ (Picodrop Limited). El kit "High Capacity RNA-to-cDNA" (Applied Biosystems, Thermo Fisher) se usó para obtener el ADN complementario a partir del RNA utilizando la enzima transcriptasa inversa, en el termociclador. La expresión de los genes de MT2A (Hs02379661\_g1) y APOE (Hs00171168\_m1) se determinó en un sistema de RT-PCR 7500 empleando la sonda fluorescente TaqMan® (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Adicionalmente, se utilizó el gen beta de la glucoronidasa (GUSB; Hs00939627\_m1) como control endógeno (cuantificación relativa).

#### **F.3.1.5. Kits ELISA cuantitativos para la MT2A y APOE**

Se emplearon dos kits comerciales de ensayo inmunoenzimático de Cloud-Clone Corporation para la determinación de la concentración de MT2A (SEB868Hu 96 Tests) y APOE (SEA704Hu 96 Tests) en las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 (tanto en las células control como en las tratadas con IL1 $\alpha$ ). Además, el tampón Tris-HCl (pH 7,4) (Sigma Aldrich) fue usado para suspender el *pellet* celular justo antes de realizar la lisis de las células con la sonda de ultrasonidos con el objetivo de extraer el contenido citosólico (i.e., para obtener la muestra que se analiza con el kit ELISA).

#### **F.3.2. Instrumentación**

Los sistemas de ablación láser e ICP-MS utilizados para el desarrollo experimental de este capítulo están descritos con detalle en la Instrumentación General. A modo de resumen, a continuación, se recogen los equipos empleados para cada análisis, así como las condiciones de trabajo.

Para llevar a cabo el análisis elemental por ICP-MS con nebulización convencional y determinar la concentración de Au (tanto en los lisados celulares de los patrones unicelulares como durante la caracterización de las inmunosondas) se empleó el ICP-MS 7900 (Agilent). Para obtener el *imaging* con la distribución de APOE y MT2A en las células por LA-ICP-MS (siguiendo la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  de los AuNCs empleados como etiqueta en las inmunosondas), se empleó el sistema de ablación tipo excímero NWR193 (Elemental Scientific - ESI) equipado con una celda de ablación de dos volúmenes (TwoVol2 Ablation Cell, ESI). Este sistema se usó para el análisis de células individuales HRPEsv40 fijadas en las cámaras portaobjetos, tanto las células HRPEsv40@AuNCs empleadas como patrones de calibración como las células HRPEsv40 sometidas al ensayo ICC con las inmunosondas. Las condiciones de trabajo empleadas, tanto para los análisis por ICP-MS como por LA-ICP-MS, están recogidas en la **Tabla 12**.

**Tabla 12:** Condiciones seleccionadas para el análisis por nebulización convencional ICP-MS (lisados celulares e inmunosondas metálicas) y para los estudios de *imaging* por LA-ICP-MS con las células HRPEsv40 (control y tratadas con IL1 $\alpha$ ) y los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs.

Parámetro (7900 Agilent ICP-MS)	Valor
RF – ICP (W)	1500
Flujo de Ar - plasma (mL min <sup>-1</sup> )	18
Flujo de Ar - nebulizador (mL min <sup>-1</sup> )	0,9 (ICP-MS)
Flujo de Ar – auxiliar (mL min <sup>-1</sup> )	0,75 (LA-ICP-MS)
Isótopos monitorizados (m/z)	$^{197}\text{Au}$ , $^{195}\text{Pt}$ (patrón interno)
<i>Dwell time</i> (ms)	100 (ICP-MS) o 50 (LA-ICP-MS)
Parameter (NWR193 ESI - LA)	Valor
Diámetro haz láser ( $\mu\text{m}$ )	6
Velocidad de barrido ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	5
Energía láser, fluencia ( $\text{J cm}^{-2}$ )	0,3 (5%)
Frecuencia de repetición (Hz)	20

Par el procesamiento de los datos (construcción de imágenes 2D de la distribución de  $^{197}\text{Au}^+$  en células HRPEsv40 individuales, histogramas, y selección de las regiones celulares en píxeles) se empleó el software Iolite (v4). En todos los casos, el

*imaging* 2D fue construido aplicando el gradiente térmico como paleta de color y se aplicó un filtro de expansión por interpolación para el tratamiento de los datos.

Paralelamente, para el estudio de la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40 mediante detección por fluorescencia, se empleó un microscopio láser confocal (TCS-SP8X; Leica) con un objetivo de inmersión en aceite de 63x. Se obtuvieron imágenes con resolución tanto lateral (eje XY) como en profundidad (eje YZ o XZ). Los ajustes de adquisición son los mismos que los empleados en el Capítulo II de la Tesis Doctoral (fluoróforos: AuNCs y DAPI).

### F.3.3. Procedimientos experimentales

#### F.3.3.1. Protocolo para la síntesis de AuNCs monodispersos

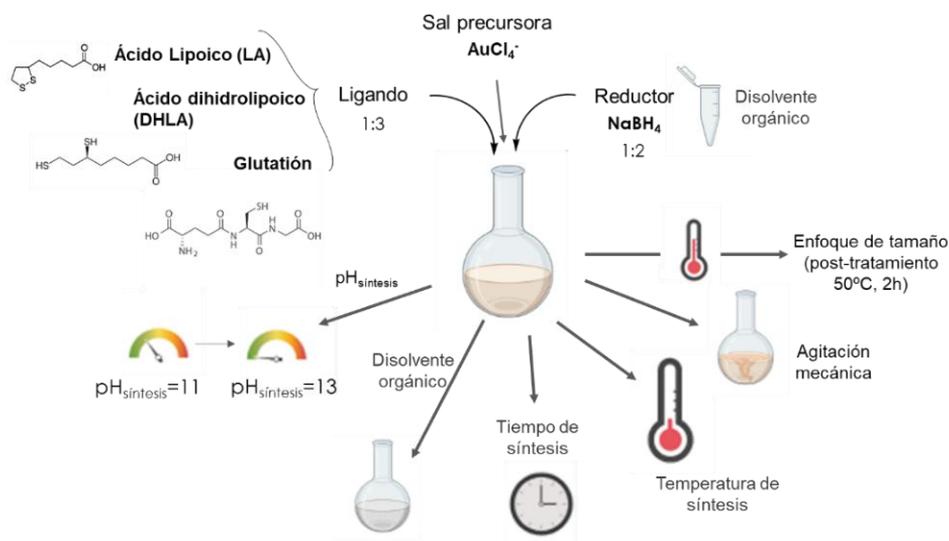
El protocolo de síntesis para obtener AuNCs con baja dispersión de tamaños (empleados en los Capítulos III y IV de la Tesis Doctoral) está recogido en la Sección de Procedimientos Generales. Se trata de una síntesis *bottom-up* con un ligando tiolado como agente estabilizante y NaBH<sub>4</sub> como reductor. Sin embargo, con el objetivo de reducir la dispersión asociada al diámetro de los AuNCs obtenida previamente con otra síntesis (AuNCs empleados en el Capítulo II), se evaluaron diferentes parámetros experimentales partiendo de los AuNCs previamente sintetizados<sup>16</sup>. En la **Figura 66** se resumen las estrategias ensayadas. Por una parte, con el objetivo de reducir la cinética de la reacción de reducción y tener un mayor control de la síntesis se evaluaron diferentes condiciones, como la temperatura de la síntesis (25°C y 8°C), el disolvente de la síntesis (agua o metanol), el disolvente utilizado para disolver el agente reductor (acetona o metanol), el pH de la síntesis (se evaluó un pH más básico), el tiempo de reacción, y el efecto que produce la disminución de la agitación durante la formación de los AuNCs (menos rpm). Adicionalmente, se evaluaron dos ligandos tiol: DHLA y GSH. Finalmente, se evaluó un post-tratamiento de los AuNCs recién sintetizados. En concreto, los AuNCs polidispersos se sometieron a

---

<sup>16</sup> M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* 197, (2019), 413-421.

un tratamiento de “enfoque de tamaño” para formar AuNCs monodispersos incubando la síntesis a 50°C durante 2 h.

Los AuNCs sintetizados fueron caracterizados en todos los casos siguiendo las etapas descritas en el Experimental General (**Sección C.4.3**): medidas por DLS para comprobar su índice de polidispersidad (PDI), medida de la emisión fluorescente ( $\lambda_{em}$ , 720 nm), y caracterización elemental por ICP-MS (se determinó el rendimiento de la síntesis y la concentración de Au en la suspensión coloidal). Finalmente, las síntesis de AuNCs seleccionadas se midieron por HR-TEM para conocer el tamaño y estructura cristalina de los AuNCs (de manera similar a la caracterización llevada a cabo en el Capítulo I para los PtNCs).



**Figura 66:** Esquema resumen de las diferentes estrategias ensayadas para la síntesis (bottom-up) de AuNCs monodispersos.

### F.3.3.2. Síntesis y caracterización de las inmunosondas

Los AuNCs monodispersos fueron empleados como etiquetas de dos anticuerpos específicos para la detección de APOE y MT2A (Anti-h-APOE o Anti-h-MT2A). La bioconjugación se llevó a cabo siguiendo el método de la carbodiimida,

empleando una relación molar 1:3 Ab:AuNCs. Tras la purificación por ultracentrifugación, las inmunosondas fueron caracterizadas a fin de determinar su estequiometría (i.e., el factor de amplificación). Al igual que se describe en el Capítulo II para la caracterización de las inmunosondas con PtNCs, AuNCs y AgNCs, se realizó un ensayo ELISA directo con una proteína IgG de concentración conocida como estándar de calibración (concentraciones de 0 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) con el que determinar la concentración de Ab disponible en la inmunosonda tras la bioconjugación. Además, determinó la concentración de Au en la inmunosonda mediante su análisis elemental por ICP-MS. Para ello, se realizó un calibrado externo de Au (de 0-20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) con Pt como patrón interno (5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### **F.3.3.3. Cultivo de células HRPEsv40 y tratamientos inflamatorios**

Las células HRPEsv40 se sembraron en diferentes soportes (p.ej., frascos, placas de 6 pocillos, o cámaras portaobjetos) y a diferentes niveles de concentración (rango entre  $6\cdot 10^4$  -  $20\cdot 10^6$  células/pocillo) dependiendo del tipo de ensayo a realizar: ensayo ELISA, RT-qPCR, medidas por fluorescencia, nebulización convencional ICP-MS, o LA-ICP-MS. Para una mejor comprensión de las diferentes condiciones celulares empleadas, en la **Tabla 13** se recoge de manera resumida el número de células, el tipo de soporte, y el procesamiento de las células para cada tipo de ensayo llevado a cabo en este Capítulo III de la Tesis Doctoral.

**Tabla 13:** Resumen de los diferentes experimentos llevados a cabo con las células HRPEsv40. En la Tabla se recoge el soporte empleado para el crecimiento celular, el número de células, y las etapas de procesamiento celular necesarias para realizar los diferentes experimentos. Trip.: tripsinización (tripsina-EDTA al 0,25%), Extr.: extracción.

Experimento	Soporte celular	Nº de células	Procesamiento celular	Denominación de la muestra
<b>Inmunoensayo ELISA</b>	Flask T125	20·10 <sup>6</sup> células/flask	Trip. + lisado	Facción citosólica
<b>RT-qPCR</b>	Placa p6	1,2·10 <sup>6</sup> células/pocillo	Trip. + lisado + Extr. RNA	DNA complementario
<b>Imaging celular (fluorescencia/LA-ICP-MS)</b>	Cámara portaobjetos	6·10 <sup>4</sup> células/pocillo	Fijación (4% PFA)	Células intactas en portaobjetos
<b>Patrones HRPEsv40@AuNCs (LA-ICP-MS)</b>	Cámara portaobjetos	6·10 <sup>4</sup> células/pocillo	Fijación (4% PFA)	Células intactas en portaobjetos
<b>Patrones HRPEsv40@AuNCs (ICP-MS)</b>	Placa p6	1,2·10 <sup>6</sup> células/pocillo	Fijación (4% PFA) + Trip. + digestión ácida	Células digeridas

Los protocolos, tanto de crecimiento y expansión de la línea celular, como para la etapa de tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$  están recogidos en el Experimental General (**Sección C.4.7**). Adicionalmente se investigaron también otros tratamientos inflamatorios con las células para seleccionar aquel que provoca un mayor cambio en la expresión de las proteínas bajo estudio (APOE y MT2A). A continuación, se describe el protocolo de manera resumida. Una vez las células HRPEsv40 alcanzan el 80% de confluencia en el soporte deseado, se les retira el medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S), se lavan con PBS1x, y se les añade el medio libre de suero Hibridoma<sup>TM</sup> (suplementado con 5% de L-glutamina y 1% de P/S). Transcurridas 24 h (para asegurar que las células se adaptan al nuevo medio), estas son tratadas con el reactivo inflamatorio elegido en cada caso (**Tabla 14**). Paralelamente, en todos los diseños experimentales llevados a cabo (exceptuando los patrones unicelulares de calibración) se prepara un control celular (CT), es decir, células HRPEsv40 sin tratamiento. Para ello se mantienen en el medio libre de suero Hibridoma<sup>TM</sup> (5% de L-glutamina y 1% +P/S) durante 24 o 48 h. Trascurrido este tiempo, las células se lavan con PBS1x, y se preparan/procesan dependiendo del ensayo.

**Tabla 14:** Resumen de los diferentes tratamientos inflamatorios ensayados con las células HRPEsv40. TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta humana recombinante, DEX: Dexametasona, IL-1α: Interleuquina-1α humana recombinante.

Experimento	Tratamiento inflamatorio			Objetivo
	Reactivo	[Reactivo] (ng·mL <sup>-1</sup> )	Tiempo (h)	
RT-qPCR	TGFβ1	10, 60 y 120	24	Elección de tratamiento inflamatorio
	IL1α	100	24 y 48	
	DEX	118, 235 y 392	24	
Inmunoensayo ELISA	IL1α	100	24 y 48	Evaluación del tiempo
Imaging fluorescencia	IL1α	100	48	Localización APOE y MT2A
Imaging LA-ICP-MS	IL1α	100	48	Localización & cuantificación APOE y MT2A

#### F.3.3.4. Preparación de las células HRPEsv40 para RT-qPCR

La muestra necesaria para realizar las medidas de qRT-PCR es el DNA complementario (Tabla 13). Para su obtención, a partir de las células HRPEsv40 sembradas en las placas p6 (~1,2·10<sup>6</sup> células por pocillo), tanto no tratadas (control) como tratadas (3 réplicas por condición - Tabla 14) se siguieron las siguientes etapas:

- (1) Lisis de las células. Se añadieron 350 μL del tampón de lisis proporcionado por el kit comercial (RNeasy Mini Kit) que despega y lisa directamente las células en los pocillos. Se recogió el contenido en tubos Eppendorf (libres de RNAsas) y, posteriormente, se aisló el contenido total de ARN siguiendo las instrucciones y empleando los reactivos del Kit.
- (2) Determinación de la concentración y calidad del RNA extraído. Para ello se midió la relación de absorbancias medidas a 260 nm y 280 nm con el espectrofotómetro Picodrop™ (valores entre 2,0-2,2 unidades indican

buena calidad del ARN), y se utilizó una concentración conocida de BSA como estándar de calibración.

- (3) Obtención de ADN complementario. Se toma 1 µg de ARN (de cada condición y réplica) y se transcribe a ADN complementario (ADNc) mediante la enzima transcriptasa inversa ("High Capacity RNA-to-cDNA") utilizando el siguiente protocolo: 5 min a 25°C, 90 min a 37°C, y 5 min a 95°C en el termociclador.
- (4) Realización de la RT-qPCR. La expresión génica de APOE y MT2A se determinó mediante detección fluorescente de los ciclos de expresión utilizando la sonda fluorescente TaqMan®. Todas las amplificaciones PCR se realizaron mediante el siguiente protocolo: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los ciclos de PCR obtenidos para cada gen (APOE o MT2A) se compararon con un gen control endógeno (gen GUSB) realizando cada medida por triplicado.

Durante el manejo de las muestras, estas se mantuvieron en hielo todo el tiempo, y se empleó material y reactivos libres de ARNsas.

### F.3.3.5. Preparación de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante inmunoensayo ELISA

La cuantificación de APOE y MT2A empleando los kits comerciales ELISA se llevaron a cabo en las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 (**Tabla 13**). Para ello, una vez transcurridas las 24 ó 48 h de tratamiento inflamatorio con citoquina IL1 $\alpha$  (**Tabla 14**), las células son recolectadas y procesadas de la siguiente manera:

- (1) Tripsinización y recolección del *pellet* celular. Se añaden 6 mL de tripsina-EDTA al 0,25% a las células sembradas en los *flask* T125, se incubaron durante 3 min (37°C en 5% de CO<sub>2</sub>) y, posteriormente, se añadieron 20 mL por *flask* de DMENF12 para detener la actividad de la tripsina (y evitar así el lisado de las células). El contenido de cada *flask* (1 *flask* por

condición, n=3) se recogió en diferentes tubos falcon y se aisló el *pellet* celular mediante centrifugación suave (3 min a 1176 g), descartando el sobrenadante. Por último, para eliminar las células muertas, el *pellet* se lavó una vez con PBS1x, y se descartó el sobrenadante tras su centrifugación (3 min a 1176 g).

- (2) **Conteo celular.** Se realiza el conteo manual de las células con el hemocitómetro para llevar a cabo la posterior normalización de los resultados. Para ello las células son suspendidas en PBS1x. Tras llevar a cabo el conteo, se retira el PBS1x mediante centrifugación suave.
- (3) **Lisado mecánico del *pellet* celular.** Se añaden 500  $\mu$ L de tampón Tris-HCl (pH 7,4) para resuspender el *pellet* celular justo antes de realizar la lisis celular empleando la sonda de ultrasonidos. Para ello, los *pellets* celulares se sometieron a ciclos de ultrasonidos de 10 kHz de forma intermitente durante 30 s (3 veces) en un baño con hielo. A continuación, se centrifugó el lisado celular (15300 g x 30 min a 4°C) para separar la fracción citosólica de la membrana celular.
- (4) Finalmente, se recogió el sobrenadante (fracción citosólica) y se almacenó a -80°C para la cuantificación de APOE y MT2A con los kits ELISA, mientras que el *pellet* (membrana celular) se desechó.

#### F.3.3.6. Preparación de las células HRPEsv40 para ICC

Para llevar a cabo los procesos de ICC en las células HRPEsv40, tal y como se describe en la **Tabla 13**, las células fueron sembradas en las cámaras portaobjetos en una concentración de  $6 \cdot 10^4$  células por pocillo, con el objetivo de tener una monocapa de células individuales. Tras someterlas al tratamiento proinflamatorio con IL-1 $\alpha$  durante 48 h (o sin tratamiento, células control 48 h, **Tabla 14**), se retira el medio mediante drenaje y se lava con PBS 1x. Posteriormente, y previo a la ICC, las células deben ser fijadas. Para ello se añadieron 400  $\mu$ L de paraformaldehído al 4%

(PFA 4 %) a cada pocillo y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el contenido y se procedió a su lavado añadiendo PBS 1x (3 veces). Las células se dejaron con 200  $\mu$ L de PBS 1x y en nevera (4°C) hasta su uso.

### F.3.3.7. Protocolo de ICC para la inmunolocalización de APOE y MT2A en células HRPEsv40 fijadas

#### □ ICC empleando las inmunosondas con AuNCs

Los ensayos ICC para la determinación de las dos proteínas citosólicas seleccionadas en células HRPEsv40 se llevaron a cabo utilizando una estrategia de biomarcador único usando de manera secuencial (i.e., en dos muestras diferentes de células) las dos inmunosondas metálicas sintetizadas (Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs), tanto en células control (CT) como en células sometidas al tratamiento con IL1 $\alpha$  durante 48 h (**Tabla 14**). A continuación, se detallan las etapas del protocolo ICC llevado a cabo, donde se indica también las etapas adicionales dependiendo de cómo se realiza la detección de las proteínas; ICC con detección directa de la fluorescencia (se emplean las inmunosondas marcadas con AuNCs y se detecta la fluorescencia de los AuNCs por microscopía confocal) o detección elemental por LA-ICP-MS siguiendo la intensidad de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (AuNCs).

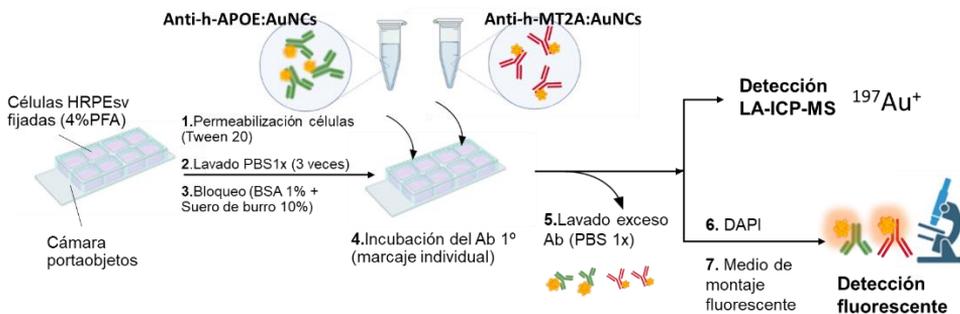
Las etapas comunes del protocolo ICC (**Figura 67**) incluyen:

- (1) Permeabilización de las membranas celulares empleando 400  $\mu$ L de PBS con 0,1% de Triton X-100 durante 30 min.
- (2) Lavado (3 veces) con 400  $\mu$ L de PBS-0,05% de tween-20.
- (3) Bloqueo: adición de 400  $\mu$ L de PBS con 10% de suero de burro y 1% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente.
- (4) Incubación durante la noche a 4°C de las inmunosondas con AuNCs (400  $\mu$ L de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Anti-h-APOE:AuNCs o 400  $\mu$ L de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Anti-h-MT2A:AuNCs, concentración relativa al Ab) en PBS con 5% de suero de burro y 1% de BSA.
- (5) Lavado con 400  $\mu$ L de PBS (3 veces).

En el caso del ICC directo con detección elemental (LA-ICP-MS) las células HRPEsv40 se mantuvieron en PBS1x en las cámaras portaobjetos hasta su análisis para garantizar la integridad celular (el PBS se retiró justo antes del análisis por LA-ICP-MS).

En el caso del ICC directo con detección fluorescente (microscopía láser confocal) se deben añadir dos etapas al protocolo anterior:

- (6) Tinción con 4',6-diamino fenilindol (DAPI) durante 10 min (temperatura ambiente y oscuridad) para la visualización de los núcleos celulares.
- (7) Lavado con PBS y adición de una gota de medio de montaje de fluorescencia para finalmente colocar un cubreobjetos sobre cada muestra y poder medirla por microscopía confocal.



**Figura 67:** Etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección de los AuNCs por LA-ICP-MS o fluorescencia empleando las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs.

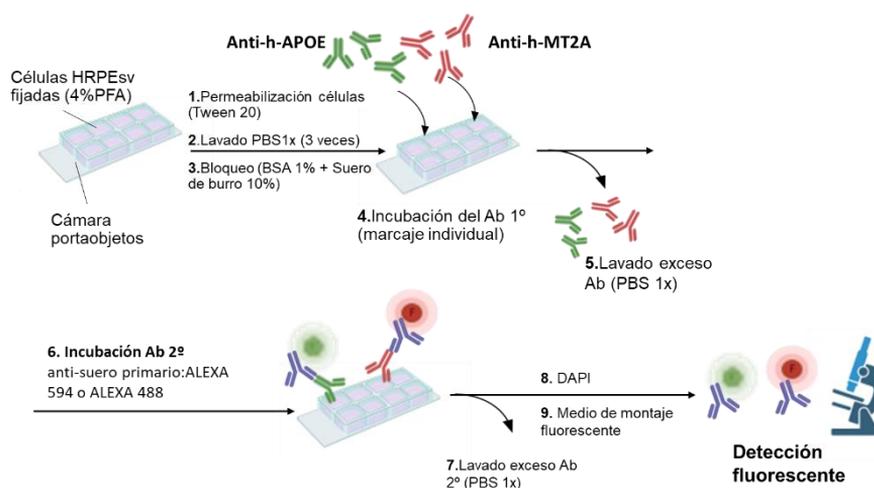
Indicar que además se prepararon controles negativos tanto para las células HRPEsv40 control como para las tratadas con IL1 $\alpha$ . Estos controles incluyeron la adición de AuNCs sin el Ab primario para evaluar la existencia de posibles interacciones inespecíficas de los AuNCs.

### □ ICC indirecto para la detección fluorescente empleando Alexa®

Este ensayo se realizó para determinar la concentración óptima de los anticuerpos primarios empleados en el ensayo ICC directo, así como para validar la distribución de la APOE y MT2A encontradas por la metodología de análisis desarrollada en este Capítulo III donde las proteínas se determinan por LA-ICP-MS. El protocolo incluye todas las etapas previamente descritas para el ICC directo (etapas 1-5), teniendo en cuenta que, en la etapa 4 en vez de las inmunosondas marcadas con AuNCs, se incuban los anticuerpos sin bioconjugador (Anti-h-APOE o Anti-h-MT2A:AuNCs). En la **Figura 68** se resumen las etapas llevadas a cabo para el protocolo ICC indirecto.

Los pasos adicionales para la detección indirecta de la fluorescencia incluyen:

- (6) Incubación con el Ab secundario IgG de cabra anti suero de conejo:Alexa® 594 e IgG de burro anti suero de cabra:Alexa® 488 para detectar respectivamente los Ab primarios Anti-h-MT2A y Anti-h-APOE (2 h a temperatura ambiente y en oscuridad).
- (7) Lavado 3 veces con PBS.
- (8) Adición de la tinción DAPI durante 10 min (temperatura ambiente y oscuridad) para la localización de los núcleos celulares.
- (9) Lavado con PBS.
- (10) Adición de una gota de medio de montaje de fluorescencia para colocar un cubreobjetos sobre cada muestra.

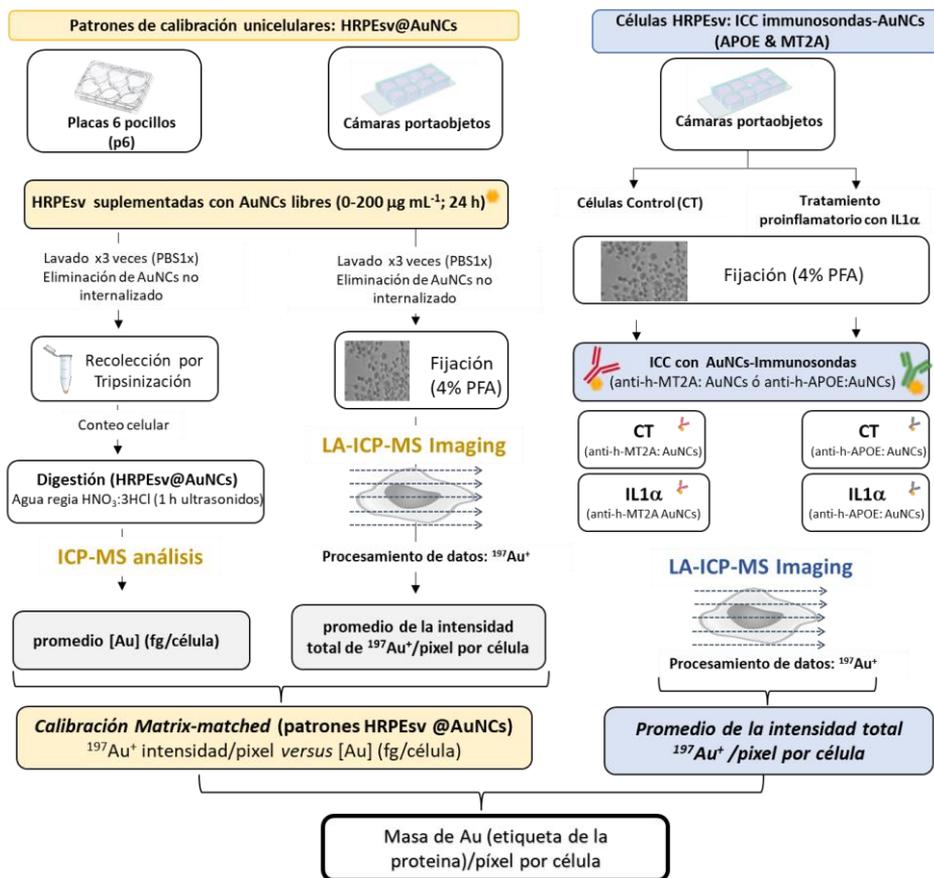


**Figura 68:** Esquema de las etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección indirecta empleando anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa®.

En este caso, en los controles negativos no se añadió el Ab primario para evaluar la especificidad del Ab secundario y asegurar así que la fluorescencia detectada sólo procede de las proteínas de interés.

### F.3.3.8. *Imaging* de proteínas en células individuales mediante LA-ICP-MS

Las células HRPEsv40 sometidas al ensayo ICC con las inmunosondas metálicas (Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2:AuNCs) fueron analizadas por LA-ICP-MS con las condiciones optimizadas recogidas en la **Tabla 12**. De esta manera, se obtuvo el *imaging* con la distribución de APOE o MT2A en cada célula individual siguiendo la señal de la marca metálica ( $^{197}\text{Au}^+$ ), tanto para células HRPEsv40 control como sometidas a tratamiento inflamatorio con  $\text{IL1}\alpha$ . Las imágenes 2D se construyeron a partir de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  para cada célula individual utilizando el software Iolite (v4). Además, el programa permitió conocer la intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  total para el *imaging* de cada célula individual y conocer el número de píxeles que ocupa cada célula. De esta manera, se obtuvieron valores para la intensidad total de Au normalizada por píxel, para cada célula analizada por LA-ICP-MS. En el esquema de la **Figura 69** en azul se resumen las etapas que se deben llevar a cabo para obtener el *imaging* de cada proteína en cada célula.



**Figura 69:** Resumen de las etapas necesarias para llevar a cabo la determinación de proteínas (APOE y MT2A) en células HRPEsv40 empleando LA-ICP-MS y marcaje de las células con AuNCs. La estrategia de calibración propuesta está basada en la síntesis y caracterización de patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs con la misma matriz de la muestra. A la izquierda (en naranja) se resumen las etapas necesarias para preparar y caracterizar los patrones de calibración unicelulares, y a la derecha (en azul) los pasos seguidos para obtener el imaging con la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40.

### F.3.3.9. Preparación de los patrones de calibración unicelulares (HRPEsv40@AuNCs)

Con el fin de realizar una calibración con patrones *matrix-matched* por LA-ICP-MS, se propone la preparación en el laboratorio de patrones unicelulares empleando las mismas células que las células que son analizadas como muestra (HRPEsv40). Para ello, una vez las células han crecido en los soportes adecuados (ver **Tabla 13**) y

siguiendo el protocolo de expansión y crecimiento celular descrito en la **Sección C.4.7**, estas fueron suplementadas con diferentes concentraciones de una suspensión de AuNCs libres (i.e., sin bioconjugarse con ningún Ab). Para la internalización de los AuNCs por parte de las células HRPEsv40, se emplearon suspensiones de AuNCs con una concentración de 0, 5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (suspensiones de AuNCs en medio rico en suero DMEMF12) durante 24 h siguiendo un protocolo descrito previamente en la bibliografía<sup>17</sup>. Tras la internalización de los AuNCs, las células son tratadas de dos maneras diferentes: a) por un lado, las células son caracterizadas para determinar el contenido de Au promedio por célula en cada tratamiento de suplementación, y b) las células son fijadas en las cámaras portaobjetos para ser analizadas por LA-ICP-MS (en las mismas condiciones que las células HRPEsv40 donde se quiere determinar APOE y MT2A).

En la **Figura 69** (parte izquierda de la imagen), se detalla un esquema con la preparación y caracterización de los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs. Por un lado, con los patrones HRPEsv40@AuNCs se llevó a cabo un análisis por ICP-MS con nebulización convencional para determinar la concentración de Au en cada una de las células. Para ello, se recogieron las células HRPEsv40@AuNCs de las placas de 6 pocillos: 1) las células se incubaron con 0,5 mL/pocillo de 0,25% tripsina-EDTA (pH 7,4) dentro de la incubadora durante 3 min, 2) se añadieron 2 mL de medio completo DMEMF12 (+10% de FBSi +1% de P/S) para bloquear la actividad de la tripsina, 3) se recogió la suspensión celular en un tubo Eppendorf, 4) tras el lavado del *pellet* celular por centrifugación con PBS1x las células se contaron manualmente con el hemocitómetro, 5) posteriormente, se llevó a cabo la digestión celular utilizando agua regia. Para ello se añadieron 0,5 mL de agua regia ( $\text{HNO}_3:3\text{HCl}$ ) por *pellet* celular y, tras 1 h, se sometieron a vibración por ultrasonidos durante 2 h. Las digestiones de las células HRPEsv40@AuNCs se diluyeron finalmente con agua ul-

---

<sup>17</sup> X. Cai, H.H. Chen, C.L. Wang, S.T. Chen, S.F. Lai, C.C. Chien, Y.Y. Chen, I.M. Kempson, Y. Hwu, C.S. Yang, G. Margaritondo, Imaging the cellular uptake of tiopronin-modified gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem.* 401, (2011), 809-816.

trapura, hasta una concentración adecuada para su análisis por ICP-MS. Para determinar el contenido de Au en cada una de las poblaciones celulares (HRPEsv40 células suplementadas con diferentes concentraciones de AuNCs), se realizó una calibración externa con estándares de Au en disolución, utilizando Pt como patrón interno. La concentración de Au encontrada por ICP-MS para cada una de las poblaciones celulares se normalizó teniendo en cuenta el número de células.

Por otro lado, los patrones de células HRPEsv40@AuNCs fijadas en las cámaras portaobjetos fueron analizados individualmente por LA-ICP-MS. Las células fijadas (cultivadas y tratadas en los portaobjetos) se almacenaron en el frigorífico con un pequeño volumen de PBS ( $\sim 200 \mu\text{L}$ ) para evitar su secado y rotura celular. Tal y como se ha detallado, en el caso de las muestras, justo antes de ser analizadas por LA-ICP-MS se deben retirar las paredes de la cámara portaobjetos y se drena cuidadosamente el PBS1x. Para el análisis de los patrones HRPEsv40@AuNCs se analizaron  $\sim 30$  células individuales para cada concentración suplementada con AuNCs. Como se muestra en la **Figura 69**, tras el análisis de las células por LA-ICP-MS es posible construir una imagen 2D de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  para cada célula individual utilizando el software Iolite (v4), y de este modo determinar la intensidad promedio de  $^{197}\text{Au}^+$  por píxel en cada célula.

## F.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

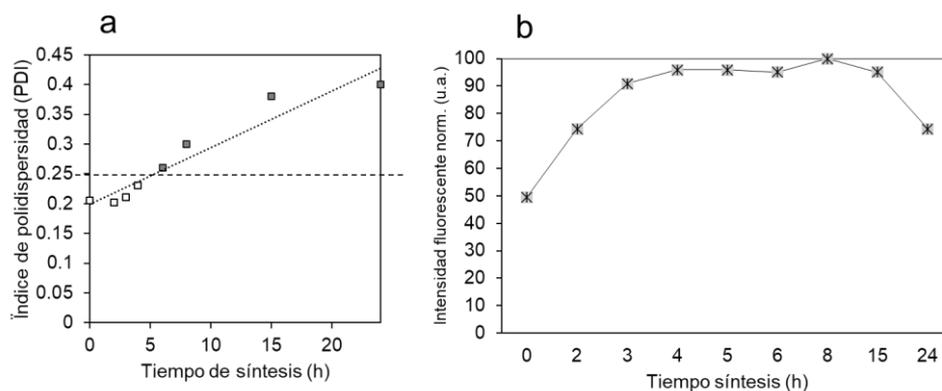
A continuación, se detallan los resultados experimentales obtenidos para el Capítulo III, divididos en tres secciones: 1) síntesis de AuNCs homogéneos, así como caracterización de su tamaño, 2) estudios relacionados con los tratamientos inflamatorios de las células HRPEsv40, donde se evalúa la expresión de APOE y MT2A, y 3) desarrollo de una nueva estrategia de calibración *matrix-matched* empleando patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs para obtener el *imaging* cuantitativo de APOE y MT2A en células HRPEsv40 (CT & IL1 $\alpha$ ) empleando LA-ICP-MS e inmunosondas marcadas con AuNCs.

### F.4.1. Síntesis de AuNCs monodispersos

#### F.4.1.1. Evaluación del índice de polidispersidad (PDI)

El primer estudio realizado para la síntesis de AuNCs monodispersos fue la evaluación del tiempo de reacción. Para ello, se evaluaron diferentes tiempos de reacción en el rango de 0 a 24 h y detectando las diferentes disoluciones de AuNCs por DLS. Los resultados experimentales obtenidos mostraron que los tiempos de reacción más largos aumentan la dispersión del tamaño de los AuNCs: al disminuir el tiempo de reacción de 15 h a 4 h, se observó una mejora significativa del índice de polidispersidad (PDI) de 0,4 a 0,28. En la **Figura 70** se muestran los valores de PDI obtenidos para la síntesis de AuNCs hasta un tiempo de 24 h de reacción.

Por otra parte, también se midió la emisión de fluorescencia para cada una de las síntesis de AuNCs a los diferentes tiempos de reacción ( $\lambda_{\text{ex}} = 390$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 730$  nm). Como se muestra en la **Figura 70b**, se observó una mayor emisión de fluorescencia utilizando un tiempo de reacción entre 4-8 h frente a las síntesis que emplean tiempos más largos, confirmando así los valores observados para el PDI a bajos tiempos de reacción.



**Figura 70:** Caracterización de la síntesis de AuNCs empleando diferentes tiempos de reacción (temperatura ambiente). a) Índice de polidispersidad (PDI) en función del tiempo de síntesis, y b) Emisión fluorescente a 720 nm. La raya discontinua horizontal en la gráfica a, denota el nivel máximo al cual se considera una disolución coloidal moderadamente polidispersa (valores más altos de 0.25 no son aceptados)..

Una vez seleccionadas 4 h como tiempo máximo para la síntesis de AuNCs, se ensayaron varias estrategias para disminuir la cinética de reducción química. Tal y como se discutió en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, una elevada desviación de los tamaños está directamente asociada a un bajo control de la reacción de reducción química. El  $\text{NaBH}_4$  es un reductor fuerte y, por tanto, las reacciones son rápidas e incontroladas. En este contexto, se planteó la hipótesis de que una cinética más lenta de la reducción química puede permitir un mejor control en el crecimiento de los AuNCs, dando lugar a tamaños más homogéneos. De este modo, se utilizaron diferentes estrategias para disminuir el poder de reducción del agente reductor: emplear un medio más básico, disolventes orgánicos (metanol), o bajas temperaturas (síntesis a  $4^\circ\text{C}$  para disminuir el poder de reducción del agente reductor. Los resultados experimentales mostraron que sólo al aumentar el pH de la síntesis ( $\text{pH} = 13$ ) fue posible reducir el PDI hasta un valor de 0,12, siendo el PDI de la síntesis original de 0,4 ( $\text{pH}$  de 11 y un tiempo de reacción de 15 h), valor que indica una dispersión de tamaños moderada.

En cuanto al uso de diferentes ligandos tiolados, se confirmó que los tioles bidentados (p.ej., el ácido lipoico) son los que proporcionan un mejor control durante el crecimiento de las AuNCs. El uso del ácido lipoico, especialmente en su forma

reducida (i.e., DHLA), aseguró que los grupos sulfhidrilos estuvieran disponibles para la quimisorción directa en la superficie de Au. Las medidas por DLS de los AuNCs sintetizados con DHLA mostraron un PDI de 0,18. Por el contrario, el uso de ligandos monodentados (p.ej., GSH) para la síntesis de AuNCs mostró medidas de mala calidad por DLS: se encontraron poblaciones de diferentes tamaños, así como un valor de PDI >1 (altamente polidisperso).

La última estrategia evaluada para la síntesis de AuNCs monodispersos se basó en el empleo de un paso post-síntesis (denominado como etapa de envejecimiento, o de enfoque de tañamos), consistente en incubar los AuNCs sintetizados a 50°C durante 2 h (justo después de la síntesis). Este enfoque basado en estrategias *top-down*, produjo un reajuste de tamaño de los AuNCs polidispersos (PDI 0,38) hasta alcanzar un valor de PDI inferior a 0,1 (elevada monodispersión de la suspensión coloidal).

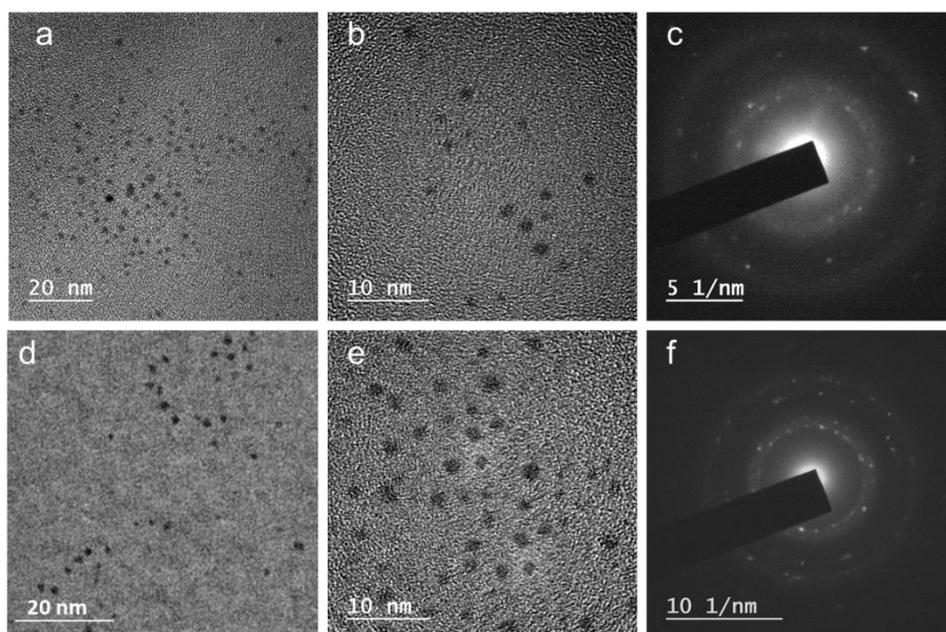
#### F.4.1.2. Caracterización estructural de los AuNCs@LA y AuNCS@DHLA

Las estrategias que mostraron resultados prometedores según el PDI (i.e., PDI bajos), fueron la síntesis empleando DHLA como ligando (AuNCs@DHLA) y la síntesis empleando LA con el tratamiento de enfoque de 2 h a 50°C (AuNCs@LA-*post-trat*). Por este motivo, ambas fueron caracterizadas por HR-TEM a fin de conocer su tamaño, dispersión, y esclarecer su estructura cristalina.

A partir de las micrografías obtenidas para cada síntesis (**Figura 71**), se miden con el programa Fiji-ImageJ los diámetros de las estructuras. Las imágenes de HR-TEM mostraron que los AuNCs@DHLA tienen un diámetro de  $1,99 \pm 0,04$  nm, mientras que los AuNCs@LA-*post trat* tienen un diámetro de  $1,90 \pm 0,04$  nm (99% confianza,  $n = 100$  AuNCs en cada caso). Además, a partir de los patrones de difracción SAED (**Figura 71 c y f**), se pueden obtener dos conclusiones (ver protocolo de caracterización estructural en la **Sección C.4.3.2**): 1) Atendiendo a los anillos de difracción, los cuales están formados por puntos aislados, se confirma que es una estructura cristalina, y 2) se pudieron obtener los valores de *dL-spacing* (separación entre

planos atómicos de la estructura cristalina), mostrando en ambos casos una estructura cristalina con red cúbica centrada en las caras (i.e., 4 átomos de Au por celda unidad).

Por lo tanto, una vez conocidos sus radios atómicos y su celda unidad (4 átomos de Au por celda), y teniendo en cuenta la densidad del Au ( $19,32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) y su peso atómico ( $196,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) se puede determinar el número de átomos de Au que forman cada AuNCs. En el caso de los AuNCs@DHHLA, están compuestos por 243 átomos de Au, mientras que los AuNCs@LA-*post-trat* están compuestos por 212 átomos de Au. Con el objetivo de dar una mejor comprensión de los cálculos, en el Capítulo I, se describe detalladamente para el caso de los PtNCs (Sección D.4.5).



**Figura 71:** Micrografías obtenidas por HR-TEM para la caracterización estructural de las síntesis de AuNCs. a-c) AuNCs @DHHLA, y d-f) AuNCs@LA-aging. Las imágenes e y f se corresponden con las imágenes obtenidas para el patrón SAED.

### F.4.1.3. Caracterización elemental de los AuNCs@LA y AuNCs@DHHLA por ICP-MS

Al igual que se hizo en el Capítulo I, a fin de averiguar el rendimiento de la síntesis de AuNCs, así como la concentración de Au en la suspensión coloidal, los

AuNCs fueron digeridos con agua regia (ver protocolo en **Sección C.4.2**) y tras ser diluidos en agua ultrapura (% ácido <3% v/v), el contenido de Au fue determinado por ICP-MS con nebulización convencional llevando a cabo un calibrado externo de Au con patrones en disolución (e Ir como patrón interno). Los rendimientos de las síntesis se determinaron teniendo en cuenta la concentración de Au en la disolución madre (sal precursora del metal), la cual fue de  $94,72 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Las concentraciones de Au y de AuNCs se resumen en la **Tabla 15**.

**Tabla 15:** Resultados obtenidos por ICP-MS para la determinación de la concentración de Au en las síntesis de AuNCs: AuNCs@LA-aging y AuNCs@DHHLA. Rend.: rendimiento de la reacción. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar de tres digestiones ácidas de cada síntesis medida por ICP-MS.

Síntesis	[Au] síntesis AuNCs ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	% Rend.	Molaridad (moles Au $\cdot\text{L}^{-1}$ )	Nº átomos Au por AuNCs	Molaridad (moles AuNCs $\cdot\text{L}^{-1}$ )
AuNCs@LA-aging	$83,30 \pm 0,06$	88	$4,23\cdot 10^{-4}$	212	$1,99\cdot 10^{-6}$
AuNCs@DHHLA	$82,46 \pm 0,05$	87	$4,19\cdot 10^{-4}$	246	$1,72\cdot 10^{-6}$

Ambas síntesis presentan unas características similares en cuanto a desviación de tamaños, diámetro de las nanoestructuras, o rendimiento de la síntesis, y ambas poseen un PDI cercano a 0,1 (suspensión altamente monodispersa). Sin embargo, la síntesis empleando DHHLA como ligando protector no presenta elevada fluorescencia: la emisión fluorescente en los AuNCs@DHHLA apenas alcanza las 30 cuentas de intensidad, mientras que la síntesis de AuNCs@LA-aging presenta una intensidad cercana a las 200 cuentas. Por tanto, tras todos los estudios de caracterización se selecciona la síntesis de AuNCs@LA-aging como la óptima para emplearlos como marca elemental (y fluorescente) en la síntesis de inmunosondas específicas a fin de determinar proteínas en células individuales.

#### F.4.2. Elección del tratamiento inflamatorio para las células HRPEsv40: análisis RT-qPCR y ELISA

Tanto la APOE como la MT2A son dos proteínas implicadas en procesos biológicos relacionados con la inflamación. Además, se conoce que ambas proteínas bajo efectos de estrés oxidativo y consecuente inflamación de los tejidos oculares

(complejo EPR-MBr-coroides) presentan cambios en sus niveles de expresión. El primer estudio que se realizó es la evaluación de diferentes tratamientos inflamatorios en las células inmortalizadas HRPEsv40 para encontrar el tratamiento que provoque cambios en la expresión de dichas proteínas, los cuales serán posteriormente evaluados con LA-ICP-MS (y posteriormente en el Capítulo IV por sc-ICP-MS).

En la **Tabla 14**, se recogen los reactivos, concentraciones, y tiempos aplicados durante los tratamientos inflamatorios en los cultivos celulares HRPEsv40. Para las diferentes condiciones se tuvieron en cuenta estudios previamente publicados<sup>18-21</sup>. Sin embargo, exceptuando la IL-1 $\alpha$  (la cual había sido previamente estudiada con HRPEsv40<sup>18</sup>), la TFGB1<sup>19</sup> y la DEX<sup>20</sup> habían sido aplicados en otro tipo de células (monocitos y células del estroma, respectivamente). Por ello, una manera rápida de hacer un cribado de los tratamientos es mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican las proteínas: el gen Hs02379661\_g1 (MT2A) y el gen Hs00171168\_m1 (APOE) bajo los efectos de cada tratamiento llevando a cabo análisis por RT-qPCR. Este tipo de análisis es una manera indirecta de conocer la tendencia de la expresión de las proteínas bajo diferentes tratamientos de suplementación.

### F.4.2.1. Análisis de la expresión genética por RT-qPCR (APOE y MT2A)

Tal y como se comentó en el apartado experimental, se lleva a cabo una cuantificación por PCR relativa, es decir los ciclos de la expresión de cada gen obtenidos tras realizar la PCR son normalizados con los ciclos de un gen control o “*housekeeping*”. En nuestro caso se empleó el gen de GUSB. El número de ciclos del gen “*housekeeping*” deben permanecer por definición invariable, independientemente de

---

<sup>18</sup> L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, M. Garcia, S. Ghosh, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, The stoichiometric transition from Zn6Cu1-metallothionein to Zn7-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells. *J Biol Chem.* 287, (2012), 28456-28469.

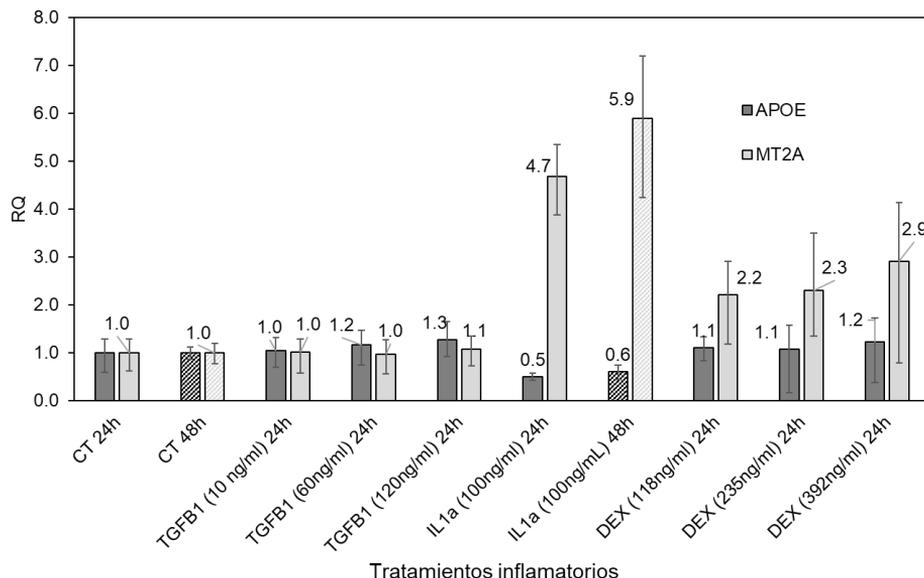
<sup>19</sup> N.N. Singh, D.P. Ramji, Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, (2006), 1323-1329.

<sup>20</sup> S. Zeitouni, B.S. Ford, S.M. Harris, M.J. Whitney, C.A. Gregory, D.J. Prockop, Pharmaceutical induction of ApoE secretion by multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). *BMC Biotechnol.* 29, (2008), 75.

---

cuales sean las condiciones a las que se someten las células. Si se producen cambios en los ciclos de expresión de GUSB, se debe seleccionar otro gen “*housekeeping*” puesto que los resultados no son fiables. Adicionalmente, de cara a poder evaluar y comparar los cambios de expresión de cada gen de APOE y MT2A, paralelamente se preparan células HRPEsv40 CT para 24 y 48 h (i.e., células que no se someten al proceso de inflamación).

En la **Figura 72** se pueden observar los resultados obtenidos por RT-qPCR para los diferentes tratamientos. Por una parte, se pudo observar que el TGF $\beta$ 1 no provoca variación en la expresión de los genes, independientemente de la concentración ensayada (20-120 ng·mL<sup>-1</sup>). Para poder considerar un incremento en la expresión o disminución, se debe experimentar al menos una alteración de 2 ó 0,5, respectivamente. De la misma manera, las condiciones de tratamiento con DEX, aunque parece favorecer un incremento al alza de la expresión del gen de la MT2A (el valor para RQ es el doble que sin tratamiento), el gen de la APOE permanece invariable. Por otro lado, si se presta atención al tratamiento con la citoquina proinflamatorio (IL1 $\alpha$ ) a las 24 h de tratamiento, se observa un incremento de casi 5 veces la expresión del gen de MT2A (RQ de 4,7) y una disminución de la expresión en el caso de APOE (RQ de 0,5). Este efecto antagonista que provoca la IL1 $\alpha$  en la expresión de la APOE y MT2A resulta interesante desde el punto de vista biológico y por ello se ensayó adicionalmente un tiempo de tratamiento más largo (48 h), para el cual se observó la misma tendencia.



**Figura 72:** Resultados de RT-qPCR para los genes de APOE y MT2A tras varios tratamientos inflamatorios: TGFB1, IL1α y DEX empleando diferentes concentraciones y tiempo de incubación. Empleo del gen GUSB como control endógeno para la normalización. Las barras de error corresponden a los números de ciclos de expresión obtenidos para RQ máximo y RQ mínimo. RQ: cuantificación relativa.

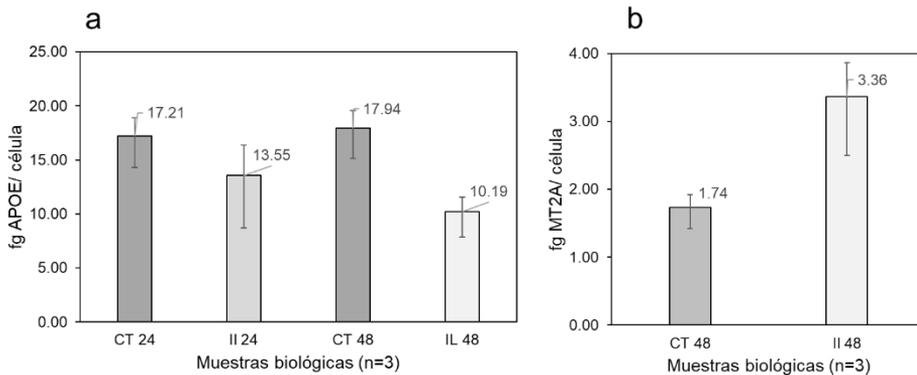
#### F.4.2.2. Determinación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 por ELISA

A continuación, se realizó la cuantificación de las dos proteínas (APOE y MT2A) en las fracciones citosólicas de células HRPEsv40 que fueron sometidas a un tratamiento de suplementación con IL1α (100 ng·mL<sup>-1</sup>) durante 24 h y 48 h mediante ensayo inmunoenzimático ELISA. Además, también se llevó a cabo el análisis de células control (i.e., sin tratamiento con IL1α),

Tras determinar la concentración promedio de APOE en las fracciones citosólicas de un cultivo de células HRPEsv40 CT (24 y 48 h) y tratado con IL1α (24 y 48 h), los valores obtenidos se normalizaron con el número de células determinado mediante conteo manual previamente a la lisis. Los resultados indicaron que la expresión de la proteína disminuía en las células tras las 48 h de tratamiento, pasando de 17,94 ± 1,30 a 10,19 ± 0,53 fg de APOE promedio por célula. Esto corresponde con una reducción en la concentración de proteína de un factor de 0,44. Así mismo, no se

observó esa disminución tan clara en la concentración de APOE a las 24 h de tratamiento (**Figura 73a**). Estos resultados coinciden con lo esperado tras los resultados obtenidos previamente por RT-qPCR. La RT-qPCR indicaba que a las 24 h se producía una disminución del 50% de expresión del gen que codifica dicha proteína, sin embargo, este efecto en la síntesis nueva de proteína en las muestras se observa a posteriori (una vez eliminada la proteína basal de la muestra por los procesos metabólicos comunes).

Paralelamente, en otra alícuota de la misma fracción citosólica obtenida de la población de células tratadas 48 h con IL1 $\alpha$ , se determinó la concentración de MT2A (normalizado de nuevo con el número de células). En este caso se observó un incremento en la concentración de MT2A en un factor de 1,9:  $1,74 \pm 0,28$  fg de MT2A promedio por célula en las células HRPEsv40 CT que se incrementa hasta  $3,36 \pm 0,50$  fg de MT2A promedio por célula tras el tratamiento inflamatorio (**Figura 73b**).



**Figura 73:** Concentración de proteína (expresada en fg de proteína por célula) obtenida mediante un ensayo ELISA (kit comercial) para las células HRPEsv40 CT y sometidas a un tratamiento inflamatorio con IL-1 $\alpha$  (24 h y 48 h). a) APOE, y b) MT2A. Las barras de error corresponden a la desviación propagada para la cuantificación de 3 muestras y las desviaciones asociadas al conteo del número de células para cada suspensión celular (conteo manual 3 veces).

### F.4.3. Optimizaciones previas del ensayo ICC para la detección de APOE y MT2A

Entre las optimizaciones llevadas a cabo para asegurar un total reconocimiento de las proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en las células fijadas HRPEsv40 (células CT y tratadas con IL1 $\alpha$  48 h) se incluyen: 1) estudios de caracterización de las inmunosondas (Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs) para determinar el número de átomos de Au por Ab disponible, y 2) optimización de la concentración adecuada de Ab primario así como asegurar una correcta penetración de las inmunosondas en las células, que asegure la completa detección de cada proteína en las células del HRPEsv40.

#### F.4.3.1. Caracterización de las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs

Para obtener la cuantificación absoluta de proteínas en las células es necesario conocer el número medio de átomos de Au por inmunosonda (i.e., el factor de amplificación). Siguiendo una estrategia similar a la descrita en el Capítulo II, se llevaron a cabo dos experimentos después de realizar el procedimiento de bioconjugación de los anticuerpos primarios con los AuNCs (inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs). En primer lugar, se realizó la cuantificación del Ab disponible después de la bioconjugación empleando un ensayo ELISA directo con un estándar de proteína (IgG) para construir la curva de calibración (0 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los resultados experimentales mostraron una concentración para el Ab disponible de  $7,40 \pm 0,31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que corresponden a  $2,95\cdot 10^{13} \pm 0,12\cdot 10^{13}$  moléculas de Ab en las inmunosondas. Respecto a la concentración de Au en las inmunosondas, los bioconjugados digeridos se analizaron mediante ICP-MS con nebulización convencional obteniéndose unos valores para la concentración de Au de  $4,46 \pm 0,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que corresponden a  $1,37\cdot 10^{16} \pm 0,23\cdot 10^{16}$  moles de átomos de Au. De este modo, el factor de amplificación calculado como la relación entre el número de átomos de Au y las moléculas de Ab disponible, resultó ser de  $466 \pm 18$  átomos de Au

por inmunosonda (relación molar promedio Ab:AuNCs de 1:2,2). Indicar que el factor de amplificación es el mismo para las dos inmunosondas (Anti-h-APOE:AuNCs y anti-h-MT2A:AuNCs): en ambos casos se emplean los mismos AuNCs y los anticuerpos primarios son de la misma clase (IgG). Se observó un resultado similar para los PtNCs empleados en el Capítulo I y Capítulo II con las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs y Anti-h-APP:PtNCs, respectivamente.

#### F.4.3.2. Optimización la concentración de los anticuerpos primarios

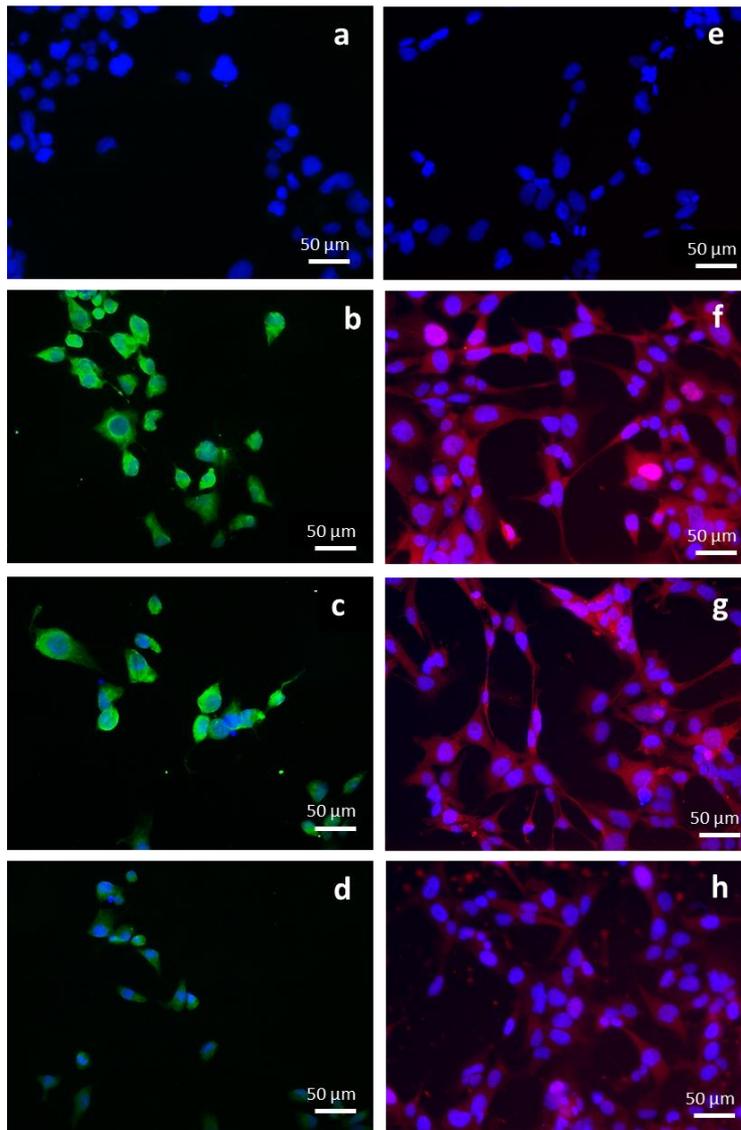
Con el objetivo de garantizar el reconocimiento completo de las proteínas (APOE y MT2A) en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ) empleando las inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, se optimizó la concentración de los anticuerpos primarios para llevar a cabo el protocolo de ICC. Con este objetivo se ensayó el protocolo de ICC con detección indirecta fluorescente utilizando un anticuerpo secundario marcado con Alexa® 488 (APOE) o Alexa® 594 (MT2A). En ambos casos se evaluaron tres diluciones diferentes para cada Ab primario (no conjugado con AuNCs) de manera independiente. El protocolo llevado a cabo se encuentra detallado en la **Sección F.3.3.7**. Las concentraciones ensayadas para cada Ab primario fueron seleccionadas de acuerdo con el rango recomendado en las especificaciones de cada Ab.

La concentración de la disolución de partida del Ab específico de la APOE (IgG de cabra Anti-h-APOE) es de 1 mg·mL<sup>-1</sup> y las diluciones ensayadas fueron: 1:50, 1:100, y 1:200 (i.e., 20, 10, y 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> de Ab). En la **Figura 74 (a-d)** se muestran las imágenes de fluorescencia (color verde del fluoróforo Alexa® 488) obtenidas para la distribución de APOE en células HRPEsv40 de una muestra control negativo (sin el Ab primario) empleando las diluciones 1:50, 1:100, y 1:200, respectivamente. Se puede observar que la intensidad se mantuvo constante para las diluciones 1:50 y 1:100. Sin embargo, la intensidad fue significativamente menor con 1:200 (**Figura 74d**), lo que indica que la mayor dilución (1:200) no tiene una concentración de Ab suficiente para detectar completamente el contenido de APOE en las células HRPEsv40. Tras la incubación del Ab primario, todo aquel Ab no enlazado (i.e., el

Ab empleado en exceso) es eliminado de la muestra tras los lavados con PBS1x, por lo que emplear una concentración de Ab mayor de la estrictamente necesaria no supone problemas adicionales. Por lo tanto, se puede afirmar que observar una mayor intensidad con una dilución 1:100 respecto a 1:200 indica una mejor detección de la proteína diana. Así mismo, al observarse una intensidad comparable al emplear las diluciones 1:50 y 1:100, se puede afirmar que con la dilución 1:50 se añade un exceso de Ab primario (el cual es eliminado tras los lavados) y que la dilución 1:100 ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) asegura la detección completa de la proteína. Por tanto,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  fue la concentración seleccionada para el ICC directo usando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs.

De manera análoga, se realizó un estudio similar para la MT2A. La **Figura 74 (e-h)** muestra las imágenes de fluorescencia (color rojo debido a Alexa® 594) obtenidas para la distribución de MT2A en células HRPEsv40 de una muestra control negativo empleando unas diluciones 1:23, 1:46, y 1:115 del Ab ( $10$ ,  $5$ , y  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Ab, respectivamente). En este caso, se seleccionó una dilución 1:46 ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) del Ab primario para realizar la detección total de MT2A en células HRPEsv40. La dilución 1:115 ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se descartó debido a la baja intensidad de fluorescencia, y las diluciones 1:23 y 1:46 mostraron señales de fluorescencia similares.

Cabe destacar que las **Figura 74a** y **Figura 74e** son los controles negativos del inmunoensayo para APOE y MT2A, respectivamente. En este caso, dichas imágenes permitieron descartar cualquier detección inespecífica por parte de los anticuerpos secundarios (IgG de burro anti cabra:Alexa® 488 -color verde e IgG de cabra anti-conejo:Alexa® 594 - color rojo), demostrando que la intensidad mostrada en las imágenes de fluorescencia sólo corresponden a la detección de las proteínas diana APOE y MT2A, respectivamente.

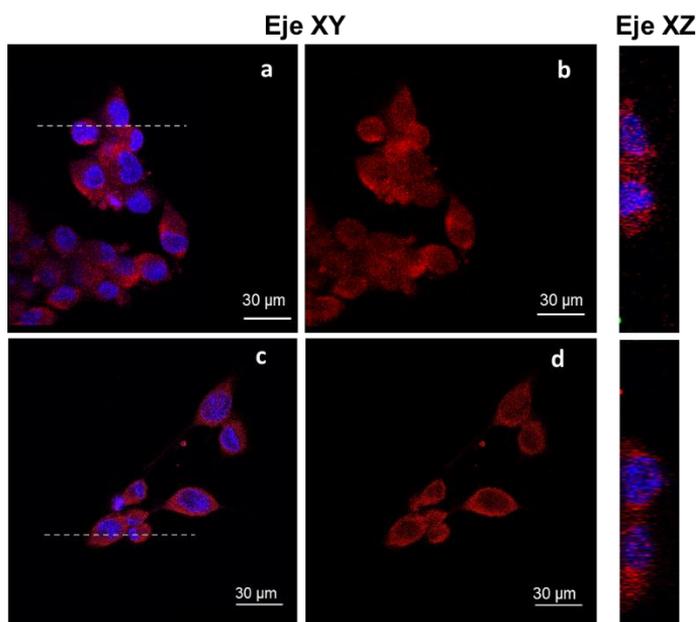


**Figura 74:** Imágenes de fluorescencia obtenidas para el ensayo de inmunofluorescencia indirecto en células HRPE.s140 utilizando Fluor Alexa® (el color verde se debe al Fluor Alexa® 488, mientras que el color rojo se debe al Fluor Alexa® 594). Estos estudios se han realizado para la optimización de la concentración de los anticuerpos primarios en las inmunosondas Anti-b-APOE: AuNCs y Anti-b-MT2A: AuNCs. a) Anti-b-APOE, control negativo (sin Ab primario), b) Dilución 1:50 Anti-b-APOE, c) Dilución 1:100 Anti-b-APOE, d) Dilución 1:200 Anti-b-APOE, e) Anti-b-MT2A, control negativo (sin Ab primario), f) Dilución 1:23 Anti-b-MT2A, g) Dilución 1:46 Anti-b-MT2A, y h) Dilución 1:115 Anti-b-MT2A.

### F.4.3.3. Evaluación de la penetración de la inmunosonda en las células por microscopía confocal

Aprovechando la detección bimodal que ofrecen las inmunosondas con AuNCs, además de emplear el análisis por LA-ICP-MS para estudiar la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40 se estudió su localización empleando microscopía confocal (detección por fluorescencia siguiendo la emisión de los AuNCs:  $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 650\text{-}750 \text{ nm}$ ). El principal objetivo de este estudio fue evaluar la penetración de la inmunosonda metálica (Anti-h-APOE:AuNCs) en las células, para asegurar una completa detección de toda la proteína y asegurar así una cuantificación absoluta de la proteína por LA-ICP-MS. Además, estos estudios sirven también para validar las distribuciones de APOE obtenidas mediante el análisis elemental por LA-ICP-MS empleando la misma inmunosonda metálica. Por otro lado, se llevó a cabo también una ICC con detección por fluorescencia indirecta empleando el Ab secundario marcado con Alexa®488 (emisión verde), permitiendo validar los resultados obtenidos para la APOE con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs.

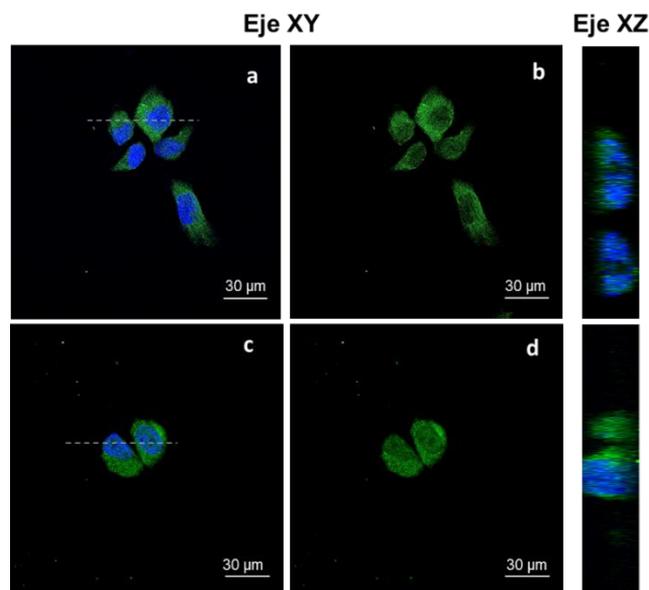
La **Figura 75** muestra las imágenes de fluorescencia obtenidas para la distribución de APOE siguiendo la emisión de los AuNCs para las células HRPEsv40 CT (a y b) y tras el tratamiento proinflamatorio (c y d) en el plano XY (mapa de distribución). Adicionalmente, la imagen de la derecha recoge el plano XZ (perfil en profundidad) de las células marcadas con una línea discontinua en las imágenes a y c. Se puede observar, cómo la emisión de la inmunosonda se distribuye a lo largo de todo el citoplasma de la célula, confirmando una completa penetración de la misma en todo su volumen.



**Figura 75:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 $\alpha$  (c y d). La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de APOE: inmunosonda Anti-b-APOE:AuNCs) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). Las imágenes a y c corresponden con la superposición de la emisión de DAPI y la inmunosonda, y las imágenes b y d sólo muestran la emisión de la inmunosonda Anti-b-APOE:AuNCs. Las imágenes de plano XZ corresponden al estudio de penetración de la inmunosonda y son las imágenes en profundidad de las células marcadas con línea blanca discontinua en a y c. (AuNCs (rojo):  $\lambda_{ex}$ =405 y  $\lambda_{em}$ =680-730 nm y DAPI (azul):  $\lambda_{ex}$ =405 y  $\lambda_{em}$ =450-470 nm).

Paralelamente se llevó a cabo la medida de la fluorescencia indirecta empleando un Ab secundario marcado con Alexa®488 (emisión verde) para el estudio de la distribución de APOE en las células HRPEsv40. Como se puede observar en la **Figura 76**, la APOE se localiza a lo largo del citoplasma de las células con una mayor concentración perinuclear, observando también gracias a las imágenes en el eje XZ, cómo su presencia es apenas detectable en el interior del núcleo. Esta localización está de acuerdo con la observada para la APOE empleando la inmunosonda con los AuNCs (**Figura 75**) y permitirá validar además las imágenes 2D obtenidas tras el análisis de las células por LA-ICP-MS. Las imágenes en profundidad (eje XY) utilizando el fluoróforo Alexa® confirmaron además la menor presencia de la pro-

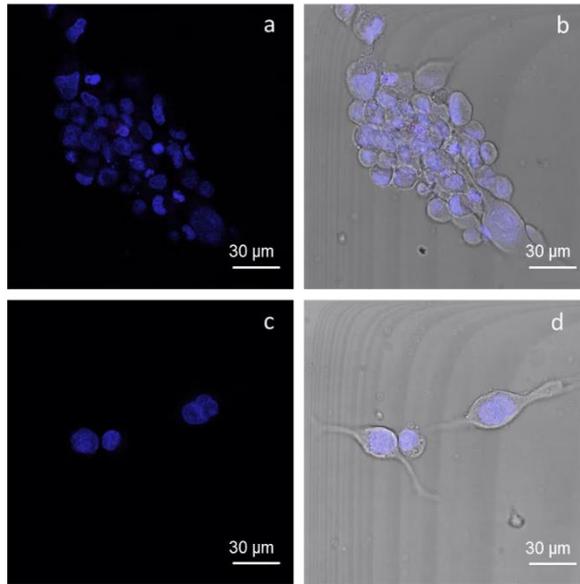
teína APOE dentro de los núcleos celulares en comparación con las regiones perinuclear y citoplasmática. Por otro lado, la penetración total de la inmunosonda con AuNCs (i.e., del Ab Anti-h-APOE) dentro de las células quedó confirmada al poder observarse emisión de fluorescencia dentro de todo el volumen celular.



**Figura 76:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1a (c y d). Las imágenes a y c corresponden con la superposición del canal DAPI (azul) y del canal verde correspondiente a la emisión del Ab secundario fluor Alexa®488 (distribución de APOE en verde), y las imágenes b y d corresponden con la distribución de APOE (Ab secundario fluor Alexa®488). Las imágenes XZ de la derecha corresponden a los perfiles en profundidad en las células marcadas con las líneas blancas discontinuas en las imágenes a y c. (Alexa®488 (verde):  $\lambda_{ex}=488$  y  $\lambda_{em}=500-520$  nm y DAPI (azul):  $\lambda_{ex}=405$  y  $\lambda_{em}=450-470$  nm)

Tal y como se detalló en la sección experimental de este Capítulo III, es muy importante realizar controles negativos en los experimentos de ICC para asegurar que no existen interacciones no específicas del Ab secundario o de los AuNCs. Además, teniendo en cuenta que el objetivo final de este Capítulo es determinar la concentración de proteínas empleando los AuNCs como marcas resulta imprescindible evaluar si los AuNCs se adhieren a las células HRPEsv40 de manera inespecífica. Para ello, se realizó un control negativo, añadiendo los AuNCs libres a las células

fijadas durante el protocolo de ICC (en lugar de añadir la inmunosonda marcada). En la **Figura 77** se muestra la imagen de fluorescencia obtenida para los controles negativos de AuNCs (células CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ). Como se puede observar, en ningún caso se detecta emisión fluorescente en el rojo (emisión de los AuNCs), demostrando la ausencia de interacciones no específicas.

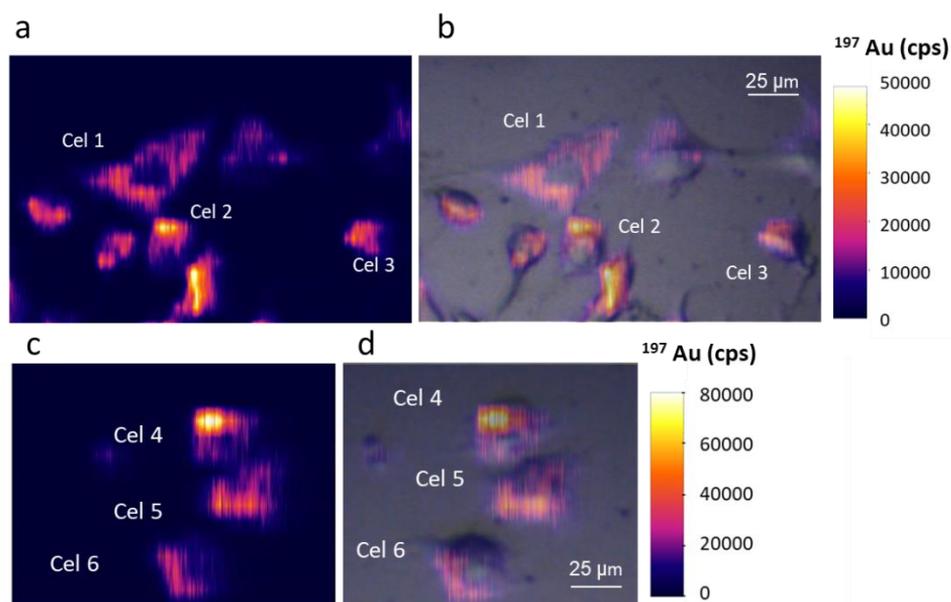


**Figura 77:** Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal de los controles negativos del inmunoensayo empleando AuNCs como etiqueta de fluorescencia. Para realizar estas medidas se añadieron AuNCs libres (i.e., no conjugados) a las células HRPEsv40. a y b) Células HRPEsv40 CT y, c y d) Células HRPEsv40 tratadas con IL-1 $\alpha$ . Las imágenes a y d presentan la superposición de los canales rojo (AuNCs) y azul (DAPI), y las imágenes c y d además superponen el canal de contraste de fase (gris).

### F.4.4. Inmunolocalización de las proteínas citosólicas en células HRPEsv40 individuales mediante LA-ICP-MS

El uso de los AuNCs como una única etiqueta metálica para el estudio de APOE y MT2A en células HRPEsv40 permitió determinar directamente la distribución cualitativa de las dos proteínas citosólicas mediante microscopía de fluorescencia confocal y LA-ICP-MS, en ambas condiciones de tratamiento (células CT y tratadas con IL-1 $\alpha$ ).

Respecto al análisis por LA-ICP-MS de las células HRPEsv40 marcadas con las inmunosondas metálicas (Anti-h-APOE:AuCNs o Anti-h-MT2A:AuNCs), se obtuvieron imágenes 2D de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (i.e., distribución de APOE o MT2A dependiendo de la inmunosonda de AuNCs empleada). A modo de ejemplo, la **Figura 78** recoge las imágenes 2D obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de APOE en células CT (**Figura 78a**) y tratadas con IL1 $\alpha$  (**Figura 78c**). Además, las **Figura 78b y c** muestran la distribución de APOE (señal de  $^{197}\text{Au}^+$ , en cps) solapado con la imagen óptica de las células HRPEsv40 (imagen obtenida previamente a su ablación) para poder identificar mejor la distribución de la proteína a lo largo de la estructura de cada célula. La variabilidad biológica intrínseca y las diferencias esperadas entre células hacen difícil definir un comportamiento común en la población celular, aunque se observaron algunas tendencias: la APOE se localizó en todo el citoplasma, principalmente presente en la región perinuclear (p.ej., las células #2 y #4 mostraron un nivel más alto cerca del núcleo), mostrándose casi ausente dentro del núcleo (p.ej., células #1 y #5). Además, se encontró una distribución similar de APOE independientemente del tratamiento de las células (CT o tratadas con IL1 $\alpha$ ).

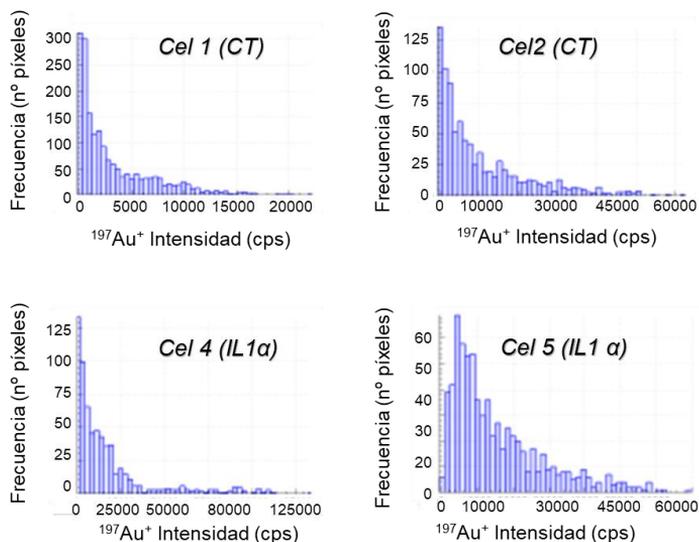


**Figura 78:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs. a) Distribución de APOE en células CT, b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de APOE en células tratadas con IL1 $\alpha$ , b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células tratadas con IL1 $\alpha$  antes del muestreo por LA.

Además de las imágenes cualitativas, empleando el software Iolite es posible obtener el histograma de intensidad ( $^{197}\text{Au}^+$  en cps; APOE) para cada célula HRPEsv40 individual analizada por LA-ICP-MS. Estos histogramas permiten conocer mejor la distribución de la proteína dentro de una célula, aportando información complementaria a las imágenes 2D. Además, debido a la elevada variabilidad entre células y por tanto a la existencia de una gran diferencia en los valores de las intensidades entre células de una misma imagen (i.e., que compartan una misma escala de intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  en cps), a veces surgen problemas para visualizar correctamente la distribución de la proteína en todas las células de una imagen.

Para evitar que las células con un mayor nivel de proteína se observen saturadas en las imágenes, se ajusta la escala de colores hasta un máximo en el que se observe una buena distribución de la proteína en la célula sin llegar a la saturación. El problema surge cuando en la misma imagen hay células con un nivel de proteína

más bajo; en este caso la distribución de las proteínas en las células no se puede conocer bien por estar limitada por la escala seleccionada. De este modo, realizando los histogramas individuales para cada célula dentro de una misma imagen 2D, es posible ver las regiones en la que hay un mayor o menor nivel de proteína. La **Figura 79** muestra el histograma obtenido para dos células HRPEsv40 CT y dos tratadas con IL1 $\alpha$  (las imágenes 2D de estas células están en la **Figura 78**), representando el número de píxeles para cada intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ . Como puede observarse, un gran porcentaje del área de las células analizadas por LA-ICP-MS (i.e., un elevado número de píxeles) presentó señales con una baja intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ , lo que indica bajos niveles de proteína. Además, se observó una alta variabilidad para la intensidad máxima de  $^{197}\text{Au}^+$  (20.000 cps y 125.000 cps para las células #1 y #4, respectivamente), lo que puede atribuirse a la variabilidad biológica intrínseca de las células cultivadas, tanto en condiciones CT como sometidas a un tratamiento de inflamación.

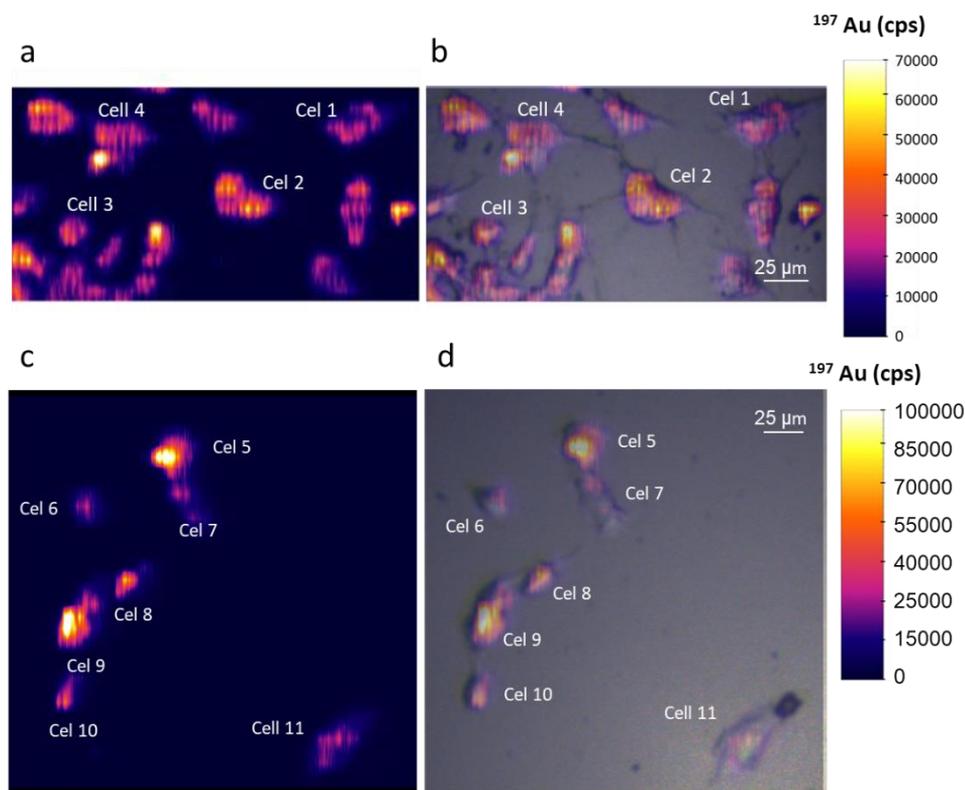


**Figura 79:** Histogramas (frecuencia de píxeles frente a intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ , en cps) obtenidos para el análisis de APOE en células HRPEsv40 CT (células #1 y #2) y tratadas con IL1 $\alpha$  (células #4 y #5) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína APOE.

Con respecto a la MT2A, se siguió un protocolo similar al empleado con la APOE utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A: AuNCs. La **Figura 80** muestra las imágenes 2D obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT2A siguiendo la intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  en células HRPEsv40 CT (**Figura 80a y b**) y tratadas con IL1 $\alpha$  (**Figura 80c y d**). A diferencia de la APOE, la MT2A se distribuye homogéneamente en el citoplasma, con una mayor presencia en el núcleo (p.ej., células #2 y #3 en CT y células #5 y #9 en IL1 $\alpha$ ). La variabilidad observada para la acumulación intracelular de MT2A es elevada, pero concuerda con la distribución de la proteína encontrada por microscopía de fluorescencia empleando anticuerpos secundario marcados con Alexa<sup>®</sup> 594 (**Figura 74**). Además, la distribución homogénea observada para la MT2A a lo largo de la célula, así como la ausencia de cambios significativos en la localización de la proteína entre células CT y tratadas con IL1 $\alpha$  es consistente con estudios previos<sup>21</sup>.

---

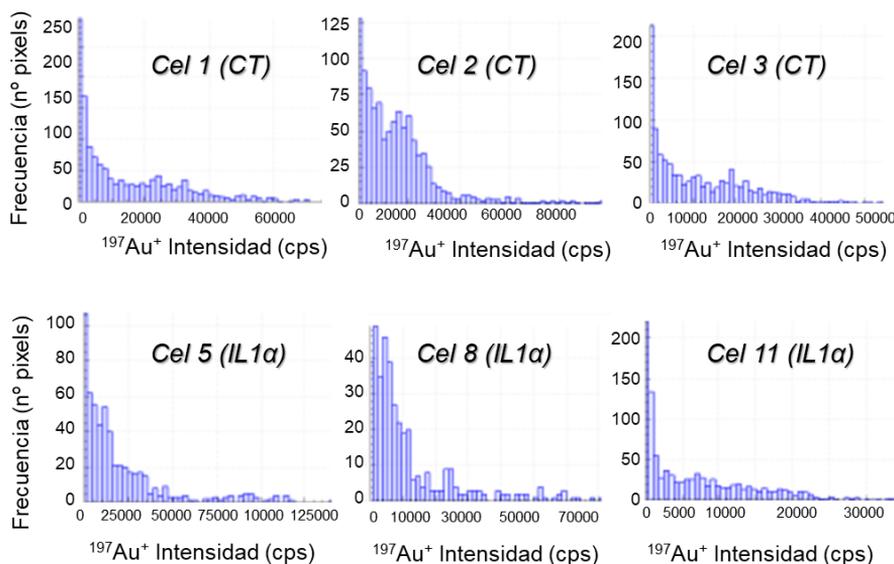
<sup>21</sup> S. Rodríguez-Menéndez, M. García, B. Fernández, L. Álvarez, A. Fernández-Vega-Cueto, M. Coca-Prados, R. Pereiro, H. González-Iglesias, The zinc-metallothionein redox system reduces oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Nutrients* 10, (2018), 1874.



**Figura 80:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-b-MT2A: AuNCs. a) Distribución de MT2A en células CT, b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de MT2A en células tratadas con IL1 $\alpha$ , b) Superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células tratadas con IL1 $\alpha$  antes del muestreo por LA.

Al igual que para la APOE, se estudiaron los histogramas de intensidades en las células individuales CT y tratadas con IL1 $\alpha$ . En la **Figura 81** se muestran los histogramas para tres células HRPEsv40 CT y tres tratadas con IL-1 $\alpha$ , representando el número de píxeles para cada intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ . En este caso, la MT2A se localizó de forma más homogénea dentro de toda la célula (comparada con la distribución observada para la APOE): se obtiene un gran número de píxeles con señales de  $^{197}\text{Au}^+$  del orden de 10.000-40.000 cps. En el caso de las células tratadas con IL1 $\alpha$ , un gran porcentaje del área de las células presentó señales bajas de  $^{197}\text{Au}^+$  (i.e., niveles bajos de proteína), a la vez que existen regiones específicas de las células en las que las señales de  $^{197}\text{Au}^+$  son muy elevadas (p.ej., en la célula #5 la intensidad asciende

hasta un valor de 125.000 cps). Este hecho puede atribuirse a una acumulación de MT2A, probablemente en la región del núcleo tal y como identificó en la **Figura 80**.



**Figura 81:** Histogramas (frecuencia de píxeles frente a intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ , en cps) obtenidos para el análisis de MT2A en células HRPEsv40 CT (células #1, #2, y #3) y tratadas con IL-1 $\alpha$  (células #5, #8, y #11) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-b-MT2a: AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína MT2A.

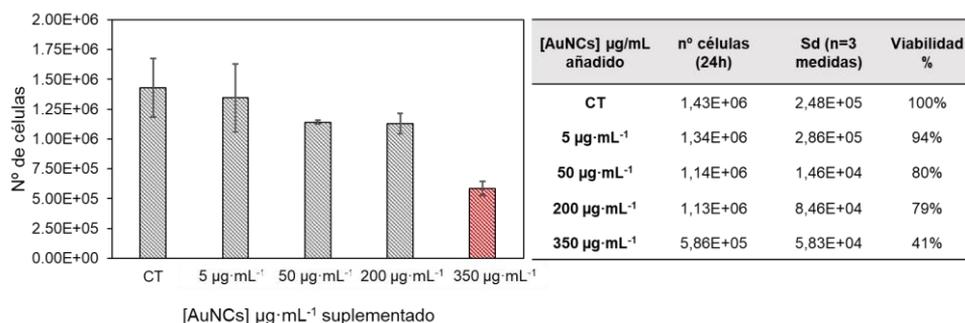
#### F.4.5. Desarrollo de una nueva estrategia de cuantificación *matrix-matched* para determinar proteínas en células por LA-ICP-MS

Una vez que se ha caracterizado la inmunosonda metálica ( $466 \pm 18$  átomos de Au por Ab) empleada para la localización de las proteínas (APOE o MT2A), se ha optimizado la concentración de Ab primario que asegura el total reconocimiento de la proteína, se ha confirmado la penetración total de las inmunosondas en las células HRPEsv40, así como la ausencia de interacciones no específicas por parte de los AuNCs, es posible plantear una estrategia de calibración que permita no solo conocer la distribución de las proteínas sino también su concentración. Sin embargo, tal y como se discute en la Introducción de este capítulo, para llevar a cabo una cuan-

tificación por LA-ICP-MS en tejidos biológicos se debe disponer de patrones de calibración adecuados que imiten la matriz de las células. Por ello, se ha desarrollado una metodología de calibración basada en el empleo de patrones *matrix-matched* (i.e., con una matriz idéntica a la de la muestra) para lo cual se han empleado células HRPEsv40 como patrones de calibración. El protocolo para la preparación de los patrones de células que han internalizado AuNCs libres (HRPEsv40@AuNCs) está detallado en la **Sección F.3.3.9**. Para una mejor comprensión de las diferentes etapas de síntesis y caracterización de los patrones, así como de la obtención de los *imaging*s cuantitativos para APOE y MT2A en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ), en la **Figura 69** se presentó un diagrama con el flujo de trabajo.

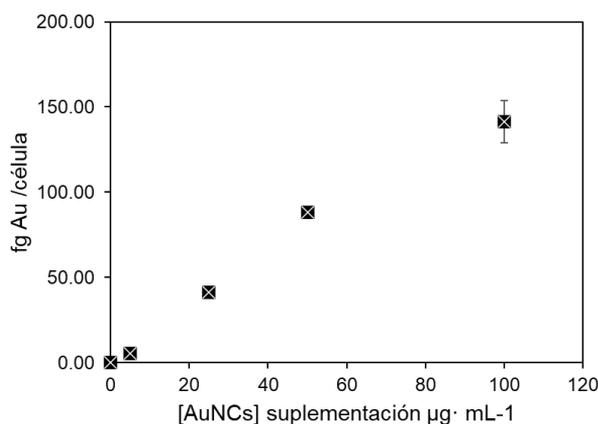
Tal y como se describió en la Sección Experimental, para generar los patrones de calibración unicelulares HRPEsv40@AuNCs, las células HRPEsv40 se incubaron con diferentes concentraciones de AuNCs libres (sin bioconjugado) durante 24 h. Posteriormente, para poder relacionar las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidas mediante LA-ICP-MS para los patrones HRPEsv40@AuNCs con una concentración de Au, los patrones fueron caracterizados mediante ICP-MS con nebulización convencional. De este modo fue posible determinar la masa media de Au en la población de células para las diferentes concentraciones de AuNCs añadidas durante la incubación (concentraciones de AuNCs entre 0-200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). El protocolo seguido con las células se encuentra detallado en la Sección Experimental de este Capítulo III.

Inicialmente, se estudiaron diferentes concentraciones de AuNCs para la suplementación de las células (hasta 350  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Sin embargo, la viabilidad de las células HRPEsv40 disminuyó drásticamente después de la incubación de las mismas a altas concentraciones de AuNCs (24 h de tratamiento). En la **Figura 82** se recogen los conteos de las células tras ser incubadas con las diferentes concentraciones de AuNCs. Se observa una disminución de la viabilidad celular a medida que se incrementa la suplementación. Tras este estudio inicial, se decidió emplear concentraciones de AuNCs para la suplementación por debajo de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 82:** Estudios de viabilidad celular para preparar los patrones HRPEsv40@AuNCs unicelulares. En la gráfica y la figura se muestran los valores obtenidos para el número de células al con concentraciones de AuNCs en el rango entre 0-350 µg·mL<sup>-1</sup>. Las desviaciones estándar corresponden a tres conteos de alícuotas diferentes de la misma suplementación.

Tras la incubación de las células HRPEsv40 con los AuNCs, se determinó la concentración de Au en cada grupo de células por ICP-MS con nebulización convencional. Como se muestra en la **Figura 83**, se obtuvo un comportamiento lineal para la concentración media de Au en los estándares HRPEsv40@AuNCs determinada por ICP-MS (expresada como fg de Au por célula) y la concentración de AuNCs utilizada para la suplementación de las células, en el rango de concentraciones entre 0-100 µg·mL<sup>-1</sup>



**Figura 83:** Representación gráfica de la relación observada entre las concentraciones de AuNCs empleadas para la suplementación de las células HRPEsv40 (0-100 µg·mL<sup>-1</sup>) y los fg de Au por célula para los patrones HRPEsv40@AuNCs tras análisis por ICP-MS. Las desviaciones estándar corresponden a 3 réplicas de la suplementadas con la misma concentración.

Por otro lado, los estándares de calibración HRPEsv40@AuNCs preparados en cámaras portaobjetos y suplementados con diferentes concentraciones de AuNCs (0, 5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fueron analizados individualmente por LA-ICP-MS. Se analizaron 30 células por suplementación empleando las mismas condiciones de análisis que las optimizadas para el *imaging* de las proteínas por LA-ICP-MS (**Tabla 12**). El *imaging* obtenido de cada célula individual HRPEsv40@AuNCs por LA-ICP-MS fue tratado con el software Iolite (v4) siguiendo el protocolo que se describe a continuación en el que a modo de ejemplo se aplica para el tratamiento de datos de 3 células individuales pertenecientes a la suplementación con 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs (**Figura 84**):

i) Se obtiene la imagen 2D de la distribución de  $^{197}\text{Au}^+$  (en cps) para cada célula individual HRPEsv40@AuNCs mediante análisis por LA-ICP-MS (**Figura 84a**);

ii) Se utiliza una imagen óptica de cada célula (tomada justo antes del muestreo por LA) para compararla con la imagen obtenida por la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (**Figura 84b**);

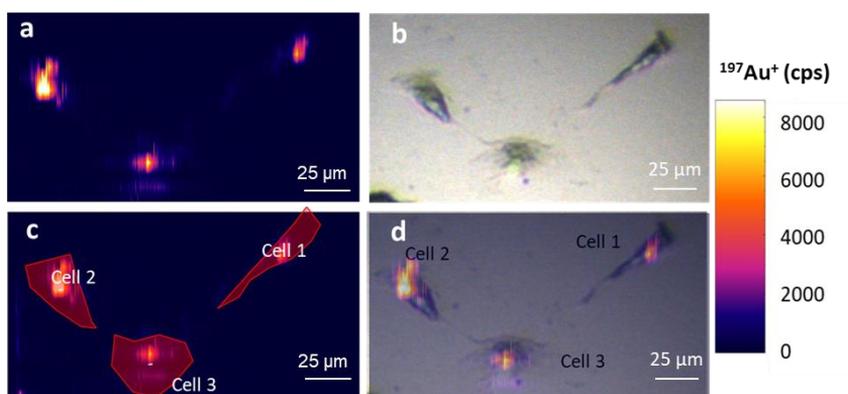
iii) Se selecciona específicamente el área de cada célula individual en la imagen cualitativa 2D de  $^{197}\text{Au}^+$  (superficie roja en la **Figura 84c**), siguiendo la superficie de la célula desde la imagen óptica. De esta manera, es posible obtener un valor del área de cada célula expresado en píxeles. En el ejemplo de la **Figura 84**, las células #1, #2, y #3 están constituidas por 717, 815, y 889 píxeles, respectivamente. Es importante hacer notar que el área de la célula no puede seleccionarse directamente a partir de la imagen de intensidad ( $^{197}\text{Au}^+$ ) ya que no hay una distribución homogénea de los AuNCs en toda la superficie de la célula;

iv) La intensidad total de  $^{197}\text{Au}^+$  para cada célula se calcula como la suma de las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  para todos los píxeles que componen una célula (1,10 $\cdot$ 10<sup>6</sup> cps, 9,78 $\cdot$ 10<sup>5</sup> cps, y 8,77 $\cdot$ 10<sup>5</sup> cps para las células #1, #2, y #3, respectivamente);

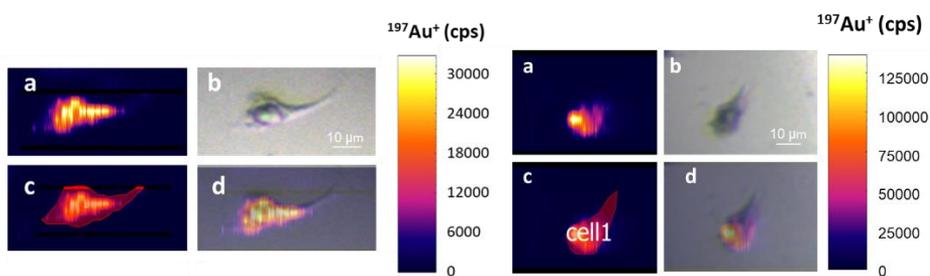
v) La intensidad total de  $^{197}\text{Au}^+$  por célula se normaliza con el tamaño de la célula (i.e., el número de píxeles que la constituye). En el ejemplo recogido en la

**Figura 84**, se encontraron  $1,53 \cdot 10^3$  cps,  $1,14 \cdot 10^3$  cps, y  $9,86 \cdot 10^2$  cps como intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  por píxel para las células #1, #2, y #3, respectivamente.

Todos los estándares de HRPEsv40@AuNCs (diferentes concentraciones de AuNCs para la suplementación) fueron analizados por LA-ICP-MS y procesados siguiendo la estrategia propuesta. La **Figura 85** recoge las imágenes 2D obtenidas para dos estándares de laboratorio de células individuales utilizando una concentración de  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AuNCs.

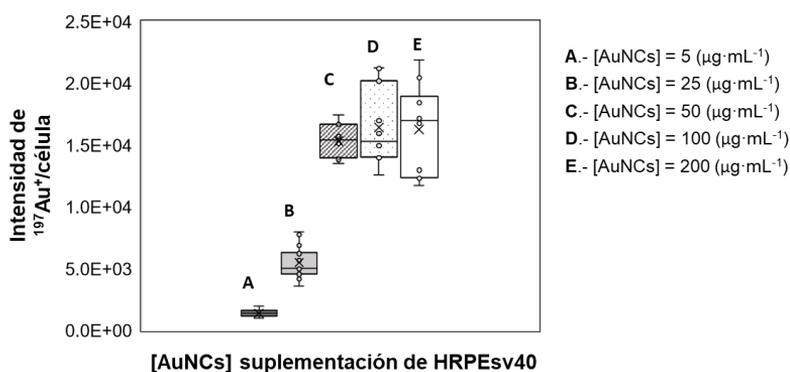


**Figura 84:** Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv40@AuNCs empleando el imaging de 3 células (suplementadas con  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AuNCs) analizadas por LA-ICP-MS.



**Figura 85:** Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv40@AuNCs empleando el imaging de 2 células analizadas por LA-ICP-MS. Imágenes de la izquierda a-d) Suplementación de las células con  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AuNCs, e imágenes de la derecha a-d) Suplementación de las células con  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AuNCs.

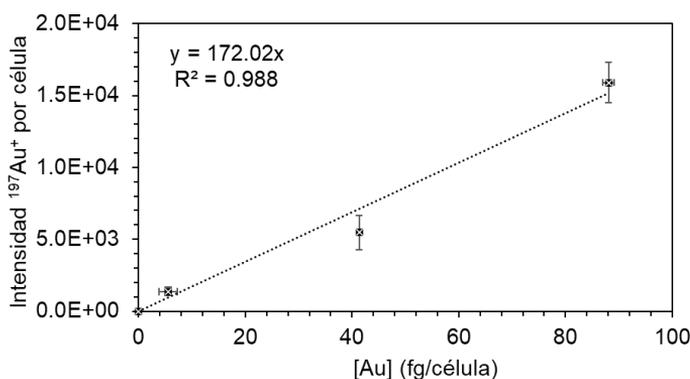
En la **Figura 86** se muestra un gráfico de cajas donde se recogen las intensidades medias de  $^{197}\text{Au}^+$  por célula tras el tratamiento de los datos de los patrones HRPEsv40@AuNCs analizados por LA-ICP-MS para los diferentes tratamientos de suplementación con AuNCs (0-200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs). Se observó cómo la captación de AuNCs por las células aumentó de forma dependiente de la dosis suplementada hasta la saturación celular. En este caso se observa como existe una señal con una tendencia constante para la concentración de Au en los patrones para concentraciones a partir 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AuNCs. Indicar que los valores de la desviación estándar relativa para los análisis por LA-ICP-MS son mayores que para las medidas con células en disolución, oscilando entre el 9% y el 22% (análisis de 30 células individuales por condición).



**Figura 86:** Gráfico de cajas que representa el promedio de las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  por célula (determinada por LA-ICP-MS) para los diferentes patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs obtenidos tras la suplementación de las HRPEsv40 con diferentes concentraciones de AuNCs (0-200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Las barras de error corresponden a la desviación calculada tras el análisis de 30 células por condición.

Finalmente, tras el análisis de los estándares de laboratorio unicelulares por ICP-MS con nebulización convencional y LA-ICP-MS, y su correspondiente tratamiento de datos, se construyó un gráfico de calibración que representa la intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  por píxel para cada célula (determinada por LA-ICP-MS) frente a la concentración de Au de los estándares unicelulares HRPEsv40@AuNCs (determinada por ICP-MS con nebulización convencional). La **Figura 87** muestra el gráfico de calibración de Au obtenido, el cual se utilizó en una etapa posterior para transformar las imágenes cualitativas con la distribución de APOE y MT2A (obtenidas por

LA-ICP-MS) en imágenes cuantitativas con la masa de proteína por célula. Indicar que, como era de esperar, tanto la variabilidad biológica asociada al propio cultivo de células HRPEsv40 como las posibles diferencias en la internalización de los AuNCs contribuyeron a la incertidumbre de las medidas.



**Figura 87:** Gráfica de calibración obtenida empleando los patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs que es empleada para la determinación de la concentración de proteínas en las células HRPEsv40 tras su análisis por LA-ICP-MS (se utilizan las inmunosonda con AuNCs como etiqueta específica de cada proteína). La intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  por píxel para cada célula (determinada por LA-ICP-MS) se representó frente a la concentración de Au de los patrones HRPEsv40@AuNCs para cada condición de suplementación con AuNCs (determinada por ICP-MS). Las barras de error del eje  $x$  corresponden a la desviación estándar del análisis de 30 células, mientras que las barras de error del eje  $Y$  corresponden a la desviación estándar calculada para el análisis de las  $1 \cdot 10^6$  células digeridas por condición.

#### F.4.6. Cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 mediante LA-ICP-MS utilizando patrones unicelulares HRPEsv40@AuNCs

La estrategia de análisis propuesta se aplicó a la determinación del contenido de APOE y MT2A (de manera independiente en diferentes cultivos) en células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 $\alpha$  mediante LA-ICP-MS. Utilizando la recta de regresión obtenida con los estándares HRPEsv40@AuNCs (**Figura 87**) y calculando la intensidad total de  $^{197}\text{Au}^+$  por célula en las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 $\alpha$  (al igual que se ha descrito para los estándares de laboratorio unicelulares), se

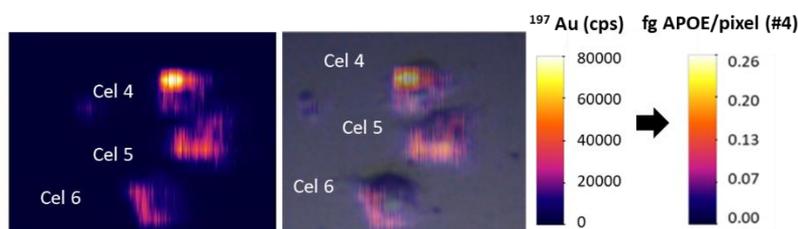
determinó la masa total de Au por célula (expresada como fg de Au por célula). A continuación, la masa total de Au por célula se puede transformar en la masa de la proteína por célula (APOE o MT2A dependiendo de la inmunosonda utilizada: Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs, respectivamente) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II para la cuantificación de proteínas en secciones de tejidos (es necesario tener en cuenta el factor de amplificación de cada inmunosonda).

La masa de APOE obtenida por LA-ICP-MS para cada célula HRPEsv40 individual (CT & IL-1 $\alpha$ ) se recoge en la **Tabla 16**. La Tabla resume los valores individuales obtenidos para 22 células CT y 11 células tratadas con IL1 $\alpha$  analizadas con la metodología propuesta. Se puede observar que la masa media de APOE para cada condición indicó una disminución en los niveles de proteína de  $27,2 \pm 7,9$  fg de APOE/célula para las células CT a  $16,0 \pm 5,8$  fg de APOE/célula para las células tratadas con IL1 $\alpha$  (cambio de 0,58 veces). Esta disminución en los niveles de proteína de las células HRPEsv40 sometidas al tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$  coincide con los ensayos previos llevados a cabo. Por una parte, los resultados de RT-qPCR mostraban que el nivel de expresión de ARN (gen codificante de la síntesis de APOE) disminuía entorno al 40% su expresión tras el tratamiento con IL1 $\alpha$  (**Figura 72**). Además, la masa de APOE determinada por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda con AuNCs fue validada mediante los resultados obtenidos para las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 con el kit ELISA (**Figura 73**). La masa de APOE determinada por el ELISA es de  $17,94 \pm 1,30$  fg APOE/célula para las células CT y de  $10,19 \pm 0,53$  fg APOE/célula para las células tratadas con IL1 $\alpha$  (cambio de 0,56 veces). Por lo tanto, se puede confirmar que los valores obtenidos experimentalmente por ELISA para la APOE concuerdan con el contenido proteico determinado por LA-ICP-MS: en ambos casos se confirma una menor expresión de APOE tras someter el cultivo celular a un tratamiento de estrés proinflamatorio.

**Tabla 16:** Resultados obtenidos para la masa de APOE en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs.

	Célula	Int. Total <sup>197</sup> Au <sup>+</sup> (cps)	Célula tamaño (pixels)	<sup>197</sup> Au <sup>+</sup> Int./pixel	Masa Au (fg/cel)	Masa APOE (fg/ cel)	Promedio Masa APOE (fg/cel)
APOE - CT	1	8,19E+06	594	1,38E+04	80,20	29.7	27,2 $\pm$ 7,9
	2	6,56E+06	770	8,52E+03	49,53	18.3	
	3	7,22E+06	543	1,33E+04	77,34	28.6	
	4	1,07E+07	1031	1,04E+04	60,53	22.4	
	5	7,45E+06	587	1,27E+04	73,79	27.3	
	6	1,22E+07	803	1,52E+04	88,51	32.8	
	7	5,64E+06	512	1,10E+04	63,99	23.7	
	8	1,17E+07	606	1,93E+04	112,39	41.6	
	9	7,82E+06	494	1,58E+04	92,04	34.1	
	10	1,04E+07	666	1,56E+04	90,69	33.6	
	11	8,09E+06	640	1,26E+04	73,47	27.2	
	12	1,08E+07	1149	9,38E+03	54,54	20.2	
	13	3,83E+06	424	9,04E+03	52,57	19.5	
	14	3,53E+06	415	8,50E+03	49,42	18.3	
	15	1,34E+07	1732	7,71E+03	44,82	16.6	
	16	6,84E+06	817	8,37E+03	48,66	18.0	
	17	9,05E+06	882	1,03E+04	59,67	22.1	
	18	1,42E+07	1108	1,28E+04	74,32	27.5	
	19	5,52E+06	456	1,21E+04	70,42	26.1	
	20	1,00E+07	542	1,85E+04	107,26	39.7	
	21	2,31E+07	1132	2,04E+04	118,42	43.8	
	22	1,72E+07	1294	1,33E+04	77,12	28.5	
APOE - IL1 $\alpha$	1	5,30E+06	634	8,36E+03	48,63	18.0	16,0 $\pm$ 5,8
	2	5,20E+06	694	7,42E+03	46,39	17.1	
	3	6,07E+06	655	9,27E+03	53,87	19.9	
	4	4,06E+06	726	5,59E+03	32,51	12.0	
	5	7,24E+06	658	1,10E+04	63,96	23.7	
	6	5,09E+06	1104	4,61E+03	26,80	9.9	
	7	6,90E+06	639	1,08E+04	62,77	23.2	
	8	4,83E+06	1460	3,31E+03	19,24	7.1	
	9	5,35E+06	789	6,79E+03	39,45	14.6	
	10	3,53E+06	840	4,21E+03	24,45	9.0	
	11	5,51E+06	568	9,70E+03	56,40	20.9	

Cabe destacar que utilizando la metodología propuesta por LA-ICP-MS no sólo se puede estudiar la masa total de proteína por célula, sino también la distribución cuantitativa de la proteína. Conociendo los fg de proteína en una célula y la intensidad por píxel de esta, se puede relacionar la intensidad por píxel máxima de la escala de intensidades con un valor de masa de proteína. Asimismo, se puede obtener el *imaging* cuantitativo de la proteína por célula. A modo de ejemplo, la distribución de APOE expresada como fg de proteína por píxel se muestra en la **Figura 88**.



**Figura 88:** Imágenes 2D obtenidas para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. La escala de color en unidades de cps y fg APOE/píxel ejemplifica cómo se puede hacer la cuantificación de las imágenes cualitativas obtenidas por LA-ICP-MS empleando la metodología propuesta. En la imagen de la izquierda se muestra la distribución de APOE en células CT y en la de la derecha la superposición de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA.

De la misma manera que en el caso de la APOE, en la **Tabla 17** se recogen los resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ) mediante la metodología desarrollada por LA-ICP-MS. Se midieron 23 células CT y 14 células tratadas con IL1 $\alpha$ . Como puede observarse en los resultados promedio, el tratamiento de las células HRPEsv40 con 100 ng·mL $^{-1}$  de IL1 $\alpha$  durante 48 h produjo un incremento en la síntesis de MT2A por parte de las células:  $2,1 \pm 0,9$  fg/célula de MT2A en CT frente a  $4,6 \pm 1,6$  fg/célula de MT2A en las células sometidas al estrés inflamatorio (incremento de un factor de 2,1). El análisis de RT-qPCR confirmó este aumento a nivel de expresión génica de MT2A (**Figura 72**) y la masa de proteína obtenida mediante el kit ELISA cuantitativo también coincide con los resultados experimentales obtenidos por LA-ICP-MS. Tal y como se detalla en la **Figura 73**, la masa de MT2A determinada por el enzoinmunoensayo ELISA cuantitativo fue de  $1,74 \pm 0,28$  fg MT2A/célula para células CT y  $3,36 \pm 0,50$

fg MT2A/célula para las células HRPEsv40 tratadas con IL1 $\alpha$  (incremento de 1,9 veces), lo que confirma la sobreexpresión de MT2A bajo condiciones inflamatorias.

**Tabla 17:** Resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPEsv40 (CT & tratadas con IL-1 $\alpha$ ) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-b-MT2A: AuNCs.

	Célula	Int. Total <sup>197</sup> Au <sup>+</sup> (cps)	Célula tamaño (pixels)	<sup>197</sup> Au <sup>+</sup> Int./pixel	Masa Au (fg/cel)	Masa MT2A (fg/cel)	Promedio Masa MT2A (fg/cel)
MT2A CT	1	4,21E+06	1241	3,39E+03	19,70	1,3	2,1±0,9
	2	3,72E+06	835	4,45E+03	25,88	1,7	
	3	2,64E+06	600	4,39E+03	25,54	1,7	
	4	3,09E+06	635	4,87E+03	28,29	1,9	
	5	1,84E+06	334	5,50E+03	32,00	2,1	
	6	1,58E+06	418	3,79E+03	22,03	1,4	
	7	1,29E+06	516	2,49E+03	14,48	1,0	
	8	2,51E+06	567	4,42E+03	25,68	1,7	
	9	1,53E+06	538	2,85E+03	16,54	1,1	
	10	3,87E+06	943	4,11E+03	23,87	1,6	
	11	2,94E+06	994	2,96E+03	17,21	1,1	
	12	2,67E+06	847	3,16E+03	18,35	1,2	
	13	1,91E+06	537	3,57E+03	20,73	1,4	
	14	2,53E+06	598	4,23E+03	24,57	1,6	
	15	3,80E+06	935	4,06E+03	23,61	1,6	
	16	8,55E+06	1193	7,17E+03	41,66	2,7	
	17	1,15E+7	1350	8,55E+03	49,72	3,3	
	18	1,05E+07	1100	9,57E+03	55,65	3,7	
	19	1,08E+07	1230	8,82E+03	51,25	3,4	
	20	7,10E+06	841	8,44E+03	49,06	3,2	
	21	7,60E+06	980	7,76E+03	45,11	3,0	
	22	4,11E+06	435	9,46E+03	54,98	3,6	
	23	2,56E+06	398	6,44E+03	37,46	2,5	
MT2A IL1 $\alpha$	1	9,59E+06	620	1,55E+04	89,88	5,9	4,6 ±1,6
	2	8,01E+06	792	1,01E+04	58,81	3,9	
	3	3,85E+06	339	1,13E+04	65,97	4,3	
	4	9,58E+06	636	1,51E+04	87,56	5,8	
	5	2,63E+06	367	7,18E+03	41,72	2,7	
	6	6,34E+06	984	6,45E+03	37,51	2,5	
	7	1,14E+07	575	1,98E+04	115,33	7,6	

### CAPÍTULO III

---

8	4,40E+6	396	1,12E+04	65,36	4,3
9	1,38E+7	706	1,95E+04	113,58	7,5
10	3,19E+6	307	1,04E+04	60,40	4,0
11	7,85E+6	587	1,34E+04	77,69	5,1
12	5,66E+6	471	1,20E+04	69,87	4,6
13	7,77E+6	789	9,85E+03	57,25	3,8
14	5,16E+6	760	6,79E+03	39,46	2,6

A la vista de los resultados obtenidos para la cuantificación de las proteínas APOE y MT2A en células individuales HRPEsv40 (CT y sometidas al tratamiento con IL1 $\alpha$ ) se puede afirmar que la estrategia desarrollada de cuantificación empleando los HRPEsv40@AuNCs como patrones unicelulares para la calibración por *matrix-matched* logra llevar a cabo una buena cuantificación por LA-ICP-MS y se presenta como una alternativa a las estrategias de cuantificación comentadas en la Introducción del Capítulo III.

## F.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados presentados en el Capítulo III son las siguientes:

En cuanto a la síntesis de las inmunosondas metálicas:

- ✓ Se han evaluado diferentes aproximaciones de la síntesis de AuNCs y finalmente se optó por un tratamiento de enfoque de tamaños (envejecimiento) que permitió obtener AuNCs más homogéneos, fluorescentes y de mayor calidad:  $1,90 \pm 0,04$  nm.
- ✓ Se sintetizaron y caracterizaron las dos inmunosondas específicas de las proteínas estudiadas (APOE y MT2A), Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, las cuales presentaron un factor de amplificación:  $466 \pm 18$  átomos de Au.

En cuanto a la elección del tratamiento inflamatorio de las HRPEsv40:

- ✓ Se estudiaron diferentes tratamientos inflamatorios (TGF $\beta$ , dexametasona e IL1 $\alpha$ ) en los cultivos celulares de HRPEsv40 mediante RT-qPCR para evaluar cambios en la expresión genética de APOE y MT2A y se eligió la citoquina proinflamatoria Interleuquina-1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) durante 48 h como el tratamiento que afecta de manera antagonista a APOE y MT2A, generando sobreexpresión y subexpresión de estas, respectivamente.
- ✓ Las concentraciones de APOE y MT2A en las condiciones de tratamiento inflamatorio se determinaron con enzimoimmunoensayos ELISA (kits comerciales), y sirvieron como validación de la metodología LA-ICP-MS desarrollada.

En cuando a la obtención de distribuciones 2D de las proteínas APOE y MT2A en las HRPEsv40:

- ✓ La estrategia de detección que emplea la inmunosonda metálica junto con LA-ICP-MS permitió obtener *bioimaging*s de distribución cualitativa de las proteínas APOE y MT2A (de manera secuencial e independiente) en células HRPEsv40 control y tratadas con IL1 $\alpha$ . Además, la detección bimodal de los AuNCs, permitió obtener la distribución de la proteína APOE por inmunofluorescencia para: comprobar las distribuciones elementales obtenidas, confirmar la completa penetración del Ab en todo el volumen celular siguiendo la fluorescencia de la inmunosonda en el eje XZ y evaluar las interacciones inespecíficas de los AuNCs con las células.
- ✓ Las distribuciones de proteínas obtenidas por LA-ICP-MS, así como la elección de la concentración del Ab primario, y la penetración del Ab fueron experimentos validados al ensayar paralelamente una ICC indirecta empleando Ab 2<sup>o</sup> marcado con Alexa® 488 (para detección de APOE) y Alexa® 594 (para detección de MT2A).

En cuanto a la cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 mediante una nueva estrategia de calibración por LA-ICP-MS:

- ✓ Se desarrolló con éxito y por primera vez una estrategia de calibración ajustada a la matriz con el objetivo de superar las limitaciones actuales relativas a la cuantificación de LA-ICP-MS en cultivos celulares.
- ✓ Se generaron patrones de calibración unicelulares HRPEsv40@AuNCs que imitan completamente la compleja matriz celular. Para ello, las células HRPEsv40 fueron suplementadas con concentraciones crecientes de suspensiones que contenían AuNCs libres.
- ✓ Se llevó a cabo una caracterización completa de los estándares de células HRPEsv40@AuNCs mediante ICP-MS de nebulización convencional y LA-ICP-MS, y se desarrolló una estrategia de tratamiento de datos para cada célula individual analizada por LA-ICP-MS. Esta estrategia permitió la obtención de imágenes

cuantitativas de la expresión de proteínas de célula a célula, lo cual es realmente interesante debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares.

- ✓ Como prueba de concepto, se llevó a cabo la determinación secuencial de MT2A y APOE en células individuales HRPEsv40 mediante LA-ICP-MS en células sometidas a inflamación con la citoquina Interleuquina-1 $\alpha$  y controles.
- ✓ Los resultados promedio de MT2A y APOE obtenidos con la metodología propuesta concuerdan con los resultados cuantitativos obtenidos por los kits comerciales ELISA, indicando que los niveles de expresión de APOE disminuyen tras el tratamiento proinflamatorio mientras que los de MT2A aumentan el doble.
- ✓ Utilizando la metodología propuesta por LA-ICP-MS no sólo se puede determinar la masa total de la proteína por célula (que será posible conseguir por sc-ICP-MS) sino también la distribución cuantitativa de las proteínas con resolución subcelular.



---

# G. CAPÍTULO IV

Determinación de proteínas citosólicas en células individuales empleando inmunosondas específicas marcadas con AuNCs y detección por *single cell*-ICP-MS

---



## G.1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral se emplea la técnica de *single cell*-ICP-MS (sc-ICP-MS) para la cuantificación secuencial de dos proteínas relevantes en el estudio del desarrollo y progresión de la DMAE (MT2A y APOE) en una línea celular inmortalizada del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40). Como se ha detallado en el Capítulo III, la importancia del estudio y comprensión de estas dos proteínas radica en su implicación en procesos biológicos de protección frente al estrés oxidativo, el cual desarrolla ciclos severos de inflamación crónica en la zona ocular que provocan daño celular siendo uno de los factores de riesgo más comunes en el desarrollo de la DMAE<sup>1,2</sup>.

Al igual que ocurre con los análisis de cultivos celulares empleando LA-ICP-MS, la técnica sc-ICP-MS proporciona información unicelular muy valiosa superando las limitaciones de las técnicas convencionales de cuantificación de proteínas en digeridos o lisados celulares que no tienen en cuenta la heterogeneidad de las muestras biológicas. Aunque la obtención de imágenes de distribución proteica en células individuales da información acerca de la localización y acumulación de las proteínas en las células, este tipo de estudios implican tiempos largos de análisis para evaluar una población representativa de células. En este sentido, la técnica sc-ICP-MS permite el análisis de cientos de células individuales en apenas unos min, por lo que es posible extraer información de una población mayor. Por ello, y de manera complementaria a los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo III por LA-ICP-MS, se ha desarrollado una metodología para la determinación de MT2A y APOE por sc-ICP-MS en células HRPEsv40. Este tipo de estudios puede arrojar información muy valiosa sobre procesos biológicos en las células, a la vez que confirma los resultados obtenidos mediante otras metodologías.

---

<sup>1</sup> X.B. Ling, H.W. Wei, J. Wang, Y.Q. Kong, Y.Y. Wu, J.L. Guo, T.F. Li, J.K. Li, Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress, *Int J Mol Sci.* 17, (2016), 1483.

<sup>2</sup> M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between Apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration. *Life (Basel)* 11, (2021), 635.

Los valores cuantitativos promedio obtenidos por metodologías convencionales de análisis de proteínas en cultivos celulares (p.ej., ELISA) no ofrecen en algunos casos la información requerida. Es bien sabido que la heterogeneidad celular genera variabilidad no solo en la composición elemental y molecular de cada célula individual, sino que el comportamiento frente a un estímulo (sea este interno o externo) del conjunto de la población celular no sea representativo del comportamiento célula a célula<sup>3</sup>. Por ello, la técnica sc-ICP-MS es una herramienta de análisis elemental que permite llevar a cabo la determinación de la composición elemental célula a célula en muestras con un gran número de células en tan sólo unos pocos segundos<sup>4</sup>. Además, permite conocer la composición elemental de metales naturalmente presentes dentro de las células<sup>5</sup>, así como aquellos metales internalizados de forma artificial: componentes metálicos y metalofármacos<sup>6</sup>, o internalización de NPs compuestas por metales<sup>7</sup> en sistemas unicelulares de distinto origen (p.ej., líneas celulares humanas o de otros mamíferos, bacterias, levaduras, o algas unicelulares).

Como se ha descrito en la Introducción General, la técnica sc-ICP-MS se ha aplicado recientemente a la cuantificación de proteínas en diferentes tipos de aplicaciones, todos ellos basándose en el empleo de estrategias de etiquetado metálico de anticuerpos específicos para generar inmunosondas metálicas detectables por sc-ICP-MS. Sin embargo, la cuantificación de proteínas celulares endógenas sigue siendo un reto debido en gran parte a la necesidad de realizar un inmunoensayo en

---

<sup>3</sup> P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells. *Anal Chem.* 91, (2019), 588-621.

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements. *J Anal At Spectrom.* 28, (2013), 637-645.

<sup>6</sup> E. Mavrakis, L. Mavroudikis, 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.

<sup>7</sup> Z. Chen, B. Chen, M. He, B. Hu, Droplet-splitting microchip online coupled with time-resolved ICPMS for analysis of released Fe and Pt in single cells treated with FePt nanoparticles. *Anal Chem.* 92, (2020), 12208-12215.

células suspendidas, que compromete la integridad de las células. Las etapas de permeabilización, lavados o incubaciones largas pueden afectar de manera significativa a la membrana celular, provocando su debilitación y por ello su fácil ruptura durante su introducción en ICP. Por ello, algunos trabajos resaltan la utilidad de la monitorización de un elemento intrínseco de las células como estrategia de chequeo para evaluar el estado de las células tras las diferentes etapas de preparación de la muestra, así como para confirmar el número de eventos celulares detectados al monitorizar el elemento de la marca<sup>11</sup>. Cabe resaltar el uso de intercaladores de ADN, normalmente complejos con Ir y Rh, los cuales se emplean a su vez como patrón interno de las medidas por sc-ICP-MS. Sin embargo, este tipo de aplicaciones implica una etapa adicional en la preparación de las muestras, aumentando así el riesgo de perder la integridad celular.

En cuanto a las etiquetas metálicas empleadas para la detección de biomoléculas en células mediante análisis por sc-ICP-MS tras la realización de un inmunoensayo en suspensión, las más empleadas son las estructuras quelantes de Ln (p.ej., MAXPAR®<sup>8</sup> o DOTA<sup>9</sup>). Sin embargo, con el objetivo de obtener una mayor amplificación de la señal, especialmente para la cuantificación de proteínas de baja abundancia, ha surgido el uso de nanoestructuras que proporcionan un mayor número de etiquetas elementales por inmunosonda. Por ejemplo, se ha demostrado que las NPs similares a los virus proporcionan una amplificación significativa de la señal. Como alternativa, los NCs se presentan como etiquetas metálicas ideales en la detección por ICP-MS debido a su pequeño diámetro de núcleo metálico (por debajo de 3 nm), junto con el alto factor de amplificación que proporcionan (los NCs están compuestos por cientos de átomos metálicos)<sup>10</sup>. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que,

---

<sup>8</sup> M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, 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.

<sup>9</sup> Y. Liang, Q. Liu, Y. Zhou, S. Chen, L. Yang, M. Zhu, Q. Wang, Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach. *Anal Chem.* 91, (2019), 8341–8349.

<sup>10</sup> Y. Zhang, C. Zhang, C. Xu, X. Wang, C. Liu, G.I.N. Waterhouse, Y. Wang, H. Yin, Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: A mini-review. *Talanta* 200, (2019), 432–442.

para llevar a cabo un análisis cuantitativo de proteínas, cuando no se dispone de patrones apropiados, el factor de amplificación de la inmunosonda metálica empleada, es decir, el número de átomos de metal por inmunosonda, debe ser conocido<sup>11</sup>.

En el Capítulo IV se investiga por primera vez una estrategia de biomarcador único utilizando AuNCs como etiquetas elementales de anticuerpos específicos para la determinación secuencial de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 por sc-ICP-MS. Además, para simular los ciclos de estrés e inflamación, las células son tratadas con una citoquina proinflamatoria (Interleuquina-1 $\alpha$ ; IL1 $\alpha$ ). Así, se puede estudiar cómo estos tratamientos proinflamatorios pueden incrementar o disminuir la síntesis de APOE o MT en los tejidos. La metodología propuesta se basa en un inmunoensayo realizado en una suspensión celular mediante el uso de AuNCs bioconjugados con anticuerpos específicos de proteínas para su determinación secuencial en células HRPEsv40 bajo condiciones CT y pro-inflamatorias (IL1 $\alpha$ ).

---

<sup>11</sup> M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, Trends Anal. Chem. 132 (2020) 116042.

## G.2. OBJETIVOS

El objetivo general del Capítulo IV es el desarrollo de una estrategia de cuantificación de proteínas citosólicas en células individuales mediante la técnica sc-ICP-MS empleando inmunosondas:AuNCs. Como línea celular y proteínas en estudio se seleccionaron la MT2A y APOE en células del epitelio pigmentario de la retina (línea celular HRPEsv40) estudiadas en el Capítulo III.

Para llevar a cabo este objetivo general, se proponen las siguientes etapas experimentales:

- ✓ Estudio de la integridad celular en las etapas de cultivo, tratamiento y procesamiento de las células HRPEsv40 previo a su introducción al sistema de medida *single-cell*-ICP-MS.
  - Optimización del protocolo de fijación de las células
  - Optimización de las etapas de incubación del inmunoensayo para llevar a cabo la detección secuencial de las dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en suspensión empleando las inmunosondas previamente caracterizadas en el Capítulo III Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs.
  - Optimización del sistema de introducción de células en el ICP-MS.
- ✓ Búsqueda de un elemento intrínseco de las células HRPEsv40 para su chequeo de número de eventos detectados con la marca metálica (inmunosonda:AuNCs) y evaluación de la integridad celular tras el inmunoensayo
- ✓ Estudio de los resultados obtenidos al medir el elemento intrínseco (Fe) y la marca metálica (Au) y discusión del tratamiento de datos al emplear criterios de discriminación de diferentes  $3\sigma + X$  y  $5\sigma + X$  para Fe y Au.
- ✓ Evaluación de la estrategia de introducción de las células de las medidas realizadas por sc-ICP-MS:

- Ensayos de concentración celular y configuración del sistema (flujo de introducción).
- ✓ Cuantificación de MT2A y APOE en células HRPEsv40 tras realizar el inmunoensayo en suspensión empleando las inmunosondas metálicas: Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs en células control y células sometidas a un tratamiento con citoquina inflamatoria (IL1 $\alpha$ ) durante 48 h.
- ✓ Comparación de los resultados obtenidos con las cuantificaciones previas por LA-ICP-MS y ELISA (Capítulo III).

### G.3. EXPERIMENTAL

Las etapas experimentales de preparación de la línea celular HRPEsv40 así como los reactivos empleados son los mismos o similares a los utilizados en el Capítulo III, por lo que se hará referencia a ellos en algunas Secciones.

#### G.3.1. Materiales y reactivos

##### G.3.1.1. Síntesis de las inmunosondas metálicas: Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs

Los MNCs empleados como marcas son los AuNCs, con un diámetro de  $1,90 \pm 0,04$  nm (Optimizados en el Capítulo III). Tanto los reactivos como el protocolo de síntesis están recogidos en el Experimental General (**Secciones C.2.2.1** y **C.4.1** respectivamente). Así mismo, en la **Sección C.2.2.1**, se recogen también los reactivos usados para la síntesis de las inmunosondas mediante la reacción de la carbodiimida. Los anticuerpos primarios empleados para la síntesis de las inmunosondas son el Ab policlonal de cabra anti-Apolipoproteína E humana (Anti-h-APOE, concentración de partida  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para la detección de APOE y Ab policlonal de conejo anti-Metalotioneína 2A humana (Anti-h-MT2A, concentración de partida  $0,23 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para la detección de MT2A.

##### G.3.1.2. Expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular e inmunoensayo de las células en suspensión

Para la expansión y crecimiento del cultivo celular usado en el Capítulo IV se sigue el protocolo descrito en el Experimental General (**Sección C.4.7**). Las células son sometidas al tratamiento proinflamatorio con  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IL1 $\alpha$  durante 48 h. Para realizar el inmunoensayo en suspensión celular, además de las inmunosondas marcadas con AuNCs, se emplearon los mismos reactivos generales que para la ICC en las cámaras portaobjetos (**Sección F.3.1.2**).

### G.3.1.3. Reactivos para el análisis por *single cell*-ICP-MS.

A diferencia del Capítulo III donde las células estaban fijadas en las cámaras portaobjetos, en el Capítulo IV las células se analizan en suspensión. Para ello, tras su crecimiento y tratamiento inflamatorio, fueron tripsinizadas de los *flask* T75 con Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma Aldrich) y posteriormente fueron suspendidas en un tampón compuesto por 50 mM de base Trizma (estándar primario y tampón >99,9% cristalino; Sigma Aldrich) y 17 mM de NaCl (Sigma Aldrich), mientras que el pH se ajustó a 7,4 con HCl diluido (VWR chemicals).

La eficiencia de transporte de la muestra en el sistema de introducción de muestras para análisis por sc-ICP-MS se calculó utilizando un estándar de AgNPs de 60 nm recubiertas de BPEI (NanoComposix). La curva de calibración para la cuantificación del Au se realizó utilizando estándares de Au en disolución (7% HCl, Supelco, 1000 g·mL<sup>-1</sup> estándar ICP, Merck-Millipore).

### G.3.2. Instrumentación

Para llevar a cabo las medidas por sc-ICP-MS se utilizó el ICP-MS NexION 350 X (Perkin-Elmer) para detectar las señales de intensidad de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> y <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> en células individuales HRPEsv40. El sistema de introducción de muestras consiste en un nebulizador de alta eficiencia (*high efficiency nebulizer*, HEN) de Meinhard, que se instaló en la cámara de nebulización AsperonR (Perkin-Elmer). La introducción de la muestra se llevó a cabo en modo de autoaspiración a la velocidad de introducción de muestra de 40 μL·min<sup>-1</sup>. En el apartado de Instrumentación General se describe el sistema empleado (**Sección C.1.2.1**). Las condiciones de medida optimizadas midiendo en modo de análisis en tiempo resuelto se recogen en la **Tabla 18**.

**Tabla 18:** *Parámetros optimizados para los análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS*

Parámetro	Valores
Energía ICP RF (W)	1400
Flujo del gas de plasma (mL·min <sup>-1</sup> )	18
Flujo gas auxiliar (mL·min <sup>-1</sup> )	0,6
Flujo de gas nebulizador (mL·min <sup>-1</sup> )	0,3
Isótopos (m/z)	<sup>197</sup> Au <sup>+</sup> , <sup>56</sup> Fe <sup>+</sup> (celda de colisión, KED)
Flujo de He (KED) (mL·min <sup>-1</sup> )	4
Tiempo de adquisición(ms)	10

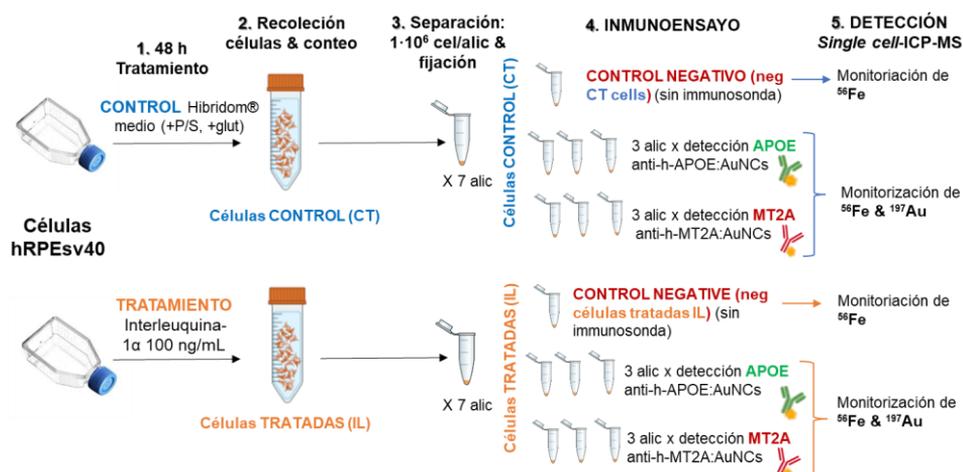
El procesamiento de los datos tras el análisis por sc-ICP-MS se realizó manualmente sobre la base de un algoritmo iterativo utilizando el software Microsoft Excel, lo que permitió discriminar los eventos celulares de la señal de fondo, que se atribuyó a las especies metálicas iónicas disueltas. La presentación de los datos (i.e., histogramas y perfiles de eventos celulares) también se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel.

### G.3.3. Procedimientos experimentales

Los protocolos experimentales referidos a la siembra, expansión, y tratamiento inflamatorio (48 h, 100 ng·mL<sup>-1</sup> de IL1 $\alpha$ ) de la línea celular HRPEsv40 están recogidos en la **Sección C.4.7** del Experimental General. Se debe tener en cuenta que con el objetivo de obtener un número elevado de células por condición ( $\sim 8\cdot 9\cdot 10^6$  células), estas fueron sembradas siempre en *flask* de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> de área (*flask* T75) hasta su confluencia. A continuación, se recogen las etapas del diseño experimental para obtener las suspensiones celulares HRPEsv40 en condiciones control (CT) y tratadas (IL1 $\alpha$ ) para su análisis por sc-ICP-MS.

#### G.3.3.1. Preparación de las células HRPEsv40 en suspensión

En la **Figura 89** se recoge un diagrama de flujo de trabajo para una mejor comprensión del diseño experimental llevado a cabo en el Capítulo III.



**Figura 89:** Diagrama de las etapas llevadas a cabo para el tratamiento de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante análisis por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs.

A continuación, se describen las diferentes etapas llevadas a cabo:

**(1) Tratamiento inflamatorio** (detallado en la **Sección C.4.7.3**). Las células HRPEsv40, una vez confluentes en número, fueron sometidas al tratamiento de estrés inflamatorio añadiendo 10 mL por *flask* de 100 ng·mL<sup>-1</sup> IL1α en medio Hibridoma (+5% l-glutamina, +1% P/S) para células tratadas (IL1α) o medio Hibridoma para células CT y se incuban (37°C en 5% CO<sub>2</sub>) durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, las células adheridas a la superficie del *flask* son lavadas tres veces con PBS1x.

**(2) Recolección y conteo de la suspensión celular.** Las células son tripsinizadas para su posterior recolección. Para ello, se incubaron durante 3 min (37°C en 5% CO<sub>2</sub>) con 3 mL por *flask* de tripsina-EDTA al 0,5%. Seguidamente, se añadieron 10 mL de medio completo DMENF12 para detener la actividad de la tripsina (evitando así la lisis celular) y las células ya despegadas del *flask* fueron recogidas en tubos falcon de manera independiente (CT e IL1α). Posteriormente se procedió a una centrifugación suave (3 min a 100 g) de las células para eliminar el medio y, tras un lavado con PBS1x para eliminar las células muertas se determinó el número de células en la suspensión bajo el microscopio utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

**(3) Preparación de las muestras HRPEsv40.** Una vez conocida la concentración celular para cada condición, se preparan cuidadosamente en diferentes tubos Eppendorf alícuotas de células a una concentración de  $1,2-1,5 \cdot 10^6$  (concentración final después de la fijación  $\sim 1 \cdot 10^6$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) donde se lleva a cabo el procedimiento de fijación. Se evaluaron dos protocolos para la fijación de los cultivos celulares antes del inmunoensayo con las inmunosondas marcadas con los AuNCs, denominados como “condiciones tradicionales”<sup>12</sup> y condiciones de "fijación suave". Los pasos incluidos en ambos procedimientos se recogen en la **Tabla 19**. Una vez fijadas, las células fueron contadas otra vez con el hemocitómetro para conocer la concentración real de células por alícuota y finalmente fueron almacenadas a 4°C en la nevera en un volumen de  $\sim 200$   $\mu$ L de PBS 1x hasta su posterior uso. La morfología de las células fue evaluada durante todo el procesamiento de las muestras empleando un microscopio óptico para confirmar así su integridad.

**(4) Inmunoensayo en suspensión.** Cada una de las dos proteínas diana se analizó en tres réplicas biológicas de células CT y tres réplicas de células tratadas con IL1 $\alpha$ . Además, se prepararon dos controles negativos (sin incubación de la inmunosonda); uno para las células control (neg-CT) y otro para las células tratadas con IL1 $\alpha$  (neg-IL1 $\alpha$ ).

**(5) Detección por single-cell-ICP-MS.** Tras el inmunoensayo se monitorizaron las señales de intensidad de <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> y <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> mediante análisis por sc-ICP-MS para las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$ , mientras que en los controles negativos sólo se monitorizó <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> (neg-CT y neg-IL1 $\alpha$ ).

---

<sup>12</sup> M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection, *Anal. Chem.* 9, (2019), 15532–15538.

**Tabla 19:** Protocolos de fijación empleados con las células HRPEsv40 en suspensión: fijación tradicional vs fijación suave.

	Fijación tradicional	Fijación suave
Etapas del protocolo de fijación celular	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pulso para retirar el PBS 1x (<i>pellet</i> celular “seco”)</li> <li>2. Añadir 500 µL de PFA al 4% directamente sobre el <i>pellet</i> celular</li> <li>3. Incubar a temperatura ambiente (10 min)</li> <li>4. Pulso para retirar el PFA 4% (rpm suave)</li> <li>5. Lavar con PBS 1x (1 vez)</li> <li>6. Pulso para retirar el PBS 1x con las células dañadas/muertas</li> <li>7. Añadir 1 mL de PBS 1x para almacenaje</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Añadir 250 µL de PFA 4% a la suspensión celular (suspendida en 250 µL PBS 1x; no es un <i>pellet</i> celular seco)</li> <li>2. Incubar a temperatura ambiente (10 min)</li> <li>3. Pulso y retirar el líquido (rpm suave)</li> <li>4. Añadir otros 250 µL de PFA 4% al <i>pellet</i> celular</li> <li>5. Incubar a temperatura celular (10 min)</li> <li>6. Pulso y retirar el PFA</li> <li>7. Lavar con PBS 1x (1 vez)</li> <li>8. Pulso y eliminar el PBS y las células dañadas/muertas</li> <li>9. Añadir 1 mL de PBS 1x para almacenaje</li> </ol>
	Etapa final: Contar las células para comprobar el número de células por alícuota y almacenar las suspensiones celulares (en PBS 1x) en la nevera (4 °C) hasta su uso.	

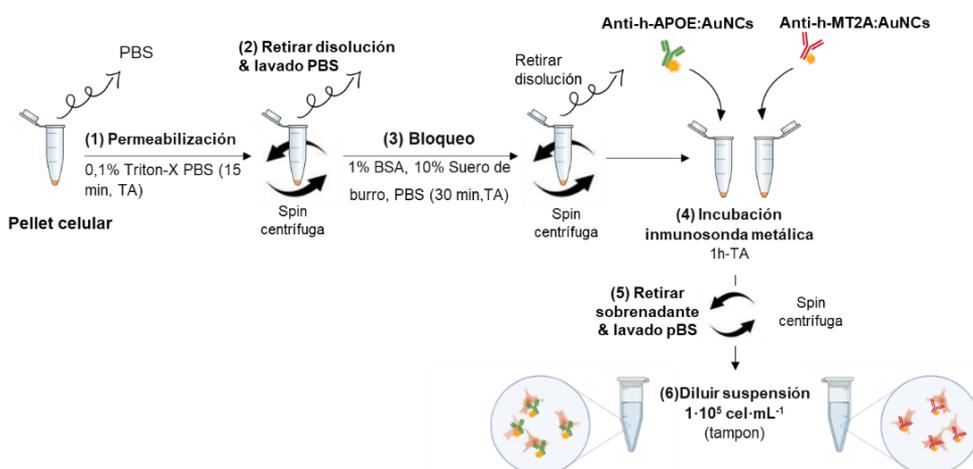
### G.3.3.2. Protocolo de inmunoensayo en células HRPEsv40 en suspensión empleando inmunosondas con AuNCs

El inmunoensayo para la detección de las proteínas citosólicas APOE y MT2A se realizó de forma independiente en las alícuotas ( $1 \cdot 10^6$  células por alícuota) de células HRPEsv40 fijadas y en suspensión (células CT y tratadas con IL1 $\alpha$ ), tal y como se indica en el diagrama de la **Figura 89**.

En la **Figura 90** se detallan las etapas llevadas a cabo con cada una de las alícuotas, todas ellas a temperatura ambiente:

- (1) Permeabilización de las membranas con un tensoactivo: incubación durante 15 min con 500 µL de PBS 1x con 0,1% de Triton X-100.

- (2) Lavado: adición de 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x con un 0,05% de Tween-20 y centrifugado a 100 g para separar *pellet*-disolución.
- (3) Bloqueo: incubación durante 30 min con 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x con 10% de suero de burro y 1% de BSA.
- (4) Incubación con las inmunosondas durante 1 h: 200  $\mu\text{L}$  de Anti-h-MT2A: AuNCs o Anti-h-APOE: AuNCs en PBS 1x con 5% de suero de burro y 1% de BSA añadidas a alícuotas independientes de las células en suspensión.
- (5) Lavado: adición de 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1x y centrifugación suave 100g.
- (6) Dilución de la suspensión celular hasta obtener  $1 \cdot 10^5$  células  $\cdot \text{mL}^{-1}$  en tampón Trizma 50mM y 17mM de NaCl (pH 7,4) para su posterior análisis por sc-ICP-MS.
- (7) Almacenaje a  $9^\circ\text{C}$  has su medida.



**Figura 90:** Esquema de las etapas experimentales para realizar el inmunoensayo en suspensión con las células HRPEsv40. Las incubaciones con las inmunosondas se realizan por separado y paralelamente para detectar MT2A o APOE (Anti-b-MT2A: AuNCs o Anti-b-APOE, respectivamente). TA: temperatura ambiente.

### G.3.3.3. Análisis por sc-ICP-MS y procesamiento de los datos

Las suspensiones celulares HRPEsv40 (tras el inmunoensayo y posterior dilución en el tampón Trizma 50 mM, NaCl 17 mM pH 7,4) se introdujeron en el ICP-

MS a través del nebulizador HEN (de alta eficiencia), que funcionó en modo de autoaspiración a una velocidad de introducción de muestras de  $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Durante la adquisición, la suspensión celular se sometió a una agitación suave y continua con un vórtex.

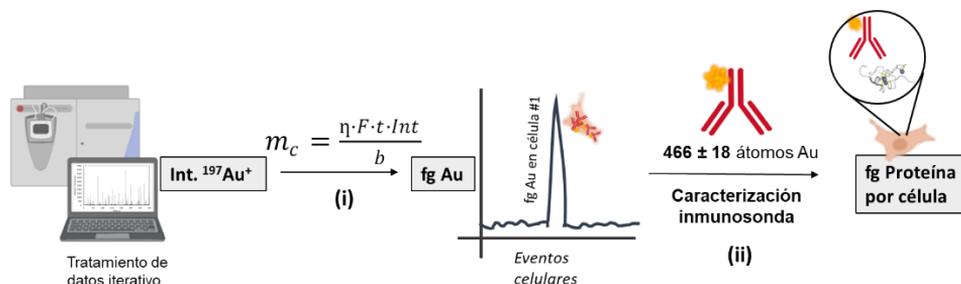
Las medidas por sc-ICP-MS de las muestras de células en suspensión se llevaron a cabo en modo “análisis de tiempo resuelto” estableciendo los parámetros de medida recogidos en la **Tabla 18**. Posteriormente, para el tratamiento de los datos se aplicó un procedimiento iterativo establecido para los análisis por sc-ICP-MS donde es posible discriminar los eventos celulares de las señales del fondo<sup>13</sup>. Dicha estrategia se basa en promediar todo el conjunto de datos ( $X$ ) y extraer los valores cuya desviación estándar esté tres o cinco veces ( $3\sigma$  ó  $5\sigma$ , respectivamente) por encima de la media del conjunto de datos, es decir,  $3\sigma + X$  ó  $5\sigma + X$ . Tras eliminar los eventos seleccionados, se repite el procedimiento hasta que no haya nuevos valores por encima del umbral ( $3\sigma + X$  ó  $5\sigma + X$ ). Finalmente, una vez conocido el valor del umbral del conjunto de datos, todos aquellos valores por encima (conjunto total de datos inicial, sin extraer valores) son considerados como eventos celulares, mientras que los eventos por debajo del umbral corresponden al fondo iónico (i.e., elemento disuelto). A lo largo de los ensayos se aplicaron dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos según se trate de la señal de un elemento intrínseco de las células o la señal del Au de las inmunosondas; se aplicó un umbral de  $5\sigma + X$  para  $^{197}\text{Au}^+$  y de  $3\sigma + X$  para  $^{56}\text{Fe}^+$ . El tratamiento de datos está detallado en la Sección de Resultados y Discusión de este Capítulo.

Además, para determinar la cantidad de APOE y MT2A por célula individual a partir de los datos de sc-ICP-MS, tras descartar los eventos celulares del fondo iónico ( $^{197}\text{Au}^+$  iónico de las inmunosondas con AuNCs) se deben realizar los siguientes cálculos: i) convertir la señal de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  (cps) en masa de Au por célula; y ii) calcular la cantidad absoluta de proteína por célula teniendo en cuenta la

---

<sup>13</sup> F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26, (2011), 1362–1371.

estequiometría de cada inmunosonda (i.e., factor de amplificación de las inmunosondas). En la **Figura 91** se esquematiza el tratamiento de datos que se realiza tras el análisis de las células por sc-ICP-MS.



**Figura 91:** Esquema de los cálculos necesarios para transformar la señal de las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  en cps detectada en el ICP-MS (i.e., detección de los eventos celulares) en masa de proteína por célula (expresada como fg de proteínas por célula).

En primer lugar, la intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  (en cps) detectada en el ICP-MS por evento celular debe transformarse en masa absoluta de Au por evento celular. Para ello, se empleó una calibración externa utilizando estándares líquidos de Au ( $0\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se tuvo en cuenta la relación recogida en la **Ecuación 6**<sup>14-16</sup>:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot \text{Int}}{b} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $m_c$  es la masa de Au, F es el caudal de la muestra, t es el tiempo de adquisición, Int es la intensidad del evento neto, b es la pendiente de la curva de calibración, y  $\eta$

14 M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges. Trends Anal Chem. 132, (2020), 116042.

15 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.

16 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.

es la eficiencia de transporte. Para determinar la eficiencia de transporte, se midió una suspensión de una concentración conocida de NPs (60 nm de AgNPs, 50 ng·L<sup>-1</sup>)<sup>17</sup>.

A continuación, para transformar la masa absoluta de Au por evento celular en masa de proteína (APOE o MT2A dependiendo de la alícuota) se siguió la estrategia descrita en los Capítulos II y III de la presente Tesis Doctoral: se debe tener en cuenta el factor de amplificación de la inmunosonda empleada. Como se describe en el Capítulo III, en el caso de las inmunosondas Anti-h-APOE y Anti-h-MT2A el factor de amplificación promedio es de  $466 \pm 18$  átomos de Au.

---

<sup>17</sup> 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.* 15, (2011), 9361–9369.

## G.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se incluyen las optimizaciones previas para un análisis reproducible y fiable por sc-ICP-MS de las células HRPEsv40, el cual engloba no sólo el estudio de la integridad celular durante la preparación e introducción de la suspensión de células en el ICP-MS, sino también los estudios centrados en la adquisición de datos. En este último caso se han evaluado diferentes parámetros: el tiempo de integración, la configuración del sistema de introducción de muestra, la dilución de la muestra, y el tratamiento de datos. Finalmente, tras la elección de los parámetros adecuados, se discuten los resultados experimentales obtenidos para la cuantificación secuencial de dos proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en células individuales HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 $\alpha$ ) empleando AuNCs como marca elemental en las inmunosondas (i.e., Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs).

### G.4.1. Preparación de la muestra para la detección de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS

Mantener la integridad de la célula al tiempo que se consigue la máxima eficiencia de transporte son dos de los puntos clave para una medida fiable y reproducible empleando sc-ICP-MS. El uso de un sistema de introducción de muestra que provoque la rotura de las células durante la nebulización y/o el transporte hacia el ICP generaría no sólo bajas eficiencias de transporte, sino también altas señales de fondo (resultantes de la liberación y solubilización de los elementos presentes en el interior de las células). Por ello, llevar a cabo una correcta optimización de las condiciones de introducción de muestra es sumamente importante para el análisis de células intactas.

#### G.4.1.1. Monitorización de un elemento intrínseco de las células HRPEsv40

Con el enfoque inicial de comprobar la integridad celular durante el análisis por sc-ICP-MS, resulta interesante la monitorización de un elemento constituyente de la célula junto con la detección de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  procedente de la inmunosonda

(Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs). Además, medir un elemento intrínseco es también valioso para evaluar si las etapas experimentales a las que se someten las células (p.ej., tratamiento con IL1 $\alpha$ , o el uso de inmunosondas con AuNCs) puede afectar al número de eventos celulares detectados en comparación con los observados para suspensiones de células HRPEsv40 que no están sometidas a dichos tratamientos (i.e., células control negativo).

Por lo tanto, con el objetivo de encontrar un elemento constituyente de las células HRPEsv40 que se pueda detectar con buena sensibilidad en el ICP-MS se realizó un primer cribado con diferentes elementos (Mg, Ca, Cu, P, S, Mn, Co, Zn y Fe) utilizando para ello una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL1 $\alpha$ ). Como se puede observar en la **Tabla 20**, sólo los isótopos  $^{44}\text{Ca}^+$ ,  $^{65}\text{Cu}^+$ , y  $^{56}\text{Fe}^+$  mostraron un número de eventos detectables comparables entre sí (471, 465, y 469, respectivamente) junto con una intensidad suficientemente alta (frente a la intensidad media del iónico disuelto). Sin embargo, la monitorización de  $^{56}\text{Fe}^+$  proporcionó una mayor intensidad media por evento: 169,7 cuentas frente a 13,71 y 3,16 cuentas registradas para  $^{44}\text{Ca}^+$  y  $^{65}\text{Cu}^+$ , respectivamente. Por lo tanto, la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$  se monitorizó como elemento intrínseco de las células HRPEsv40 a lo largo de este estudio.

**Tabla 20:** Resultados experimentales obtenidos por sc-ICP-MS para el análisis de diferentes elementos constituyentes de las células HRPEsv40 en una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL1 $\alpha$ ).

Analito	Número de eventos detectados	Int. media de los eventos (cuentas)	Int. media del iónico disuelto (cuentas)
$^{25}\text{Mg}^+$	1455	4,3	0,1
$^{44}\text{Ca}^+$	363	6,47	1,12
$^{63}\text{Cu}^+$	-	-	11,65
<b><math>^{65}\text{Cu}^+</math></b>	<b>465</b>	<b>3,16</b>	<b>0,05</b>
$^{24}\text{Mg}^+$	7	491,86	9,53
$^{47}\text{PO}^+$	9	1053,44	13,37
$^{48}\text{SO}^+$	36	121,11	3,93
<b><math>^{44}\text{Ca}^+</math></b>	<b>471</b>	<b>13,71</b>	<b>4,32</b>
$^{55}\text{Mn}^+$	2716	2,48	0,12
$^{59}\text{Co}^+$	241	4,35	0,07
<b><math>^{56}\text{Fe}^+</math></b>	<b>469</b>	<b>169,7</b>	<b>7,76</b>

Los resultados experimentales obtenidos también mostraron concordancia para el número de eventos celulares detectados en diferentes suspensiones celulares, como el neg-CT, neg-IL1 $\alpha$ , CT, e IL1 $\alpha$ , demostrando así que el tratamiento con IL1 $\alpha$  o el inmunoensayo con las etiquetas de AuNCs no comprometían la integridad de las células HRPEsv40.

Se debe mencionar que la posibilidad de detección dual y simultánea de los isótopos  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  para cada célula individual no fue posible con el instrumento ICP-MS empleado. Por lo tanto, la detección de  $^{197}\text{Au}^+$  (AuNCs) y  $^{56}\text{Fe}^+$  (elemento intrínseco de las células) se realizó de forma secuencial para la misma suspensión de células, con una diferencia de 1 min entre medidas (i.e., el tiempo requerido por el ICP-MS para cambiar de la detección de  $^{197}\text{Au}^+$  (modo estándar) a la detección de  $^{56}\text{Fe}^+$  (modo KED donde se emplea He en la celda de colisión).

#### G.4.1.2. Protocolo para la fijación de las células HRPEsv40

La etapa de fijación de las células es requerida en los protocolos de inmunoensayo y además ha demostrado ser muy importante también para reforzar la estructura celular<sup>11</sup>. El paraformaldehído (PFA) o el metanol<sup>18</sup> son los reactivos empleados habitualmente como agentes fijadores. Sin embargo, el uso de concentraciones y/o condiciones no optimizadas (p.ej., altas concentraciones o largos tiempos de incubación) podría causar una rotura celular significativa y, por tanto, producirse una disminución en el número de células. En esta línea, en este Capítulo IV se investigó un nuevo protocolo de fijación, al que se denominó "fijación suave", para disminuir el efecto del PFA en comparación con los protocolos de fijación tradicionales (**Tabla 19**).

Para estudiar ambos protocolos de fijación con las células HRPEsv40, se contaron las células (intactas y con forma bien definida) utilizando la cámara de Neubauer (y tinción con *Trypan blue*). Se empleó una muestra control. El recuento se re-

---

<sup>18</sup> M. Wang, L-N. Zheng, B. Wang, H-Q. Chen, Y-L. Zhao, Z-F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W-Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chem.* 86, (2014), 10252–10256.

pitió 3 veces para cada muestra, antes y después de la fijación, para obtener la desviación estándar asociada a la medida, la cual fue en todos los casos inferior al 20% de RSD (desviación estándar relativa). Para el recuento de células tras la fijación se emplearon cinco suspensiones celulares tratadas por separado con PFA al 4% (réplicas biológicas). Los resultados recogidos en la **Tabla 21** muestran que el porcentaje de pérdida de células se redujo de más del 40% empleando la fijación tradicional a un 14% utilizando el protocolo de "fijación suave" propuesto. De este modo, para trabajar con las células HRPEsv40 se emplearon las condiciones de fijación suave.

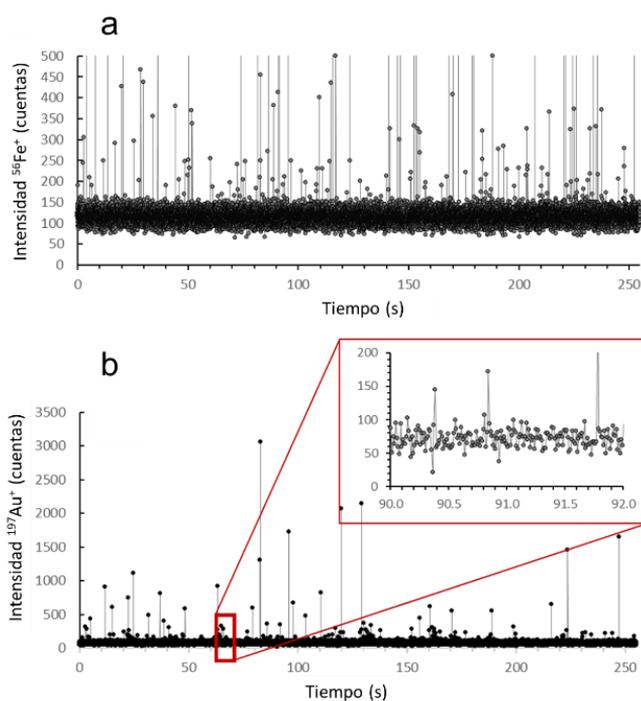
*Tabla 21: Resultados obtenidos para la optimización del protocolo de fijación celular (fijación tradicional y fijación suave) en el que se realiza el recuento de células HRPEsv40 empleando la cámara de Neubauer.*

Conteo celular	Fijación tradicional (célula·mL <sup>-1</sup> )	Fijación suave (célula·mL <sup>-1</sup> )
Antes de la fijación (n=3)	1,12·10 <sup>6</sup> ± 1,7·10 <sup>5</sup>	1,73·10 <sup>6</sup> ± 8,9·10 <sup>4</sup>
Después fijación y lavado (réplicas biológicas; n=5)	5,93·10 <sup>5</sup> ± 8,7·10 <sup>4</sup>	1,50·10 <sup>6</sup> ± 1,9·10 <sup>5</sup>
% pérdida celular	41,9%	13,6%

#### G.4.1.3. Optimización del inmunoensayo para la detección de proteínas empleando AuNCs como marca elemental

Además de la etapa de fijación, las etapas del inmunoensayo también pueden comprometer la integridad celular. Para evaluar la influencia de las etapas del inmunoensayo en dicha integridad, se seleccionaron tres alícuotas de células CT a las que se le aplicaron diferentes tiempos de incubación durante el inmunoensayo para la determinación de APOE. Tras el inmunoensayo, las suspensiones celulares fueron analizadas por sc-ICP-MS monitorizando la señal de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> de la etiqueta elemental y la señal de <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> como elemento naturalmente presente en las células (i.e., permite comprobar la integridad de las células tras el inmunoensayo). Se evaluaron dos tiempos para la etapa de bloqueo (30 min y 1 h) así como para la incubación de la inmunosonda (toda la noche a 4°C y 1 h a temperatura ambiente).

En cuanto al bloqueo, no se observaron diferencias significativas para los dos tiempos evaluados, mientras que sí se observó que el uso de tiempos de incubación largos para la inmunosonda (toda la noche a 4°C) afecta a la integridad de las células HRPEsv40. En la **Figura 92** se muestran los perfiles de tiempo resuelto obtenidos para los isótopos  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  utilizando la incubación nocturna de la inmunosonda (Anti-h-APOE:AuNCs) para una muestra de células HRPEsv40 CT (sin tratamiento con IL-1 $\alpha$ ). Tras el tratamiento de datos y la discriminación de los eventos celulares se contó un número significativamente menor de eventos tras la incubación nocturna (46 eventos de media; n=3) en comparación con la incubación de 1 h (406 eventos de media; n=3). Además, la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  procedente del Au iónico (i.e., Au en disolución o AuNCs en disolución) aumentó de 7 a 74 cuentas, tal y como se puede observar en el zoom de la **Figura 92**. Este hecho indica que un número significativo de células se rompieron, liberando el contenido metálico de la inmunosonda, lo que contribuye a aumentar el contenido de Au en la disolución (también se observa un ligero aumento para la señal media de  $^{56}\text{Fe}^+$  desde 113 a 146 cuentas).



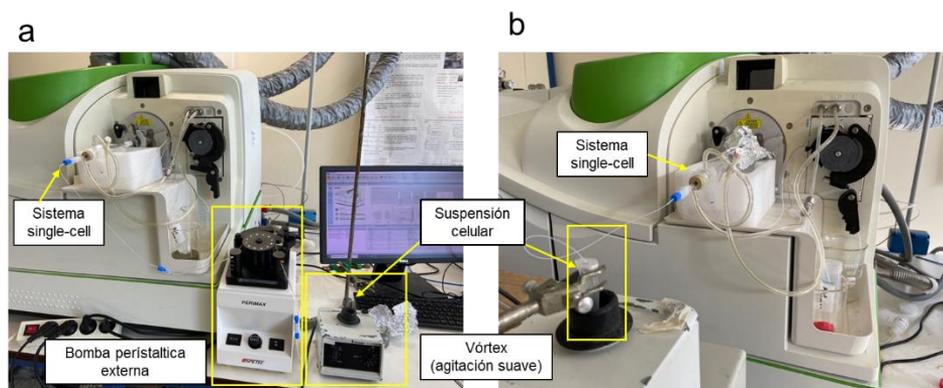
**Figura 92:** Perfiles de tiempo resuelto para  $^{56}\text{Fe}^+$  y  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 CT tras realizar el inmunoensayo para la determinación de APOE utilizando una incubación con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs durante toda la noche. a) Perfil para el  $^{56}\text{Fe}^+$ , y b) Perfil para el  $^{197}\text{Au}^+$ . El perfil ampliado en la imagen b) muestra un zoom del nivel de fondo para la señal de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$ .

Después de la incubación de la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs debe llevarse a cabo un lavado para eliminar el exceso de Ab marcado que no ha detectado proteína en la muestra con el objetivo de asegurar que la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  detectada durante los análisis por sc-ICP-MS sea únicamente debida a la detección de la proteína en el citosol de las células HRPEsv40. Sin embargo, llevar a cabo un procedimiento de lavado exhaustivo puede llegar a afectar a la integridad celular, y por ello al número de células intactas que alcanzan el ICP. A fin de conocer cómo afectan las etapas de lavado a la integridad celular, se evaluó el empleo de una etapa de lavado simple o doble con el objetivo de eliminar eficazmente las inmunosondas no unidas específicamente a las células, pero asegurando al mismo tiempo que se minimiza la

rotura y pérdida celular. Al realizar una etapa doble de lavado con la suspensión celular se observó una reducción significativa en cuanto al número de eventos celulares detectados con la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$  de 123 (un lavado) a 50 (dos lavados). Por lo tanto, se descartó aplicar un doble lavado a los *pellets* celulares tras el inmunoensayo. En su lugar se realizó un lavado suave y cuidadoso con PBS1x para evitar la rotura y debilitación de las membranas para la introducción de las células al sistema sc-ICP-MS. El procedimiento optimizado consiste en centrifugar el *pellet* a 100 g en la centrífuga y, posteriormente, resuspenderlo en el tampón (Trizma 50 mM, NaCl 17 mM).

#### **G.4.1.4. Configuración del sistema de introducción de muestra**

Para su análisis por sc-ICP-MS, las muestras se introdujeron directamente desde los tubos Eppendorf donde se almacenaron y prepararon las alícuotas de células HRPEsv40. Para garantizar la carga de una suspensión celular homogénea en el ICP-MS, y así mantener la integridad de las células y asegurar que no se produce sedimentación de las mismas, se aplicó una agitación suave y continua a los tubos empleando un vórtex. Además, se compararon dos configuraciones de introducción de muestra. En la **Figura 93** se muestra una fotografía de las dos configuraciones: a) una bomba peristáltica externa es empleada para suministrar la suspensión celular con un flujo de  $20\text{-}25\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , y b) se emplea autoaspiración directamente desde el tubo Eppendorf con un flujo de  $40\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .



**Figura 93:** Fotografías de los montajes experimentales empleados para la introducción de muestra (suspensión celular) en el ICP-MS. a) flujo de introducción de muestra controlado por una bomba peristáltica externa (flujo de  $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ), y b) sistema de autoaspiración (flujo de  $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

En el caso de la utilización de la bomba peristáltica externa fue necesario el empleo de un tubo de aspiración de la muestra relativamente largo (como se puede observar en la fotografía), lo que provocó una importante adherencia de las células a las paredes del tubo. Por este motivo, fueron necesarios frecuentes y prolongadas etapas de limpieza entre muestras para evitar que se bloqueara el tubo de aspiración, alargando significativamente las medidas. Por el contrario, el uso de autoaspiración demostró ser una mejor opción para el análisis de células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS, aun siendo el flujo de introducción de muestra mayor. En cualquier caso, teniendo en cuenta la concentración de células introducidas en el ICP-MS ( $1\cdot 10^5$  células $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y el tiempo fijado de *dwell time* del ICP-MS (10 ms), se puede asegurar que no se está detectando más de una célula por evento. Esto se puede entender llevando a cabo el siguiente cálculo teórico del número de células que se introducen en el plasma por *dwell time*:

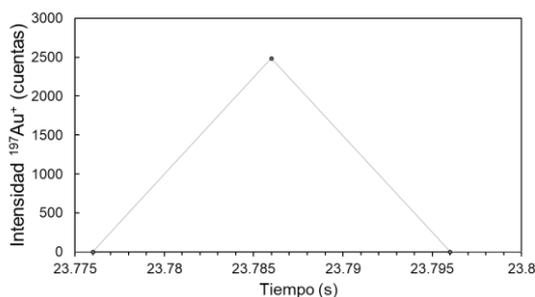
Si la eficiencia del transporte celular al ICP-MS fuese del 100%, se introducirían  $1\cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Al multiplicar este valor por  $0,04 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (flujo de introducción de la muestra) da como resultado  $4000$  células $\cdot\text{min}^{-1}$ . Así, en 10 ms (*dwell time*), debería detectarse un promedio de  $0,667$  células cada 10 ms (menos de una célula por *dwell time*).

En ambos casos se calculó la eficiencia de transporte midiendo una suspensión de un material de referencia (AgNPs de 60 nm; 50 ng·L<sup>-1</sup>). Aunque los resultados mostraron una eficiencia comparable con ambos sistemas (25,0% para el sistema con la bomba peristáltica frente a un 23,8% para el sistema por autoaspiración) se seleccionó como sistema óptimo la autoaspiración ya que se evitan los problemas de sedimentación y bloqueo de los tubos.

#### G.4.2. Selección del tiempo de adquisición en el ICP-MS

Como se ha descrito en la Introducción General, para los análisis por sc-ICP-MS la elección de un tiempo de adquisición que detecte una única célula por evento es crítica. En este contexto, la elección del tiempo de adquisición juega un papel muy importante en los análisis y debe ajustarse teniendo en cuenta la dilución de las células introducidas en el sistema ICP, así como el flujo de entrada de las mismas. Teniendo en cuenta el ICP-MS empleado y las limitaciones del tratamiento de datos (Microsoft Excel), estos parámetros deben ser evaluados para asegurar que no existe una superposición de células por evento y que un evento celular no está definido por muchos *dwell time*.

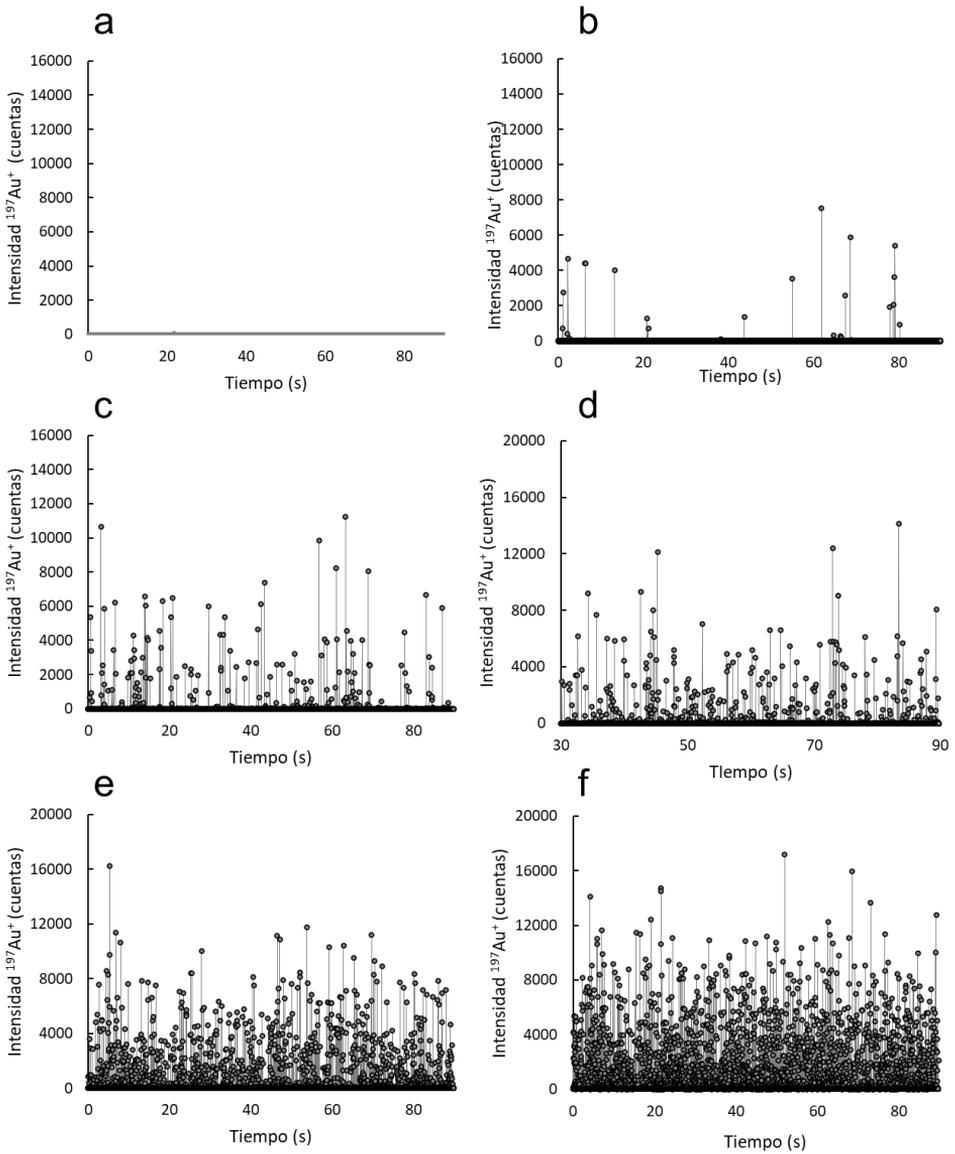
Tal y como se establece en la **Ecuación 3**, la intensidad de los eventos celulares puede transformarse en masa, siendo uno de los parámetros de la ecuación el tiempo de integración utilizado para adquirir las señales transitorias procedentes de la detección de células individuales. En nuestro caso, al ajustar 10 ms como tiempo de integración (siendo la concentración celular de 1·10<sup>5</sup> células·mL<sup>-1</sup> y el flujo de entrada de la suspensión de 40 μL·min<sup>-1</sup>), la intensidad de un único tiempo de integración proporciona la intensidad total de un evento correspondiente a una única célula. Es decir, un evento de detección celular, tal y como se recoge en la **Figura 94**, dura 0,02 ms, pero sólo un único tiempo de integración corresponde con la intensidad de una única célula detectada (p. ej. a 23,786 s). De este modo, la intensidad de la señal de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> se puede transformar en masa directamente, sin la necesidad de tener en cuenta el área bajo el pico en el tiempo de duración del evento.



**Figura 94:** Ejemplo del perfil obtenido para un evento celular adquirido monitorizando la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y empleando 10 ms como tiempo de integración ( $1 \cdot 10^3$  células  $\cdot$  mL $^{-1}$  y un flujo de 40  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ).

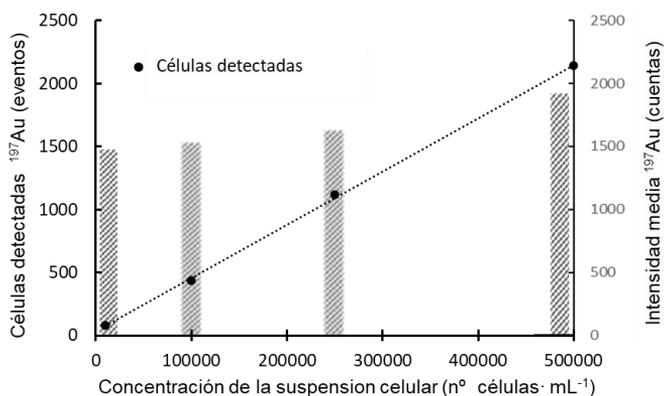
### G.4.3. Optimización de la dilución de la muestra para el análisis de células HRPEsc40 por sc-ICP-MS

La selección de una concentración adecuada de células HRPEsv40 en suspensión se llevó a cabo mediante una dilución en serie con células CT y tratadas con IL-1 $\alpha$ , adquiriendo en ambos casos tanto la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (AuNCs de la etiqueta de las inmunosondas) como de  $^{56}\text{Fe}^+$ . Siempre que todas las condiciones seleccionadas para el análisis estén optimizadas correctamente se debería obtener un número comparable de eventos celulares para ambos isótopos mediante análisis por sc-ICP-MS. A modo de ejemplo, la **Figura 95** muestra los perfiles resueltos en el tiempo obtenidos para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). Como se puede observar, el número de eventos celulares aumentó (**Figura 95b-Figura 95f**) a medida que aumenta la concentración de las células en la suspensión ( $1 \cdot 10^4$  células  $\cdot$  mL $^{-1}$  y  $1 \cdot 10^6$  células  $\cdot$  mL $^{-1}$ ), respectivamente.



**Figura 95:** Ensayo de dilución para células HRPEsv40 CT donde se muestran los perfiles resueltos en el tiempo para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de las células (inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs). Se aplicaron diluciones en serie empleando el tampón TRIZMA 0,1% NaCl (pH 7,4). a) 0 células  $\text{mL}^{-1}$ , b)  $1 \cdot 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , c)  $1 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , d)  $2,5 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , e)  $5 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , y f)  $1 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

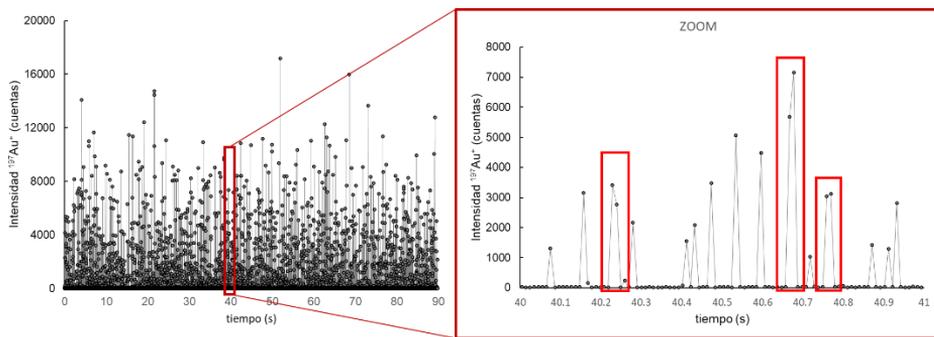
Tras el análisis de los datos para determinar el número de eventos celulares, una vez aplicado el umbral donde se resta la señal del fondo (i.e., Au iónico), se observó un aumento lineal para el número de células detectadas con la concentración de la muestra, de  $1 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^5$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (representadas en la **Figura 96** como círculos negros). Sin embargo, la intensidad media de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> fue constante con la dilución (representada como un gráfico de barras en la **Figura 96**), indicando detección de eventos celulares únicos por *dwell time* (10 ms) y por ello baja probabilidad de solapamiento de células por evento que aumentarían la señal promedio. Además, la señal procedente del Au disuelto fue siempre inferior a 10 cuentas, lo que demuestra que la inmunosonda de AuNCs marcó de manera altamente eficaz y eficiente la proteína específica (APOE en este caso concreto) dentro de la célula.



**Figura 96:** Resultados obtenidos para el ensayo de dilución de la suspensión de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). En el gráfico se representa en forma de barras la intensidad media de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> para la población celular medida por sc-ICP-MS, así como el número de células detectadas en 175 s de tiempo de adquisición, frente a la concentración de la suspensión celular (i.e., número de células por muestra tras contarlas con el hemocitómetro).

El comportamiento lineal observado para el número de eventos celulares en las suspensiones de células HRPEsv40 con una concentración entre  $1 \cdot 10^4$  -  $5 \cdot 10^5$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> no se cumple para la concentración más alta ( $1 \cdot 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) y, además, la señal de la intensidad media de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> aumenta hasta casi dos veces su valor. La **Figura 97** recoge el perfil resuelto en el tiempo para la señal de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> obtenido por

sc-ICP-MS para la suspensión de células con una concentración de  $1 \cdot 10^6$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Como se puede observar en el perfil ampliado a la derecha de la imagen, para dicha muestra algunos eventos están definidos por varios *dwell times* (cuadrados rojos en el perfil), hecho que no ocurre para las concentraciones más bajas de células. Por ello, se puede afirmar que para la muestra de células con una mayor concentración existe una alta probabilidad de superposición de dos células en el mismo evento, utilizando las condiciones de análisis establecidas (*dwell time* de 10 ms y velocidad de flujo de 40  $\mu$ L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>). Por lo tanto, la concentración de células seleccionada para los análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS fue de  $1 \cdot 10^5$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. En este caso, las señales del perfil resuelto en el tiempo están bien definidas y la posibilidad de solapamiento de múltiples células se minimiza.



**Figura 97:** Perfil resuelto en el tiempo para el análisis de células individuales empleando sc-ICP-MS donde se monitoriza la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs) para una muestra con una concentración de células HRPEsv40 CT de  $1 \cdot 10^6$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>.

#### G.4.4. Tratamiento de los datos: criterios para la discriminación de eventos celulares siguiendo las señales de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$

Con respecto a las señales de intensidad obtenidas para  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  en las suspensiones de células HRPEsv40 analizadas por sc-ICP-MS, los resultados experimentales mostraron que debe aplicarse un criterio de discriminación diferente ( $3\sigma$  ó  $5\sigma$ ) a los dos isótopos seleccionados para la correcta determinación de los eventos celulares. Al aplicar el mismo criterio de discriminación  $5\sigma$  para las señales de intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  resultantes del análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas

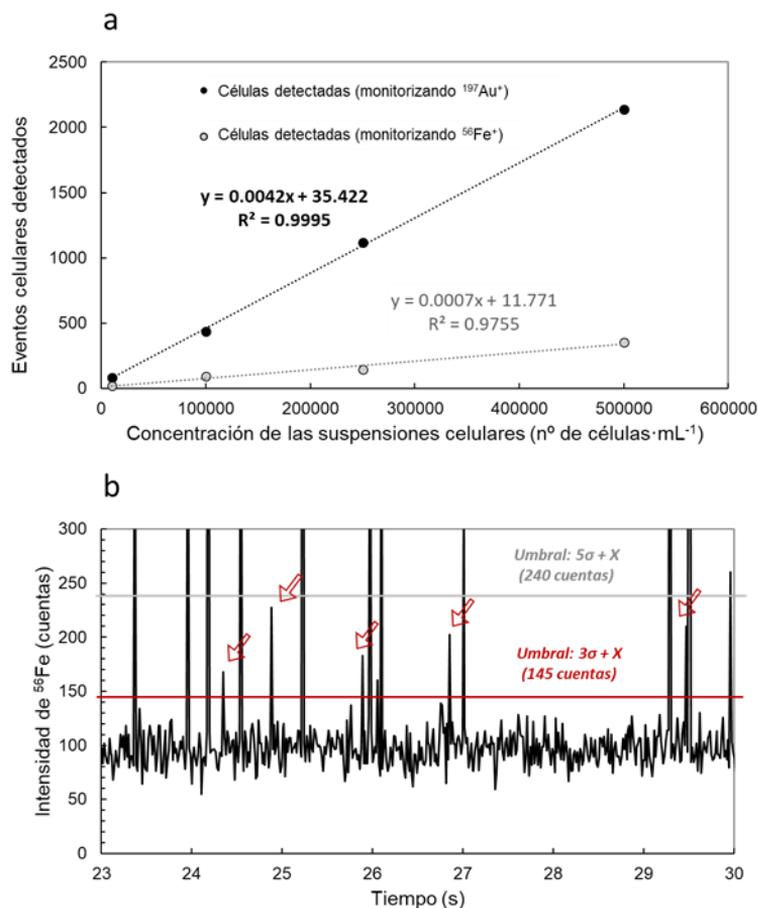
con IL1 $\alpha$ , el número de eventos celulares detectados con la seña de  $^{56}\text{Fe}^+$  fue menor que empleando la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (ver **Tabla 22**).

**Tabla 22:** Resultados obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPE<sub>SV40</sub> (CT e IL-1 $\alpha$ ) tratadas con la inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs empleando dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos: 5 $\sigma$  para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y 3 $\sigma$  y 5  $\sigma$  para la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$ . Eventos detectados durante una adquisición de 90 s ( $n=3$  réplicas instrumentales para  $^{197}\text{Au}^+$  y  $n=2$  para  $^{56}\text{Fe}^+$ ).

Monitorización $^{197}\text{Au}^+$			Monitorización de $^{56}\text{Fe}^+$					
	n° células	Promedio n° células - 5 $\sigma$	n° de células - 5 $\sigma$	Promedio n° células - 5 $\sigma$	% subestimación (5 $\sigma$ )	n° de células - 3 $\sigma$	Promedio n° células - 3 $\sigma$	% subestimación (3 $\sigma$ )
CT1	237	260	175	188	28%	254	273	5%
	250		200			292		
	292		-			-		
CT2	256	254	173	150	41%	223	247	3%
	222		127			270		
	286		-			-		
CT3	341	379	126	153	60%	382	401	6%
	373		179			420		
	424		-			-		
IL2	213	192	130	132	32%	218	226	17%
	180		133			233		
	184		-			-		
IL3	313	336	200	197	41%	319	328	2%
	349		193			336		
	345		-			-		

Además, tal y como se muestra en la **Figura 98a**, al representar el número de eventos detectados (aplicando el criterio 5 $\sigma$ ) frente a la concentración de células introducidas en el sistema, la pendiente que se obtiene para el  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  es muy diferentes. Esta observación puede atribuirse a una subestimación de los eventos celulares utilizando el criterio de 5 $\sigma$  para el  $^{56}\text{Fe}^+$ . Como puede verse en la imagen ampliada del perfil para la adquisición de  $^{56}\text{Fe}^+$  (**Figura 98b**), se observan claramente varios eventos celulares con intensidades inferiores al umbral aplicado para la discriminación 5 $\sigma$ . Estos eventos que han sido descartados en el tratamiento de datos (marcados en la imagen con flechas) deberían ser incluidos en el número de eventos puesto que representan señales de detección de células individuales (los blancos del procedimiento no presentan eventos debido a  $^{56}\text{Fe}^+$ ). Sin embargo, como se ilustra en la **Figura 98b** con una línea roja, al aplicar el criterio 3 $\sigma$  a las intensidades de  $^{56}\text{Fe}^+$

se detectó un mayor número de eventos celulares con el  $^{56}\text{Fe}^+$ , los cuales coinciden en el mismo rango con el número de eventos celulares determinado para la adquisición de  $^{197}\text{Au}^+$  con un criterio  $5\sigma$  (Tabla 22). Esta concordancia en el número de eventos celulares detectados aplicando los diferentes criterios para cada elemento monitorizado se comprobó para diferentes suspensiones de células HRPEsv40 CT.



**Figura 98:** Estudio que ilustra cómo afecta el tratamiento de los datos con los criterios  $5\sigma$  y  $3\sigma$  a la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  y  $^{56}\text{Fe}^+$  para el análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando AuNCs como etiqueta metálica en la detección de proteínas. a) Gráfico donde se observa una relación lineal entre el número de eventos celulares detectados frente a la concentración celular aplicando el mismo criterio de discriminación para el tratamiento de los datos:  $5\sigma + X$  para el  $^{197}\text{Au}^+$  y el  $^{56}\text{Fe}^+$ , y b) Perfil resuelto en el tiempo para la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$  ( $1 \cdot 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>) obtenido para el análisis de células HRPEsv40 CT por sc-ICP-MS donde se marcan con una línea los umbrales calculados aplicando los criterios  $3\sigma$  y  $5\sigma$  (línea roja y gris, respectivamente). Las flechas rojas marcan los eventos celulares que no se tienen en cuenta en caso de aplicar el criterio  $5\sigma + X$ .

Además, esta concordancia observada para el número de eventos celulares aplicando el criterio  $5\sigma$  para el Au y  $3\sigma$  para el Fe, se refleja también en la pendiente obtenida para la relación entre el número de células detectadas y la concentración de células en la suspensión: 0,0042 para el  $^{197}\text{Au}^+$  y 0,0041 para el  $^{56}\text{Fe}^+$  (la pendiente para la señal de Fe con el criterio  $3\sigma$  era de 0,0007; **Figura 98**). Se debe resaltar que aplicar el criterio  $5\sigma$  para determinar los eventos celulares con la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  permite discriminar los eventos que corresponden a la detección de las células HRPEsv40 de los posibles eventos debidos a las inmunosondas libres marcadas con AuNCs, las cuales no estaban unidas a las proteínas citosólicas en las células y que puedan no haberse eliminado completamente en las etapas de lavado.

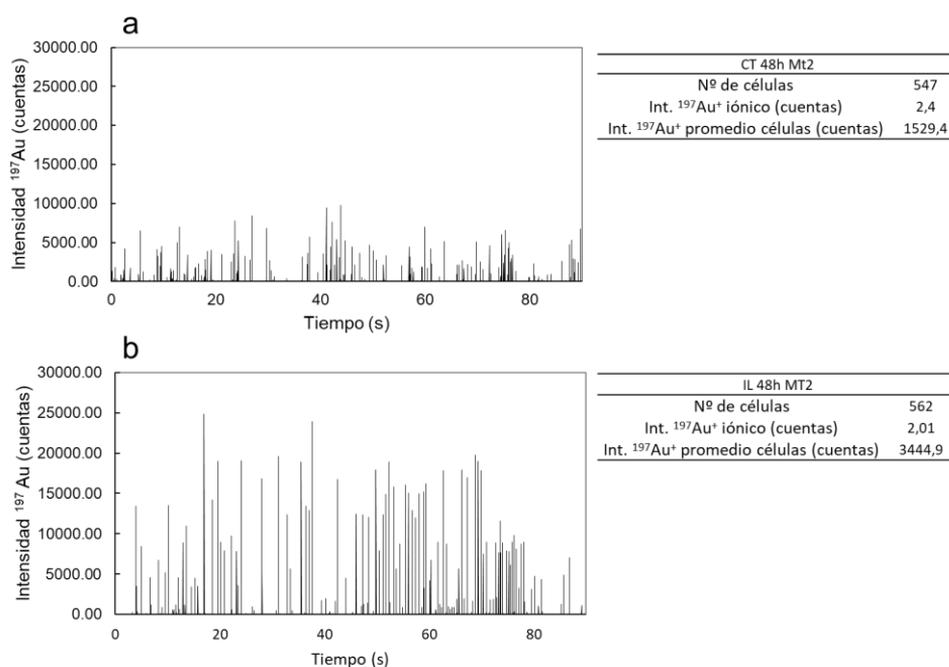
### **G.4.5. Determinación de APOE y MT2A en células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs: células CT y tratadas con IL1 $\alpha$**

La determinación de APOE y MT2A en las células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS se realizó de forma independiente en las suspensiones celulares sometidas al inmunoensayo con las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, respectivamente. Además, cada proteína se cuantificó en las células cultivadas CT y aquellas sometidas a un tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$ .

#### **G.4.5.1. Determinación de MT2A en células HRPEsv40**

Para evaluar la posible variación en los niveles de expresión de MT2A bajo condiciones de estrés inflamatorio, las células HRPEsv40 CT y sometidas al tratamiento con IL1 $\alpha$  (tras la incubación con la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs) fueron analizadas por sc-ICP-MS bajo las condiciones de trabajo optimizadas. A modo de ejemplo, en la **Figura 99a y b** se muestran los perfiles de tiempo resulto obtenidos para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  por sc-ICP-MS en las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$ , respectivamente. Se puede observar que la intensidad de los eventos de Au (correspondientes a los AuNCs de la inmunosonda y, por tanto, que detectan la proteína citosólica MT2A) aumentan con el tratamiento con IL1 $\alpha$  (**Figura 99a vs Figura**

99b). Como se muestra en las Tablas incluidas en la **Figura 99**, tras el tratamiento de datos iterativo aplicando el umbral  $5\sigma$ , se obtienen en ambos casos un número de eventos celulares comparables durante los 90 s de adquisición (547 células CT y 562 células tratadas con IL1 $\alpha$ ). Para la intensidad media de  $^{197}\text{Au}^+$  por evento, esta se ve incrementa de  $\sim 1500$  cuentas en las células CT a  $\sim 3400$  cuentas en las células tratadas con IL1 $\alpha$  (la señal es más del doble al comparar estas dos muestras biológicas). Estos valores observados para las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  sugieren una sobreexpresión de MT2A tras el tratamiento proinflamatorio.



**Figura 99:** Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  obtenidos para el análisis de células HRPE<sub>si40</sub> CT y tratadas con IL1 $\alpha$  por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-b-MT2A: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL1 $\alpha$ . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio  $5\sigma + X$ .

Una vez analizadas las muestras, las señales obtenidas para la intensidad de  $^{197}\text{Au}^+$  pueden ser transformadas en concentración de MT2A (expresada como fg de proteína por célula), teniendo en cuenta la calibración con estándares de Au en disolución, así como el factor de amplificación de la inmunosonda. La **Tabla 23** contiene

los resultados obtenidos del análisis por sc-ICP-MS para la MT2A en células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$  (tres réplicas biológicas por condición y cada una de ellas con tres réplicas analíticas).

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que el tratamiento de las células HRPEsv40 con 100 ng·mL<sup>-1</sup> de IL1 $\alpha$  durante 48 h produce un aumento significativo de los niveles intracelulares de MT2A (se observó un cambio de 1,8 veces para la concentración de MT2A entre ambos grupos de células). Cabe mencionar que la incertidumbre asociada a la concentración de MT2A obtenida por sc-ICP-MS es elevada, pero puede atribuirse principalmente a la gran variabilidad biológica de las suspensiones celulares. La desviación estándar asociada a la concentración de MT2A en las células CT fue particularmente grande, especialmente para la réplica CT2 que mostró una concentración significativamente menor que las otras réplicas. Indicar que este valor se incluyó también para determinar la concentración media de la proteína en las células, aunque incluso descartando este valor se observó una sobreexpresión de MT2A en las células HRPEsv40 tratadas con IL1 $\alpha$ .

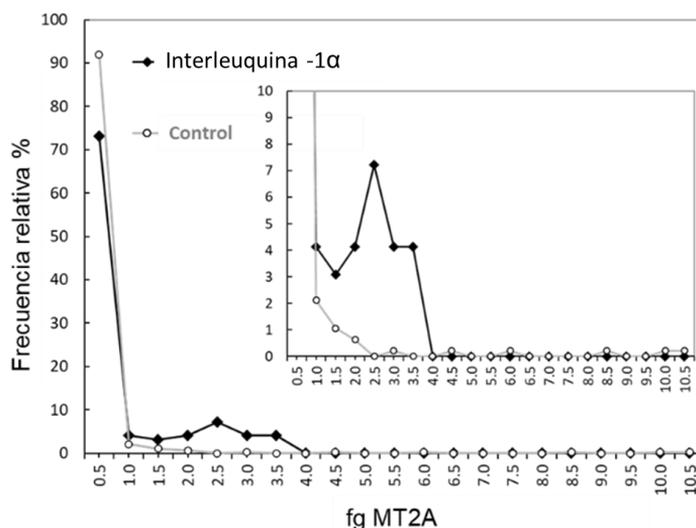
Como también se incluye en la **Tabla 23**, el <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> se monitorizó para todas las muestras, mostrando valores para el número de eventos celulares comparables a los detectados monitorizando la señal de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup>. Hay que tener en cuenta que las variaciones en el número de eventos detectados son asumibles teniendo en cuenta que no se están midiendo simultáneamente los dos isótopos; aunque se trata de la misma suspensión celular (misma réplica biológica) la adquisición de <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> y <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> no se está realizando al mismo tiempo para una misma célula.

**Tabla 23:** Resultados experimentales obtenidos para la determinación de MT2A en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A: AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (rep. bio.) para cada condición (CT e IL1 $\alpha$ ) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3).

		Nº eventos <sup>56</sup> Fe+	Nº eventos <sup>197</sup> Au+	Int. <sup>197</sup> Au+/cel	fg Au/cel	fg MT2A/cel	Rango fg MT2A/cel	fg MT2 A/cel	fg rep. bio. MT2A/cel
CT1	R1	459	473	375,6	17,2	1,16	0,032-38,4	1,05	0,66±0,45
	R2	654	716	231,1	10,97	1,06	0,092-18,1		
	R3	*	713	210,1	9,94	0,94	0,1-18,87		
CT2	R1	199	206	43,92	2,07	0,17	0,023-2,7	0,16	
	R2	204	229	44,11	2,08	0,15	0,02-4,8		
	R3	-	-	-	-	-	-		
CT3	R1	309	368	265,6	12,57	0,83	0,026-28,5	0,77	
	R2	427	396	283,1	13,39	0,76	0,026-27,2		
	R3	*	467	230,6	10,91	0,72	0,023-31,0		
IL1	R1	487	469	326,0	15,43	1,04	0,026-23,4	1,04	
	R2	481	500	165,9	7,87	0,52	0,026-37,2		
	R3	*	563	140,3	6,64	0,44	0,029-38,72		
IL2	R1	189	209	86,2	4,08	0,26	0,023-17,5	1,2	
	R2	243	215	47,02	2,22	0,15	0,023-6,48		
	R3	*	483	384,8	18,21	1,2	0,03-48,37		
IL3	R1	478	422	444,7	21,04	1,38	0,026-30,72	1,34	
	R2	407	455	408,2	19,31	1,27	0,026-33,21		
	R3	*	481	414,3	19,6	1,36	0,026-39,11		

Por otro lado, y para entender mejor la gran incertidumbre obtenida para los valores de concentración de MT2A en las réplicas biológicas, resulta interesante estudiar el histograma de frecuencia de masa para cada muestra. Además, los histogramas proporcionan información muy valiosa a la hora de evaluar el posible efecto del tratamiento proinflamatorio en cada célula individual para una población de células HRPEsv40. En la **Figura 100** se muestran los histogramas obtenidos para el análisis de una suspensión de células HRPEsv40 CT y otra de células tratadas con IL1 $\alpha$ , donde se representa el porcentaje de células que contienen una determinada cantidad de MT2A (expresada en fg). En ambos casos se encontró un elevado número de células con cantidades muy bajas de MT2A (0,5-1,0 fg de MT2A). Además, se observó que alrededor del 20% de las células se vieron significativamente afectadas por el tratamiento con IL1 $\alpha$ , y la masa de MT2A en dichas células estaba en el rango de

1,0-3,5 fg de MT2A. Este porcentaje de células aumentó significativamente los niveles de expresión de la proteína, mientras que el resto de la población celular mostró valores similares para las células CT y tratadas con IL1 $\alpha$ , lo que indica una respuesta biológica diferente para las células individuales dentro de una población frente a un mismo estímulo proinflamatorio en condiciones *in vitro*.

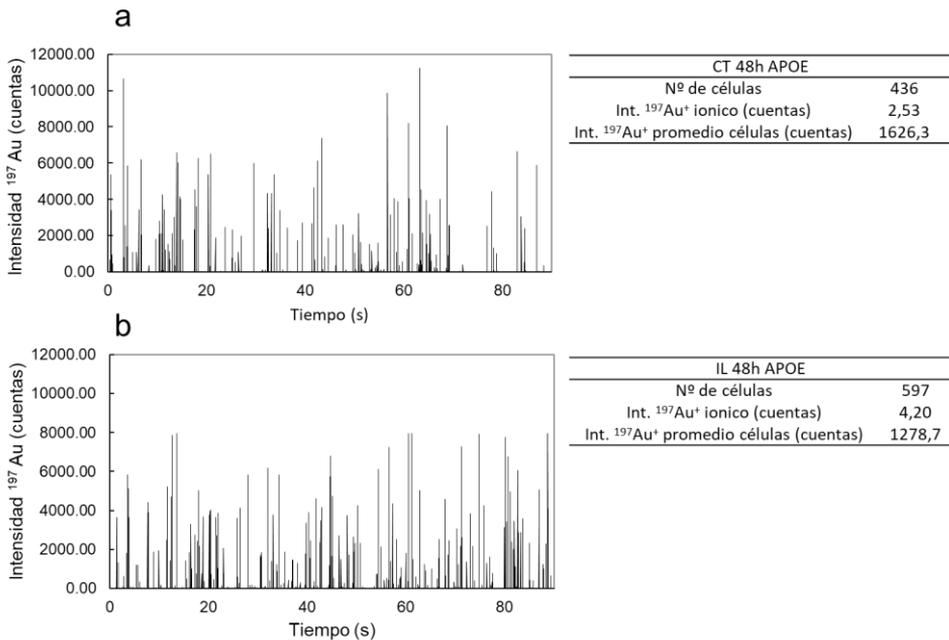


**Figura 100:** Histograma de frecuencia de masa para la MT2A en células HRPEsv40 CT (CT2-R2; línea gris) y células tratadas con IL1 $\alpha$  (IL3-R2; línea negra) tras su análisis por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A: AuNCs).

#### G.4.5.2. Determinación de APOE en células HRPEsv40

Al igual que en el caso de la MT2A, el contenido de APOE en las células HRPEsv40 se determinó mediante sc-ICP-MS, utilizando en este caso la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs, para evaluar la influencia del tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$ . A modo de ejemplo, en la **Figura 101** se muestran los perfiles de tiempo resuelto obtenidos para células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$ . A diferencia de lo que ocurría para la MT2A, no se observa un cambio significativo con respecto a las intensidades de  $^{197}\text{Au}^+$  para los eventos celulares detectados en las células CT y tratadas con IL1 $\alpha$ . Tal y como se describe en el Capítulo III para los análisis tanto de expresión génica por RT-qPCR, como en los ELISA cuantitativos la APOE

muestra una disminución de su expresión (nivel gen o nivel proteína respectivamente) del ~40% bajo los efectos del tratamiento proinflamatorio con IL1 $\alpha$ .



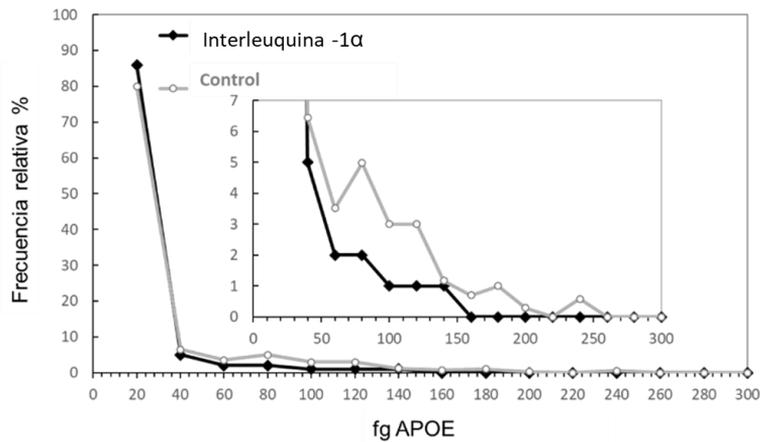
**Figura 101:** Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> obtenidos para el análisis de células HRPE<sub>sv40</sub> CT y tratadas con IL1 $\alpha$  por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-APOE: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL1 $\alpha$ . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio 5 $\sigma$  +X.

Tras el tratamiento de todos los datos obtenidos por sc-ICP-MS para las réplicas biológicas (recogidos en la **Tabla 24**), se puede observar que los rangos y los valores medios de concentración obtenidos para APOE mostraban una disminución significativa del contenido de dicha proteína, lo que sugiere que los niveles de APOE disminuyen tras el tratamiento proinflamatorio. Se ha obtenido una masa de APOE promedio para las réplicas biológicas de  $18,1 \pm 2,1$  fg para las células CT y  $13,3 \pm 0,4$  fg para las células sometidas al tratamiento proinflamatorio.

**Tabla 24:** Resultados experimentales obtenidos para la determinación de APOE en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE::AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (rep. bio.) para cada condición (CT e IL-1 $\alpha$ ) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3).

		Nº de eventos <sup>56</sup> Fe <sup>+</sup>	Int. eventos <sup>197</sup> Au <sup>+</sup>	fg Au/cel	fg APOE/cél	Range de fg APOE/Cél	Int. promedio de APOE/cel	Promedio rep. bio. fg APOE/cell
CT1	R1	237	1470,7	69,58	24,99	0,28-230	20,7	18,1±2,1
	R2	250	1354,88	64,1	23,02	0,25-215		
	R3	292	829,57	39,248	14,09	0,23-199		
CT2	R1	-	-	-	-	-	16,6	
	R2	222	1091	51,65	18,55	0,24-498		
	R3	286	857	40,54	14,56	0,26-284		
CT3	R1	341	901,81	42,67	15,31	0,31-238	17,0	
	R2	373	1249	59,13	21,09	0,30-211		
	R3	424	864,34	40,89	14,68	0,30-186		
IL1	R1	307	637	34,74	13,10	0,10-111	12,8	
	R2	345	752	35,60	12,78	0,09-124		
	R3	320	689	35,07	12,59	0,52-169		
IL2	R1	213	786	37,17	13,35	0,23-151	13,5	
	R2	180	879	41,58	14,93	0,23-164		
	R3	184	728	33,96	12,2	0,26-230		
IL3	R1	313	1011	47,84	17,18	0,29-206	13,7	
	R2	349	739	34,53	12,4	0,28-173		
	R3	345	678	32,06	11,39	0,27-191		

Al igual que se mostró para la MT2A, en la **Figura 102** se representa el histograma de frecuencia de masas por célula obtenido para la APOE por sc-ICP-MS para una de las réplicas biológicas medidas de la suspensión de células HRPEsv40 CT y otra para células tratadas con IL1 $\alpha$ . Como puede observarse, sólo el ~11% de las células mostraron una disminución de la expresión de la proteína tras el tratamiento con IL1 $\alpha$ . Además, el porcentaje de células que mostraban una menor concentración de APOE tras el tratamiento con IL1 $\alpha$  estaba en el rango de concentración de proteína entre 40-140 fg APOE (i.e., a niveles relativamente bajos de concentración si se compara con los máximos de concentración a los que llegan algunos rangos de masa de APOE de algunas poblaciones celulares, **Tabla 24**).



**Figura 102:** Histograma de frecuencias de masa para la APOE en células HRPEsv40 CT (CT2-R1; línea gris) y células tratadas con IL1 $\alpha$  (IL3-R3; línea negra) tras su análisis sc-ICP-MS (inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs).

Finalmente, los resultados obtenidos para ambas proteínas con el análisis por sc-ICP-MS fueron comparados con la masa de MT2A y APOE encontradas para la cuantificación de las células HRPEsv40 empleando kits ELISA comerciales, así como con la metodología desarrollada por LA-ICP-MS (Capítulo III de la Tesis Doctoral).

Por un lado, los valores medios determinados por sc-ICP-MS para la MT2A (fg MT2A/célula) en células HRPEsv40 se pueden comparar con los obtenidos por un kit comercial ELISA cuantitativo empleando la fracción citosólica de células HRPEsv40 lisadas. La concentración de MT2A determinada por el kit ELISA resultó ser de  $1,74 \pm 0,18$  fg MT2A/célula para las células HRPEsv40 CT y de  $3,36 \pm 0,50$  fg MT2A/célula para las células tratadas con IL1 $\alpha$ . Los resultados experimentales muestran un aumento de 1,9 veces la expresión de la proteína tras el tratamiento con IL1 $\alpha$ , lo que confirma la sobreexpresión de MT2A observada tras el tratamiento proinflamatorio. Aunque las concentraciones medias obtenidas por sc-ICP-MS y ELISA estaban en el mismo rango, se observan algunas diferencias. Esto puede ser atribuible al hecho de que se emplearon cultivos celulares diferentes (*batch* diferentes de células) para llevar a cabo la cuantificación por ELISA y los análisis por sc-ICP-MS. Para el caso de la APOE, la concentración media de APOE determinada por

ELISA fue de  $17,9 \pm 1,3$  fg APOE/célula para las células CT y de  $10,2 \pm 0,53$  fg APOE/célula para las células tratadas con IL1 $\alpha$ , lo que concuerda de nuevo con el contenido proteico medio determinado por sc-ICP-MS. En contraste con la sobreexpresión de MT2A observada tras el tratamiento proinflamatorio, se observaron cambios de 0,7 y 0,6 veces respectivamente para APOE por sc-ICP-MS y ELISA entre las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$ .

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en este capítulo con los obtenidos mediante la estrategia de cuantificación por LA-ICP-MS desarrollada en el Capítulo III (ver **Sección F.4.3**), se obtuvieron las mismas tendencias de expresión, un aumento de 1,9 para MT2A al medir por sc-ICP-MS frente al aumento de 2,1 encontrado mediante LA-ICP-MS y para el caso de APOE, una disminución de la expresión, siendo 0,7 la encontrada mediante sc-ICP-MS y 0,6 la encontrada por LA-ICP-MS. Sin embargo, queda clara la tendencia de la expresión de ambas proteínas observada por las tres estrategias, así como los valores absolutos en el mismo rango de concentración.

## G.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones específicas de este capítulo IV se centran en la cuantificación de dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células individuales de HRPEsv40 CT y tratadas con IL1 $\alpha$  (48 h) mediante medidas de células en suspensión sc-ICP-MS empleando las inmunosondas marcadas con los AuNCs sintetizados en el Capítulo III. Las conclusiones son:

- ✓ Por una parte, se estudiaron los parámetros de introducción de muestra y preparación de las células HRPEsv40 para asegurar su integridad celular durante el tratamiento, procesamiento e inmunoensayo en suspensión.
  - Se optimizaron las etapas del inmunoensayo en suspensión con el objetivo de disminuir el tiempo de las incubaciones (incubación 1h frente toda la noche de la inmunosonda)
  - Aplicación de un protocolo nuevo de fijación “fijación suave” frente a la tradicional con la que se pierden más del 40% de las células.
- ✓ Se monitorizó el  $^{56}\text{Fe}^+$  como elemento intrínseco de las células para corroborar los eventos celulares detectados por la inmunosonda y la integridad celular de las mismas.
  - Se evaluaron los criterios de discriminación  $3\alpha + X$  y  $5\alpha + X$  para el tratamiento de los datos obtenidos por sc-ICP-MS al monitorizar  $^{197}\text{Au}^+$  o  $^{56}\text{Fe}^+$ , encontrando que, aplicando el criterio  $5\alpha + X$  permitía discriminar los eventos celulares de los eventos debidos a las inmunosondas en disolución al monitorizar  $^{197}\text{Au}^+$  mientras que  $3\alpha + X$  permitió para el caso del hierro no descartar eventos de menor intensidad que eran debidos a células. Así mismo, la monitorización de hierro en todas las muestras medias se empleó como manera de comprobación de la integridad celular y de chequeo al comparar el número de eventos detectados.
- ✓ Los resultados obtenidos mediante sc-ICP-MS para la concentración de MT2A y APOE por célula se compararon con los obtenidos previamente en

el capítulo III, dando valores en el mismo rango de concentración para ambas proteínas. Además, observándose la misma tendencia de sobreexpresión para la proteína MT2A (de 1,9 veces mayor tras el tratamiento) y subexpresión de la proteína APOE (0,6 veces menor tras el tratamiento).

- ✓ Por lo tanto, este trabajo allana el camino para el análisis posterior de las proteínas citosólicas, así como para el uso de estas inmunosondas marcadas con AuNCs caracterizadas para la determinación de otro tipo de proteínas u otros cultivos celulares por sc-ICP-MS. Además, la aplicación de etiquetas constituidas por otros NCs metálicos (por ejemplo, Pt, Au, Ir) permitiría la determinación sensible simultánea (los NCs contienen un alto número del isótopo detectado por tamaño de la etiqueta) de diferentes proteínas en células individuales cuando se utiliza la espectrometría de masas de tipo TOF para la detección.





---

H. CONCLUSIONES

GENERALES/

*GENERAL*

*CONCLUSIONS*

---



La conclusión general que se puede extraer de los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral es el gran potencial analítico que han demostrado las estrategias de marcaje elemental empleando MNCs en combinación con las técnicas de detección por ICP-MS. Estas estrategias permiten el desarrollo de metodologías para el estudio cuantitativo de proteínas en diferentes tipos de muestras biológicas, desde tejidos (nivel supracelular) a células individuales (nivel celular). Esta conclusión se fundamenta en los siguientes puntos:

- ✓ **A lo largo del Capítulo I se logró una síntesis óptima de PtNCs y su aplicación como nuevos nanomarcadores en el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de IgE en suero humano.**

Tras la optimización de su síntesis, los PtNCs se caracterizaron en cuanto a sus propiedades ópticas y estructurales, su estabilidad y la concentración en suspensión acuosa, demostrando una elevada calidad para uso como nanoestructuras de detección multimodal (fluorescencia e ICP-MS). Se logró optimizar la relación molar anticuerpo:PtNCs (1:20) para generar inmunosondas que mantengan la funcionalidad de anticuerpo, las propiedades luminiscentes de los PtNCs, así como un elevado número de átomos de platino por inmunosonda. Posteriormente se evaluó su empleo para la cuantificación de biomoléculas y como prueba de concepto se aplicó a la determinación del biomarcador de la enfermedad alérgica, IgE. Para ello se desarrolló un inmunoensayo competitivo directo empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs como marcaje para la detección (sin necesidad de anticuerpo secundario) y bimodal (fluorescente y elemental), logrando mejorar los límites de detección de las metodologías habitualmente usadas y disponibles comercialmente. Dicho inmunoensayo se ha utilizado para la determinación de IgE en cuatro muestras de suero humano mediante medidas por ICP-MS con nebulización convencional y los resultados obtenidos fueron confirmados mediante el método de referencia: inmunoensayo ELISA comercial. La elevada amplificación de la señal obtenida por ICP-MS,  $\sim 1300$  átomos de Pt por Ab y el buen límite de detección obtenido ( $0,08 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IgE), demuestran el prometedor uso de los PtNCs como marcas elementales en este tipo

de aproximaciones donde las concentraciones de las proteínas se presentan en muy bajas concentraciones.

- ✓ **En el Capítulo II se consiguió desarrollar y aplicar una metodología de *bioimaging* múltiple de tres proteínas (MT1/2, CFH y APP) en tejidos oculares combinando una estrategia de marcaje inmunohistoquímico simultáneo al emplear tres inmunosondas metálicas específicas sintetizadas con tres MNCs diferentes: AuNCs, AgNCs y PtNCs, y detección por LA-ICP-MS.**

En una primera etapa se logró sintetizar y caracterizar las inmunosondas: Anti-h-MT1/2:AuNCs (310 átomos de Au), Anti-h-CFH:AgNCs (730 átomos de Ag) y Anti-h-APP (1194 átomos de Pt) para su uso en estrategia de marcaje múltiple. Así, posteriormente a la adición de las tres inmunosondas durante un proceso inmunohistoquímico, se pudo obtener por LA-ICP-MS el *imaging* (i. e., distribución) cualitativo de cada proteína recogiendo las señales de los tres elementos constitutivos de los NCs:  $^{197}\text{Au}^+$  para MT1/2,  $^{107}\text{Ag}^+$  para CFH y  $^{195}\text{Pt}^+$  para APP. Para ello, previamente se optimizaron las condiciones de análisis por LA-ICP-MS a fin de conseguir la mejor resolución lateral para el análisis de las tres proteínas (i.e., detección de  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{195}\text{Pt}^+$  y  $^{107}\text{Ag}^+$ ) en la misma sección de tejido empleando un ICP-MS con un analizador de masas de doble enfoque. Adicionalmente, se obtuvieron imágenes 2D de distribución semicuantitativa empleando una estrategia de calibración con patrones de gelatina dopados con Au, Ag y Pt. El *imaging* cuantitativo de las tres proteínas en las estructuras micrométricas de la retina permitió observar la acumulación de depósitos extracelulares relacionados con la DMAE, y las distribuciones proteicas fueron corroboradas mediante IHC convencional con fluoróforos secundarios (p. e., Fluor Alexa® 488) como marcas de los anticuerpos. Además, con esta metodología se consiguieron obtener distribuciones cuantitativas de proteínas en regiones oculares (EPR o CB) que mediante las técnicas convencionales de IHC e IF no se puede distinguir por la autofluorescencia del tejido

- ✓ **En el Capítulo III se consiguió desarrollar una estrategia de cuantificación de dos proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en células individuales humanas del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40) empleando LA-ICP-MS.**

Primeramente, para llevar a cabo los análisis en células, la síntesis de los AuNCs fue optimizada con el objetivo de disminuir la desviación asociada a la dispersión de sus diámetros y así lograr valores de cuantificación más precisos. Posteriormente, para llevar a cabo los análisis cuantitativos por LA-ICP-MS, se generaron patrones de laboratorio cuya matriz es igual a la compleja matriz celular de las muestras. Para ello, células de HRPEsv40 fueron suplementadas con suspensiones de concentraciones crecientes de AuNCs (patrones unicelulares: HRPEsv40@AuNCs). Para la detección por ICP-MS de las proteínas en las células individuales se desarrolló una estrategia de marcaje elemental empleando inmunosondas específicas marcadas con AuNCs. Con esta estrategia fue posible estudiar cuantitativamente las alteraciones en los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la DMAE en células individuales bajo condiciones de inflamación con la citoquina interleuquina-1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ). Los resultados de fg/célula de APOE y MT2A en las células HRPEsv40 control y tratadas con IL1 $\alpha$  obtenidos por LA-ICP-MS empleando la metodología de análisis desarrollada en este capítulo se corroboraron con éxito mediante el empleo de kits de cuantificación ELISA comerciales y mediante análisis de la expresión genética, RT-qPCR.

- ✓ **Finalmente, en el Capítulo IV se logró estudiar cuantitativamente las proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células individuales de poblaciones celulares del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40) tras el inmunoensayo empleando inmunosondas específicas marcadas con AuNCs y la técnica *single cell*-ICP-MS.**

Se optimizaron las condiciones de introducción de las muestras celulares en suspensión líquida en el sistema sc-ICP-MS a fin de evitar el solapamiento de células por evento del ICP-MS al ajustar un *dwell time* de 10 ms; se prestó especial atención a

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

---

la optimización de concentración celular y al flujo de introducción de muestra. Además, se midió la señal de  $^{56}\text{Fe}^+$  como elemento constitutivo de las células HRPEsv40 con el objetivo de comprobar su integridad tras el inmunoensayo en suspensión y confirmar el número de eventos celulares detectados debido a las marcas ( $^{197}\text{Au}^+$ ). Se logró cuantificar las proteínas citosólicas (MT2A y APOE) secuencialmente en células HRPEsv40 (control y tratadas con IL1 $\alpha$ ) al transformar la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  de cada evento celular medido por sc-ICP-MS en concentración de oro por célula, teniendo en cuenta la eficiencia de transporte (empleando un patrón certificado de AgNPs con diámetro de 60 nm), el flujo de muestreo, el *dwell time* y la pendiente de un calibrado de disoluciones patrón de Au. Posteriormente, conociendo la estequiometría de las inmunosondas (i. e., relación molar  $\text{MNCs}:\text{Ab}_{\text{disponible}}$ ) fue posible determinar los fg de cada proteína por célula individual. Los resultados cuantitativos obtenidos por célula para APOE y MT2A mediante el procedimiento sc-ICP-MS se corroboraron con kits comerciales ELISA. De esta manera, con la nueva metodología se logra estudiar con éxito el comportamiento y las variabilidades biológicas cuantitativas de cada proteína, célula a célula, en condiciones control y bajo un tratamiento de inflamación en muestras celulares con un mayor número de células medidas por análisis si se compara con las metodologías de análisis de células individuales empleando LA-ICP-MS.

The general conclusion that can be drawn from the results obtained throughout this PhD Thesis is the huge analytical potential that elemental tagging strategies using MNCs in combination with ICP-MS detection techniques have demonstrated. These approaches allow the development of methodologies for the quantitative study of proteins in different types of biological samples, from tissues (supracellular level) to individual cells (cellular level). This conclusion is based on the following points:

- ✓ **In Chapter I an optimal synthesis of PtNCs and their application as new nano-labels in the development of an immunoassay for the determination of IgE in human serum was achieved.**

After optimisation of their synthesis, the PtNCs were characterised in terms of their optical and structural properties, stability, and concentration in aqueous suspension, demonstrating high quality for use as nanostructures for multimodal detection (fluorescence and ICP-MS). The antibody:PtNCs molar ratio (1:20) was optimised to generate immunoprobes that maintain the antibody functionality, the luminescent properties of the PtNCs, as well as a high number of platinum atoms per immunoprobe. Subsequently, their use for the quantification of biomolecules was evaluated and, as a proof of concept, applied to the quantification of IgE, a biomarker of allergic disease. For this purpose, a direct competitive immunoassay was developed using the Anti-h-IgE:PtNCs immunoprobe as a bimodal (fluorescent and elemental) detection marker (needless secondary antibody), improving the detection limits of commonly used and commercially available methodologies. This immunoassay has been used for the determination of IgE in four human serum samples by ICP-MS measurements with conventional nebulisation and the results obtained were confirmed by the reference method: commercial ELISA immunoassay. The high amplification of the signal obtained by ICP-MS, ~1200 Pt atoms per Ab and the good detection limit obtained (0.08 ng·mL<sup>-1</sup> IgE), demonstrate the promising use of PtNCs as elemental tags in this type of approaches where protein concentrations are present in very low concentrations.

- ✓ **In Chapter II was successfully developed and applied a methodology for multiple bioimaging of three proteins (MT1/2, CFH and APP) in ocular tissues by combining a simultaneous immunohistochemical labelling strategy using three specific metal immunoprobes synthesised with three different MNCs: AuNCs, AgNCs and PtNCs, and detection by LA-ICP-MS.**

Firstly, it was possible to synthesise and characterise the immunoprobes: Anti-h-MT1/2:AuNCs (310 Au atoms), Anti-h-CFH:AgNCs (730 Ag atoms) and Anti-h-APP (1194 Pt atoms) for use in a multiple labelling strategy. Thus, after the addition of the three immunoprobes during an immunohistochemical procedure, it was possible to obtain by LA-ICP-MS the qualitative imaging (i.e., distribution) of each protein by collecting the signals of the three constituent elements of the NCs:  $^{197}\text{Au}^+$  for MT1/2,  $^{107}\text{Ag}^+$  for CFH and  $^{195}\text{Pt}^+$  for APP. For such purpose, the LA-ICP-MS analysis conditions were previously optimised to achieve the best lateral resolution for the analysis of the three proteins (i.e., detection of  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{195}\text{Pt}^+$  and  $^{107}\text{Ag}^+$ ) in the same tissue section using an sector field ICP-MS. Additionally, 2D images of semi-quantitative distribution were obtained using a calibration strategy with gelatin standards doped with Au, Ag and Pt. Semiquantitative imaging of the three proteins in the micrometric structures of the retina allowed us to observe the accumulation of extracellular deposits related to AMD, and the protein distributions were corroborated by conventional IHC with secondary fluorophores (e.g., Fluor Alexa® 488) as antibody tags. Furthermore, this methodology allowed to obtain semi-quantitative protein distributions in eye regions that show autofluorescence (EPR or CB), overcoming the limitation of conventional IHC and IF techniques.

- ✓ **Chapter III succeeded in developing a strategy for the quantification of two cytosolic proteins (APOE and MT2A) in human in-dividual retinal pigment epithelium (HRPEsv40) cells using LA-ICP-MS.**

First at all, to perform the analysis in cells, the synthesis of the AuNCs was optimised in order to reduce the deviation associated with the dispersion of their

diameters and thus achieve more accurate quantification values. Subsequently, to carry out quantitative analyses by LA-ICP-MS, laboratory standards were generated whose matrix is equal to the complex cellular matrix of the samples. For this purpose, HRPEsv40 cells were supplemented with suspensions of increasing concentrations of AuNCs (single-cell standards: HRPEsv40@AuNCs). For ICP-MS detection of proteins in individual cells, an elemental tagging strategy was developed using specific immunoprobes labelled with AuNCs. With this strategy it was possible to quantitatively study alterations in AMD-related protein expression levels in individual cells under inflammation conditions with the cytokine interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ). The fg/cell results of APOE and MT2A in control and IL-1 $\alpha$ -treated HRPEsv40 cells obtained by LA-ICP-MS using the analysis methodology developed in this chapter were successfully corroborated using commercial ELISA kits and by gene expression analysis, RT-qPCR.

- ✓ **Finally, in Chapter IV, cytosolic proteins (MT2A and APOE) were quantitatively studied in single cells of retinal pigment epithelium cell populations (HRPEsv40) by tagging strategy using specific immunoprobes labelled with AuNCs and single cell-ICP-MS.**

The conditions for the introduction of cell samples in liquid suspension into the sc-ICP-MS system were optimised to avoid cell overlap per ICP-MS event by setting a dwell time of 10 ms; special attention was paid to the optimisation of cell concentration and sample introduction flow. In addition, the  $^{56}\text{Fe}^+$  signal was measured as a constitutive element of HRPEsv40 cells in order to check their integrity after the suspension immunoassay and to confirm the number of cellular events detected due to the tags ( $^{197}\text{Au}^+$ ). Cytosolic proteins (MT2A and APOE) were quantified sequentially in HRPEsv40 cells (control and IL-1 $\alpha$ -treated) by transforming the  $^{197}\text{Au}^+$  signal of each cellular event measured by sc-ICP-MS into gold concentration per cell, taking into account the transport efficiency (using a certified AgNPs standard with a diameter of 60 nm), the sampling flow, the dwell time and the slope of a

## ***GENERAL CONCLUSIONS***

---

calibration curve using Au standard solution. Subsequently, knowing the stoichiometry of the immunoprobes (i.e.  $\text{MNCs}:\text{Ab}_{\text{available}}$  molar ratio) it was possible to determine the fg of each protein per individual cell. The quantitative results obtained per cell for APOE and MT2A by the sc-ICP-MS procedure were corroborated with commercial ELISA kits. Thus, with the new methodology, it is possible to successfully study the behaviour and quantitative biological variabilities of each protein on a cell-by-cell basis under control conditions and under inflammation treatment in cell samples with a higher number of cells measured per analysis compared to single cell analysis methodologies using LA-ICP-MS.





---

I. SUGERENCIAS  
PARA TRABAJOS  
FUTUROS/  
SUGGESTIONS FOR  
FURTHER RESEARCH

---



Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral abren camino a posibles trabajos futuros que permitirían continuar con la línea de investigación llevada a cabo en los últimos años. A continuación, se resumen algunas de las ideas planteadas:

- Aplicación de los MNCs a estrategias de marcaje múltiple y simultáneo. El empleo de MNCs sintetizados con diferentes metales (p ej. AuNCs, AgNCs, PtNCs, IrNCs PdNCs) generarían hasta 5 inmunosondas metálicas diferentes al ser bioconjugados a anticuerpos específicos. Adicionalmente, se podrían sintetizar hasta 16 marcas teniendo en cuenta los isótopos estables de estos metales. Esta estrategia ampliaría el uso de los MNCs y permitiría el análisis múltiple de proteínas haciendo uso de espectrometría de masas casi simultánea como el tiempo de vuelo.

- Evaluación de la estrategia de cuantificación desarrollada en el Capítulo III basada en la producción de patrones unicelulares con la misma línea celular que la muestra para la cuantificación de otras proteínas por LA-ICP-MS, con otros MNCs y en otras líneas celulares. Para ello habría que estudiar en primer lugar la viabilidad de cada MNCs en la línea celular elegida durante los estudios de internalización y posteriormente evaluar y validar la estrategia de cuantificación para otras biomoléculas. Además, sería interesante estudiar la posibilidad de generar patrones unicelulares múltiples (internalización de concentraciones crecientes de diferentes MNCs simultáneamente). Esto permitiría ampliar la estrategia también a la cuantificación múltiple de proteínas por LA-ICP-MS usando patrones *matrix-matched* de calibración.

- Mejora de la resolución en los *bioimaging*s de células por LA-ICP-MS. Con la incorporación del sistema DCI que permite reducir los tiempos de evacuación la celda de ablación de 600 ms a 100 ms, la resolución de los *bioimaging*s es mejorada notablemente por lo que la obtención de distribuciones de proteínas con alta resolución subcelular tanto cualitativas como cuantitativas sería posible.

- Incorporación de los sistemas de introducción de muestra automatizados para medidas por *single cell*-ICP-MS, como por ejemplo el sistema micro-FAST de la casa comercial de ESI, cuya reducción de los tiempos de *dwell time*

(<100  $\mu$ s), así como el uso de software de tratamiento de datos, permitiría mejorar los análisis llevados a cabo en el Capítulo IV. La mejora de las eficiencias de transporte de las células al ICP-MS ( $\sim 80\%$ ) facilitaría obtener resultados más fiables y representativos de la población celular. Además, si se incorpora el uso de la espectrometría de masas de análisis casi simultáneo (TOF), así como el empleo de MNCs sintetizados con diferentes metales, sería posible la cuantificación múltiple de proteínas célula a célula en poblaciones celulares de  $\sim 1 \cdot 10^5$  células en apenas unos minutos.

The results obtained in the current PhD Thesis open the way for possible future work that would allow us to continue with the line of research carried out in recent years. The following is a summary of some of the ideas put forward:

- Application of MNCs to multiple and simultaneous tagging strategies. The use of MNCs synthesised with different metals (e.g. AuNCs, AgNCs, PtNCs, IrNCs, PdNCs) would generate up to 5 different metal immunoprobes when bioconjugated to specific antibodies. Additionally, up to 16 tags could be synthesised taking into account the stable isotopes of these metals. This strategy would expand the use of MNCs and allow multiple protein analysis using quasi-simultaneous mass spectrometry such as time-of-flight.

- Evaluation of the quantification strategy developed in Chapter III based on the production of single-cell standards with the same cell line as the sample for the quantification of other proteins by LA-ICP-MS, with other MNCs and in other cell lines. This would require first studying the viability of each cell line during the internalisation of MNCs studies and then evaluating and validating the quantification strategy for other biomolecules. In addition, it would be interesting to study the possibility of generating multiple single-cell patterns (internalisation of increasing concentrations of different MNCs simultaneously). This would also allow the strategy to be extended to multiple protein quantification by LA-ICP-MS using real matrix-matched calibration standards.

- Improve the resolution in cell bioimaging by LA-ICP-MS should be carried out. With the incorporation of the DCI system, which allows the reduction in ablation cell evacuation times from 600 ms to 80-100 ms, the resolution of the bioimaging is notably improved, making it possible to obtain protein distributions with high subcellular resolution, both qualitative and quantitative.

- Incorporation of automated sample introduction systems for single cell-ICP-MS measurements, such as the microFAST system from ESI, whose reduced dwell times ( $<100 \mu\text{s}$ ), as well as the use of data processing software, would improve the analyses carried out in Chapter IV. Improved transport efficiencies of the cells to the ICP-MS ( $\sim 80\%$ ) would provide more reliable and

## ***SUGGESTIONS FOR FURTHER RESEARCH***

---

representative results of the cell population. In addition, by incorporating the use of quasisimultaneous analysis mass spectrometry (TOF), as well as the use of MNCs synthesised with different metals, multiple cell-to-cell quantification of proteins in cell populations of  $\sim 1-10^5$  cells would be possible in just a few minutes.

---

# J. ANEXO 1

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

---



Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas, todas ellas en revistas internacionales indexadas en el JCR (Journal Citation Report):

1. **A. Lores-Padín**, M. Cruz-Alonso, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay, *Microchimica Acta* 186, (2019), 705. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3868-9>
2. **A. Lores-Padín**, B. Fernández, L. Álvarez, H. González-Iglesias, I. Lengyel, R. Pereiro, Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation-Inductively coupled plasma-Mass spectrometry using metal nanoclusters as labels. *Talanta*, 221, (2021), 121489. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>
3. **A. Lores-Padín**, E. Mavrakís, B. Fernández, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, S.A. Pergantis, Gold nanoclusters as elemental label for the sequential quantification of apolipoprotein E and metallothionein 2A in individual human cells of the retinal pigment epithelium using single cell-ICP-MS. *Analytica Chimica Acta*, 1203, (2022), 339701. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339701>
4. **A. Lores-Padín**, B. Fernández, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Real matrix-matched standards for quantitative bioimaging of cytosolic proteins in individual cells using metal nanoclusters as immunoprobes-label: a case study using laser ablation ICP-MS detection. *Analytica Chimica Acta* 1221, (2022), 340128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340128>.

Otras Publicaciones derivadas (Proceedings):

5. **A. Lores-Padín**, P. Menero-Valdés, A. Rodríguez-Penedo, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Synthesis of size monodisperse water-

soluble metal nanoclusters for protein quantification by elemental mass spectrometry, *Mater. Proc.* 4, 2021, 43. <https://doi.org/10.3390/IOCN2020-07812>

Artículos de revisión derivados:

6. M. Cruz-Alonso, **A. Lores-Padín**, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation–ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, (2019), 549–558. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1411-1>
7. **A. Lores-Padín**, P. Menero-Valdés, B. Fernández, R. Pereiro, Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the analysis of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry-A Review. *Analytica Chimica Acta.* 1128, (2020), 251-268. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.008>

Capítulos de libro derivados:

8. **A. Lores-Padín**, B. Fernández, R. Pereiro, “Chapter 6: Laser Ablation ICP-MS: new instrumental developments, applications and trends”. Book: *Recent Advances in Analytical Techniques*. F.R.S. Atta-ur-Rahman, and Sibel A. Ozkan (Eds.). Bentham Science Publishers (2020) Vol. 4, 1-26. ISBN (Print): 978-981-14-0510-5 & ISBN (Online): 978-981-14-0511-2.
9. **A. Lores-Padín**, B. Fernández, R. Pereiro, “Chapter 6: General purification methods of metal nanoclusters”. Book: *Luminescent Metal Nanocluster-Synthesis, Characterization and Applications*. S. Thomas, J. Kuruvilla, S. Appukuttan, M. Mathew (Eds.). Elsevier (2022) – Paperback ISBN: 9780323886574. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88657-4.00021-1>

Artículos científicos en colaboración:

10. P. Menero-Valdés, **A. Lores-Padín**, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Iridium Nanoclusters as High Sensitive-Tunable Elemental Labels for Immunoassays: Determination of IgE and APOE in Aqueous Humor by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Talanta*, (2022), 123424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123424>
11. A. Rodríguez-Penedo, P. Rioboó-Legaspi, A. González-López, **A. Lores-Padín**, R. Pereiro, M. García-Suárez, M.D. Cima-Cabal, E. Costa-Rama, B. Fernández, M.T. Fernández-Abedul, Electrocatalytic palladium nanoclusters as versatile indicators in bioassays: rapid electroanalytical detection of SARS-CoV-2 by Reverse Transcriptase-Loop-mediated Amplification. *Advanced Healthcare Materials*, (2022), *Enviado a publicar*.





# Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay

Ana Lores-Padín<sup>1</sup> · María Cruz-Alonso<sup>1</sup> · Héctor González-Iglesias<sup>2,3</sup> · Beatriz Fernández<sup>1,2</sup>  · Rosario Pereiro<sup>1,2</sup>

Received: 21 May 2019 / Accepted: 20 September 2019 / Published online: 19 October 2019  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

## Abstract

The authors describe the use of platinum nanoclusters (PtNCs) as bimodal labels in a competitive immunoassay for immunoglobulin E (IgE). Both fluorometry and inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS) are used. Optimization of the PtNCs synthesis using lipoic acid as ligand was carried out. The time for synthesis and the effect of NaOH added to the PtNCs precursor mixture was optimized with the aim to obtain PtNCs with strong red fluorescence and low size dispersity. Maximal fluorescence was obtained at excitation/emission wavelengths of 455/620 nm. The average diameter (1.5 nm) and crystal structure (face-centered cubic structure) of the PtNCs were determined by HR-TEM. It was calculated that each PtNC contains 116 Pt atoms at average. Labelling of the antibody (Ab) against IgE with PtNCs was optimized in terms of recognition capabilities and fluorescence intensity. A molar ratio (Ab:PtNCs) of 1:11 is found to be best. A competitive immunoassay for IgE was developed and detection was carried out by using both ICP-MS (by measuring <sup>195</sup>Pt) and fluorometry. The limit of detection (LOD) of the fluoroimmunoassay is 0.6 ng mL<sup>-1</sup> of IgE. The LOD of the ICP-MS method is as low as 0.08 ng mL<sup>-1</sup>. The method was evaluated by analyzing four (spiked) serum samples by ICP-MS. No sample pretreatment excepting dilution is needed. Results compared favorably with those obtained by a commercial ELISA kit.

**Keywords** Fluoroimmunoassay · Lipoic acid · One-pot synthesis · Carbodiimide crosslinking · Immunoprobe · Elemental mass spectrometry

## Introduction

Elemental labels have shown a high potential for sensitive detection of biomolecules by inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS) [1–3]. Within this context, single chelates [4], commercial polymers containing several lanthanide atoms covalently attached [5], metal nanoparticles (NPs) most commonly made of gold [6, 7] with diameters in the order of 20–50 nm, and quantum dots (QDs) [8, 9] have been successfully investigated as elemental labels. The use of labels with many atoms of a given metal per tag will allow high signal amplification, and thus, good sensitivity for detection of the corresponding biomolecule. Pure metal nanostructures, such as AuNPs, contain a core with atoms of just one metal. Thus they possess a higher number of detectable atoms per label unit volume [10] as compared to QDs (such as CdSe QDs) or to polymers containing lanthanides. Consequently, it is expected that pure metal nanostructures will provide greater signal amplification when comparing similar label sizes.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3868-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Héctor González-Iglesias  
h.gonzalez@fio.as

✉ Beatriz Fernández  
fernandezbeatriz@uniovi.es

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Instituto Universitario Fernández-Vega (Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo), Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain

On the other hand, water soluble fluorescent metal nanoclusters (NCs) with sizes below 3 nm have shown a burgeoning interest for biomedical and biosensing applications [11, 12]. The small volume of these NCs makes of interest their use for labelling of biomolecules such as antibodies (Ab), since they will have a lower risk of hindering the Ab recognition capabilities. Gold is, by far, the most common metal employed for the synthesis of fluorescent NCs [13]. Silver NCs [14, 15] and copper NCs [16] are also frequently investigated. Nowadays, the synthesis of fluorescent NCs of other metals is pursued, such as iridium [17] and molybdenum [18].

Special efforts are being addressed towards the synthesis of platinum NCs (PtNCs). PtNCs show lower toxicity than QDs [19] and templates such as proteins, DNA, polymers and dendrimers have been investigated for the synthesis of water soluble PtNCs [20–24]. However, major drawbacks of big scaffolds are the difficulties both to remove the remaining free templates from the NCs in solution and to isolate the NCs from the big scaffold. In addition, when using polymers and dendrimers as templates it has been observed that reaction blanks often emit a noticeable fluorescence. In contrast, the synthesis of PtNCs using small thiolated ligands as stabilizing agents is an attractive alternative to easily isolate and purify fluorescent PtNCs [25, 26]. Previous work in our laboratory has shown that the synthesis of fluorescent PtNCs using lipoic acid is feasible [26]; however, emission was low and studies about polydispersity were not undertaken.

Sensitive dual detection can be carried out with immunoprobes labelled with fluorescent NCs for biomolecules determination by fluorescence and elemental MS. Each of the detection methods will offer advantages and limitations. Therefore it is convenient to compare the analytical performance of both. Some works have been published about the bimodal detection concept using fluorescence and ICP-MS [8, 27–29]. Bustos et al. [8] reported a comparison of both detection modes with CdSe/ZnS QDs through the measurement of Cd in the case of ICP-MS. Other examples include the use of a nanoprobe composed of europium chelated by 1,10-bis(50-chlorosulfo-thiophene-20-yl)-4,4,5,5,6,6,7,7-octafluorodecane-1,3,8,10-tetraone [28], the synthesis of hybrid labels containing both a DTPA chelate (coordinated with either  $^{165}\text{Ho}$  or  $^{111}\text{In}$ ) and a Cy5 fluorescent dye [27], or by combining a fluorescent dye (Cy3) with upconversion NPs [29]. Those probes are composed either of just one metal atom or of atoms of different heteroatoms (e.g. CdSe), reducing the amplification capabilities by ICP-MS detection. Therefore, the described probes are not optimum when comparing expected signal amplification by ICP-MS and label size. Within this context, fluorescent NCs with small size and many atoms of a given metal are worth to be studied as labels for bimodal detection by fluorescence and ICP-MS.

In this work, the one pot synthesis of PtNCs with lipoic acid and sodium borohydride is optimized in terms of high

fluorescence, low size dispersity and PtNCs stability. As a proof of concept, the synthesized PtNCs were bioconjugated, via carbodiimide, to anti-human IgE Ab (anti-h IgE) and evaluated for the determination of IgE in human serum by fluorescence and ICP-MS. We have selected this protein because IgE levels typically present in human serum are very low. Therefore, an analytical methodology with low limits of detection is required for its correct determination. To corroborate the IgE content obtained with the methodology using PtNCs labels, a commercial ELISA kit was employed for the same samples.

## Experimental

### Reagents and materials

The synthesis of PtNCs was carried out using  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  (8% wt; Sigma-Aldrich, USA; <https://www.sigmaaldrich.com>), lipoic acid (>98% powder; Across Organics, Belgium; <http://www.acros.com>) and  $\text{NaBH}_4$  (98% powder, Sigma Aldrich). Labelling of the selected Ab with the PtNCs was carried out with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (98% powder; Across Organics) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (> 98% powder; Sigma-Aldrich). Amicon ultra centrifugal filter units (3 and 100 kDa pore size, Merck Millipore, Darmstadt, Germany; <http://www.merckmillipore.com>) were employed for purification.

ELISA microtitration plates (96 well; Thermo Fisher Scientific, Germany; <https://www.thermofisher.com>) were used to evaluate the recognition capabilities of the Ab labelled with PtNCs. A polyclonal anti-goat IgG labelled with horseradish peroxidase (whole molecule, produced in rabbit; Sigma-Aldrich) and a TMB substrate kit (Thermo Fisher Scientific) were employed in such studies.

The immunoassay for human-IgE determination was accomplished using an immunoprobe consisting of polyclonal anti-h IgE Ab ( $\epsilon$ -chain specific, produced in goat; Sigma Aldrich) labelled in our laboratory with the PtNCs. Native human IgE protein (Abcam, UK; <https://www.abcam.com>) was used as analytic standard. Bovine serum albumin (BSA) (99% powder, Merck, Germany) and phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich) solution with 0.05% of surfactant Tween 20 (Sigma-Aldrich) were employed in the immunoassay procedure. These immunoassays were carried out in two different mountings depending on the detection mode. Poly-L-lysine surface coated microscope slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA; <http://www.electronmicroscopysciences.com>) with an adhesive press-to-seal silicon isolator (Grace bio-labs, Oregon, USA; <https://gracebio.com>) were used for confocal microscopy in fluorescent detection, whereas the immunoassays were

performed in ELISA microtitration plates (96 well; Thermo Fisher Scientific) when ICP-MS detection was performed.

Commercial human serum (from human male AB plasma, USA origin, sterile-filtered, Sigma-Aldrich) was used to investigate the applicability of the immunoassay with PtNCs. In addition, three clinical serum samples without any signs of relevant pathologies were supplied by the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Spain). The study adheres to the tenets of the Declaration of Helsinki and full ethical approval was obtained for the Clinical Research Ethics Committee at the Asturias Central University Hospital (Spain). To validate the methodology, the IgE (human) ELISA Kit (Abnova, Taiwan; <http://www.abnova.com>) was used.

Other chemicals were aqua regia, prepared by mixing concentrated nitric acid (65%, Merck, Germany) and hydrochloric acid (37%, Fisher Scientific, USA) in a volume ratio of 1:3, used for PtNCs digestion prior to ICP-MS analysis, NaOH (97%, Merck) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific). Boric acid (99.5%, Sigma Aldrich) and KCl (99%, Sigma Aldrich) were employed to prepare the borate buffered saline (BBS). Deionized ultrapure water, resistivity 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup> (Purelab Flex 3&4, UK; <https://www.elgalabwater.com>), was used in all the experiments.

## Instrumentation

Fluorescence measurements in solution were performed with a spectrofluorimeter (LS-50-B, Perkin Elmer, USA; <https://www.perkinelmer.com>). Also, a spectrophotometer (Cary 60 UV-VIS, Agilent Technologies, USA; <https://www.agilent.com>) was employed for absorption measurements of the synthesis precursors and PtNCs suspensions. A Suprasil quartz cuvette model 101-Qs from Hellma® (Sigma-Aldrich) was required for such purpose. A high-resolution transmission electron microscope (HR-TEM) (JEOL JEM-2100, Tokyo, Japan; <https://www.jeol.co.jp>) with an energy dispersive x-ray (EDX) spectrometer for microanalysis allowed morphological characterization of the PtNCs. Measurement of the Z-potential of PtNCs suspensions at different pHs was carried out with a Zetasizer Nano ZS (Malvern analytical Ltd., UK; <https://www.malvernpanalytical.com>).

A laser confocal microscope (DM IRE2; Leica, Germany, Germany; <https://www.leica-microsystems.com>) with a 63x oil immersion objective was employed for measurement of the immunoassays by fluorescence. Measurements with ICP-MS (Model 7500; Agilent Technologies) were taken for different purposes: to determine the platinum concentration in the PtNCs synthesis process, to confirm the platinum mass balance during the bioconjugation procedure, and to quantify the IgE protein in the competitive immunoassay measuring the platinum signal in each well of the ELISA plate.

An absorbance microplate reader (ELx800; Bio-Tek, USA; <https://www.biotek.com>), an ultrasonic bath (J.P. Selecta,

Spain; <http://grupo-selecta.com>), a centrifuge (Gyrozen and Co., Rep of Korea; <https://www.gyrozen.com/index.php>), a magnetic stirring plate (Fisher Scientific), a vortex mixer (Labbox Labware, Spain; <https://esp.labbox.com/>) and a stove (Mettler, Spain, <https://www.mettler.com>) were other equipments used.

Fluorescence data processing was carried out using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, USA; <https://www.nih.gov>) and immunoassay curves representation was done with the online data analysis tool MyAssays Ltd.

## Synthesis of PtNCs and labelling of anti-h IgE

50 μmol (10.5 mg) of ligand (lipoic acid) was dissolved in 10 mL of deionized water in which 30 μL of freshly 2 M NaOH was previously added. The mixture was then homogenized with an ultrasonic bath until the ligand was completely dissolved. Then, 200 μL of 50 mM H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> (1:5 M final ratio of Pt:ligand) was added under stirring and 5 min later 400 μL of a 25 mM NaBH<sub>4</sub> solution was added dropwise (employing a syringe). After 15 h at room temperature under stirring, the excess of reagents were removed by ultrafiltration (3 kDa pore size Amicon): a first cycle at 1100 g for 10 min and then three washing steps with deionized H<sub>2</sub>O at 1600 g for 10 min were carried out for such purpose. Once the volume was reduced, a small volume of yellow colored solution containing the PtNCs remained on the filter. Then, initial volume was restored. The purified solution was stored in the fridge.

100 μL of anti-h IgE Ab (100 μg mL<sup>-1</sup>) was added in an Eppendorf tube followed by an excess of the PtNCs purified solution (198 μL, 1:20 M ratio of Ab:PtNCs). As soon as the PtNCs solution was poured, vortex stirring was started. Then, 10 μL of a solution containing EDC and NHS were added with a molar ratio Ab:EDC:NHS of 1:1500:1500. After 2 h at room temperature with constant stirring, purification was performed by ultrafiltration (100 kDa pore size Amicon) with a first cycle at 1600 g for 10 min and three washing steps with deionized H<sub>2</sub>O at 1600 g for 10 min. The purified solution was stored in the fridge.

## Optimization of the immunoprobe composition

The ratio between the PtNCs label and the anti-h IgE in the immunoprobe was optimized through a spectrophotometric immunoassay, using a secondary Ab labelled with horseradish peroxidase. For such purpose, IgE was immobilized (100 μL/well of 5 μg mL<sup>-1</sup> IgE) in an ELISA plate and incubated for 6 h at 37 °C. Then, the excess protein solution was removed and 200 μL/well of 1% BSA solution in 10 mM PBS (pH 7.4) was added to block the empty places in the well. The plate was incubated for 2 h at room temperature. Next, 100 μL/well of the anti-h IgE (1 μg mL<sup>-1</sup>) was added and kept for 2 h at 37 °C. In this step, the Ab labelled with different molar ratios

of PtNCs was employed for optimization purposes. After washing with 0.05% PBS-Tween 20, 100  $\mu\text{L}$ /well of the anti-goat IgG peroxidase-labelled Ab (diluted 1:20000 in a buffer containing 1% PBS-BSA and 0.05% Tween 20) was added and incubated as above. Finally, the plate was washed and treated with 100  $\mu\text{L}$ /well of the TMB kit. The enzymatic reaction was stopped with 2 M sulfuric acid (100  $\mu\text{L}$ /well) and detected in an absorbance plate reader ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ).

### Immunoassay with fluorescent detection using PtNCs as label

100  $\mu\text{L}$ /well of IgE protein (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) containing EDC (1500:1 M ratio of EDC:IgE) were added to wells on a poly-L-lysine coated microscope slide (EDC allowed to improve immobilization on the slides) and incubated during 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Next, the IgE still in solution was removed and 200  $\mu\text{L}$ /well of 1% BSA in 10 mM PBS (pH 7.4) was added to each well. The microscope slide was then incubated for 2 h at room temperature. Then, all wells were washed three times with 10 mM PBS (pH 7.4) and 0.05% Tween 20 (200  $\mu\text{L}$ /well).

Concurrently, incubation of the immunoprobe containing PtNCs as label (100  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , expressed as Ab concentration) with 100  $\mu\text{L}$  of the IgE standards or serum samples in an Eppendorf tube was carried out. To carry out the competitive reaction, this mixture was added to the previously treated wells (as described in the above paragraph) and incubated for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After the washing steps (three times) with PBS-Tween 20, the fluorescence was measured.

### Immunoassay with ICP-MS detection using PtNCs as label

Despite the immunoassay steps were the same as those described in the above section, the mounting was changed because of the final step of the required protocol. An ELISA microwell plate was used for this purpose using ICP-MS detection. Once the last washing step was performed, 50  $\mu\text{L}$ /well of a solution of 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  was added in order to extract the PtNCs into the solution. After 10 min, the acid solutions were extracted from the wells to carry out the PtNCs digestion. 200  $\mu\text{L}$  of aqua regia ( $\text{HNO}_3\text{:}3\text{HCl}$ )/tube were added to oxidize and dissolve platinum and then the tubes were introduced 20 min in an ultrasonic bath. Finally, a 1:200 dilution (5 mL final volume) of the samples was required to minimize the percentage of acid introduced into the ICP-MS (<3% v/v). ICP-MS measurements to determine the platinum concentration of PtNCs solutions were carried out by external calibration with pure platinum standards (concentrations from 0.05  $\text{ng g}^{-1}$  to 20  $\text{ng g}^{-1}$ ) using iridium as internal standard (isotopes  $^{195}\text{Pt}$  and  $^{193}\text{Ir}$  were measured, respectively).

### Human serum analysis

The applicability of the immunoassays with PtNCs was evaluated for the analysis of a commercial human serum and three clinical human serum samples (denoted as Serum 1, Serum 2 and Serum 3) using the same immunoassay procedure as for the IgE standards. Dilution of the sera was required to fit the concentrations of the samples into the linear range of the calibration plots. A 1:1000 dilution with PBS (pH 7.4) was carried out in the case of the commercial serum and the ‘‘Serum 1’’ clinical sample, whereas a 1:500 dilution was used for the rest of the sera.

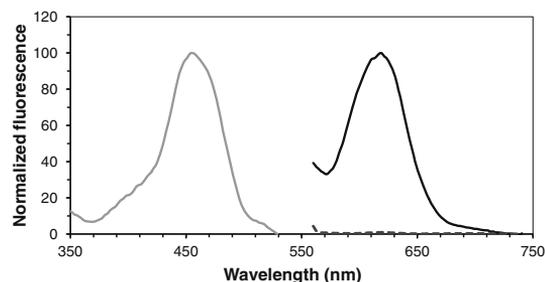
The methodology with PtNCs as label was validated using a commercial ELISA kit.

## Results and discussion

Synthesis of fluorescent PtNCs, their bioconjugation to a specific Ab and their subsequent application as label for detection of IgE is described. PtNCs have been chosen because they are fluorescent and also high amplification can be expected by ICP-MS detection (each label is composed of a cluster of platinum atoms). Therefore, they can be used for dual detection.  $\text{NaBH}_4$  (as reducing agent) and lipoic acid (as small thiolated stabilizing agent) were used for the synthesis of PtNCs.

### Synthesis of PtNCs using lipoic acid as ligand

PtNCs synthesized following the procedure described in the *Experimental section* showed fluorescent emission with a maximum at 620 nm (see Fig. 1). The formation of the PtNCs was confirmed through absorbance measurements: as can be seen in Fig. S1 (*Electronic Supplementary Material*),



**Fig. 1** PtNCs fluorescence characterization. Excitation (gray line) and emission (black line) spectra of PtNCs in ultrapure water ( $\lambda_{\text{exc}} = 455 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ ). The dotted black line corresponds to the emission spectrum of the synthesis blank. The plot depicts normalized intensities, given 100 value to the maximum fluorescence signal observed at 620 nm

the PtNCs suspension does not have the characteristic absorbance band of superficial plasmon resonance typical of bigger NPs. The blank of the synthesis was prepared under exactly the same steps than the PtNCs synthesis, excepting that the platinum salt was not added. As it is collected in Fig. 1, the emission signal for the reaction blank was negligible.

Lower  $\text{NaBH}_4$  ratios decrease the reaction kinetics, giving rise to metal NCs of higher quality [14]. Therefore, in order to obtain PtNCs with higher fluorescence and less dispersity than those previously reported [26], the selected  $\text{NaBH}_4$  molar ratio was lower than in the previous work (Pt:lipoic acid: $\text{NaBH}_4$  of 1:5:1 versus the 1:5:25 previously used). In addition, two experimental variables were evaluated in the optimization of the PtNCs synthesis procedure: the synthesis duration and the effect of 2 M NaOH volume added to the PtNCs precursor mixture. Regarding the synthesis time, maximum signals were achieved after 13 h of synthesis at room temperature (Fig. S2 in *Electronic Supplementary Material*). This time period is longer than the 6 h previously recommended by Fernández et al. [26] and it can be justified in terms of the slower PtNCs synthesis kinetics due to the lower  $\text{NaBH}_4$  molar ratio employed.

Regarding the effect of 2 M NaOH volume, Fig. 2 shows a comparison of fluorescence spectra for the purified PtNCs suspension obtained under synthesis with three different volumes of 2 M NaOH. Fluorescence signals were higher when using 30  $\mu\text{L}$  as compared to 20  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH. Furthermore, the concentration of platinum was measured by ICP-MS both in the filtered solutions collected during the purification process (i.e. the unreacted free platinum) and in the reconstituted suspensions (containing the PtNCs retained in the ultracentrifugation filter). The PtNCs synthesis yield was 60% when using 20  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH, while the PtNCs

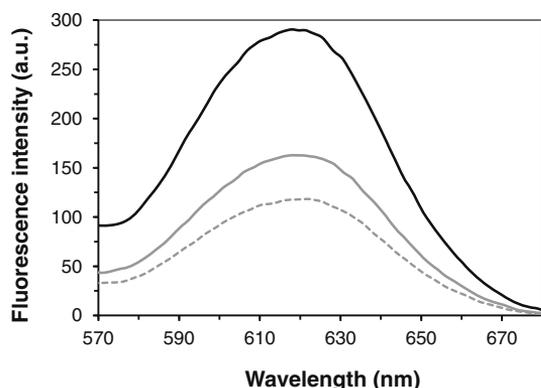
synthesis yield was found to be 84% for the addition of 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH to the reaction mixture. Here it should be noted that, as it is depicted in Fig. 2, the increase of fluorescence is higher than the 24% synthesis yield difference, thus indicating that PtNCs of higher quality are synthesized with 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH.

HR-TEM allowed to measure diameters of the synthesized PtNCs (Fig. 3a shows, as example, the PtNCs synthesized with 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH). Average diameters were determined from individual PtNCs randomly observed in the HR-TEM photographs. A smaller size and lower dispersity ( $1.49 \pm 0.025$  nm for  $n = 1800$ , 99% confidence interval, with the standard normal distribution) was found for the synthesis using 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH as compared to 20  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH ( $1.73 \pm 0.044$  nm for  $n = 1800$ , 99% confidence interval, with the standard normal distribution). In addition, EDX measurements confirmed that platinum and sulphur were major elements of the synthesized PtNCs (the presence of sulphur is attributed to the lipoic acid used in the synthesis).

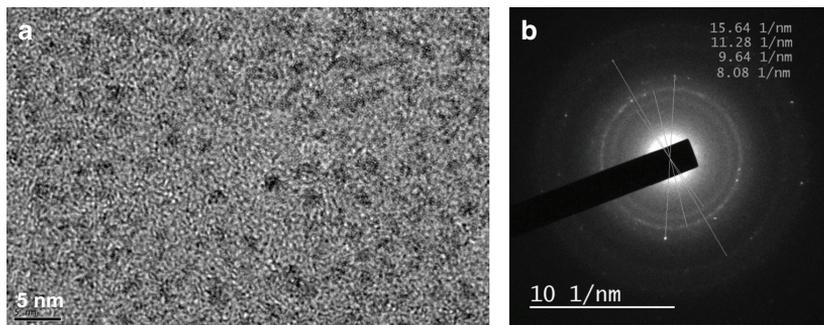
Concerning the NaOH volume employed in the synthesis, Fig. 2 also collects the fluorescence of the purified PtNCs synthesized with 50  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH. Fluorescence signals were lower than in the case of 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH and the PtNCs synthesis yield measured by ICP-MS was 73%. Considering that both fluorescence and synthesis yield were lower than for the synthesis with 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH, no further studies under these experimental conditions were carried out.

From the above experiments, the addition of 30  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH to the synthesis precursor mixture was selected. The PtNCs have a crystalline structure, face-centered cubic structure of platinum atoms, as observed by the selected area electron diffraction pattern (Fig. 3b). The knowledge of the crystal structure allowed to calculate the volume occupied by a unit cell ( $6.04 \cdot 10^{-2}$  nm<sup>3</sup>/cell), by considering the mass of a unit cell ( $1.30 \cdot 10^{-21}$  g/cell) and the platinum density ( $21.45$  g cm<sup>-3</sup>). Additionally, dividing the average PtNC volume (diameter measured by HR-TEM and assuming spherical shape) by the unit cell volume it was calculated 29 crystal lattices *per* NC. As a face-centered cubic structure contains four platinum net atoms per unit cell, it can be determined that each PtNC is composed by 116 atoms of platinum on average. This figure is used to transform the platinum molar concentration determined by ICP-MS in the PtNCs purified suspension into PtNCs molar concentration. A value of  $6.75 \cdot 10^{-6}$  mol PtNCs L<sup>-1</sup> was experimentally obtained. In addition, the number of platinum atoms per NC is of interest to calculate the amplification expected in experiments with antibodies labelled with PtNCs and ICP-MS detection.

The effect of the pH was evaluated with the synthesized PtNCs. As can be observed in Fig. S3a (*Electronic Supplementary Material*), the fluorescence signal at 620 nm of the PtNCs suspension increased when lowering the pH



**Fig. 2** Effect of 2 M NaOH volume added to the synthesis mixture of precursors on PtNCs fluorescence. Continuous black color: 30  $\mu\text{L}$  NaOH, continuous gray color: 50  $\mu\text{L}$  NaOH, dotted gray color: 20  $\mu\text{L}$  NaOH. For comparison purposes the fluorescence was measured at the same pH for the three syntheses



**Fig. 3** Structural characterization of PtNCs. (a) HR-TEM image of the PtNCs synthesized under the optimum experimental conditions, and (b) Selected area electron diffraction pattern of a PtNC determined by HR-TEM where the four inner electron diffraction rings from the NC are

distinguished. The rings diameter in  $\text{nm}^{-1}$  units are collected at the top right of the image. The radius of the rings diffraction ( $d_{\text{spacing}}$ ) confirms the crystal structure of the PtNCs to be compared with the Pt metal  $d_{\text{spacing}}$  collected in bibliography

from 12.4 up to 3.5. In addition, Z-potential measurements (Fig. S3b in the *Electronic Supplementary Material*) confirmed that PtNCs were stable at pHs higher than 3.5. Finally, stability experiments of PtNCs under different storage conditions and in different media were evaluated. Fig. S4a (*Electronic Supplementary Material*) shows high stability of the fluorescence signal (up to 3 months, which was the maximum period investigated) in ultrapure water and BBS medium. In the case of PBS, sensitivity starts to decrease after 1 day of storage. Fig. S4b (*Electronic Supplementary Material*) collects the time-drive of the PtNCs in ultrapure water during 2 h in the sample compartment of the fluorimeter ( $\lambda_{\text{exc}} = 455 \text{ nm}$ ). No significant changes were observed in the fluorescence emission.

### Selection of anti-h IgE:PtNC molar ratio in the bioconjugate

Different Ab:PtNC molar ratios (1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 and 1:50) were assayed in the bioconjugation solution to label the anti-h IgE. To check if the Ab kept its functionality after being labelled with PtNCs, a study was made for the different ratios through a spectrophotometric immunoassay. For such purpose, IgE was immobilized in an ELISA plate and a secondary Ab labelled with horseradish peroxidase was employed for detection. Figure 4a depicts the absorbance at the different Ab:PtNCs molar ratios investigated. The recognition capabilities remained constant for 1:1, 1:10, 1:15 and 1:20 Ab:PtNC molar ratios (these values correspond to ratios added in the solution to label the Ab). However, the 1:30 ratio showed slight lower absorbance and the recognition capabilities were drastically lost for the Ab:PtNC molar ratio of 1:50. Therefore, in order to avoid the blocking of the recognition capabilities of the anti-h IgE due to the labelling process, Ab:PtNC molar ratios up to 1:20 were considered in the solutions to label the Ab.

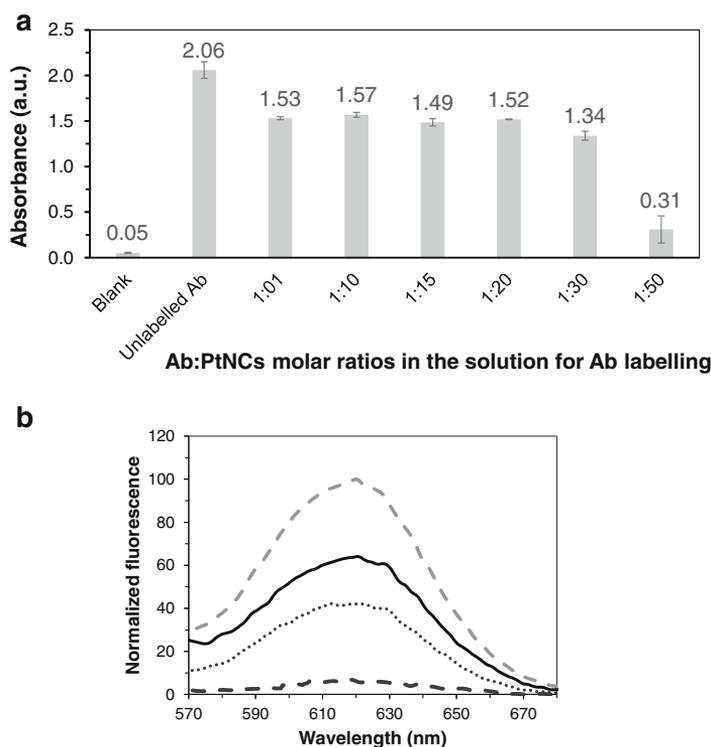
Once the labelling of the Ab with PtNCs was achieved, the real number of PtNCs per Ab was calculated by measuring the platinum concentration (by ICP-MS) in labelled-Ab solutions containing a known amount of Ab. As it is collected in Table 1, labelling yields decreased with higher PtNCs ratios. For the 1:1 initial molar ratio in the labelling solution, not all Ab was labelled (77.6% labelling yield, thus corresponding to a real 1:0.77 Ab:PtNC molar ratio), while for the 1:20 initial ratio the labelling yield decreased up to 55.7%, corresponding to a real 1:11.13 Ab:PtNC molar ratio. Figure 4b collects a comparison of the emission spectra of the bioconjugate containing 1:0.77 (1:1), 1:8.69 (1:15) and 1:11.13 (1:20) Ab:PtNC molar ratio and a PtNCs solution with the same dilution factor. It should be also highlighted that a linear regression was observed when plotting the different real bioconjugate molar ratios (up to 1:11.13 Ab:PtNC) versus measured signals, both for fluorescence at 620 nm and for platinum concentration determined by ICP-MS (data not shown).

Finally, platinum retained in the ELISA well plates (same experiment with data presented in Fig. 4a) was measured by ICP-MS. It is worth to highlight that a linear relationship was obtained by plotting the detected platinum mass (in ng) versus the real Ab:PtNCs molar ratio (Fig. S5 in *Electronic Supplementary Material*).

### Immunoassays for IgE determination with fluorescence and ICP-MS detection

The determination of IgE using the immunoprobe containing PtNCs as label (with a Ab:PtNCs real molar ratio of 1:11.13) was carried out with a competitive immunoassay. Figure 5a shows the inhibition curve by fluorescence detection following the optimized protocol detailed in the *Experimental section* (i.e. immunoassay with fluorescent detection using PtNCs as label) for IgE standards. The calibration plot was fitted with a four-parameter equation with MyAssays Ltd. and different inhibitory concentration (IC) values were extracted

**Fig. 4** PtNCs bioconjugation optimization. (a) Absorbance measured in ELISA well plates for different Ab:PtNC molar ratios employed in the reaction solution for Ab labelling. Uncertainties represent the standard deviations of the mean of three independent measurements, and (b) Comparison of emission spectra for PtNCs (dotted gray line) and Ab labelled with PtNCs using different Ab:PtNC molar ratios, 1:20 (black line), 1:15 (tinny dotted line) and 1:1 (dotted black line), in the bioconjugation process (same pH and same PtNCs dilution in the spectra)



from the graph. The limit of detection (LOD), corresponding to  $IC_{10}$ , was  $0.6 \text{ ng mL}^{-1}$  of IgE, while the linear range ( $IC_{20}$ – $IC_{80}$ ) extended from  $1.6 \text{ ng mL}^{-1}$  up to  $60 \text{ ng mL}^{-1}$  of IgE. It is interesting to note that this LOD is slightly worse than the LOD previously reported using AuNCs as fluorescent labels ( $0.2 \text{ ng mL}^{-1}$  of IgE) [30].

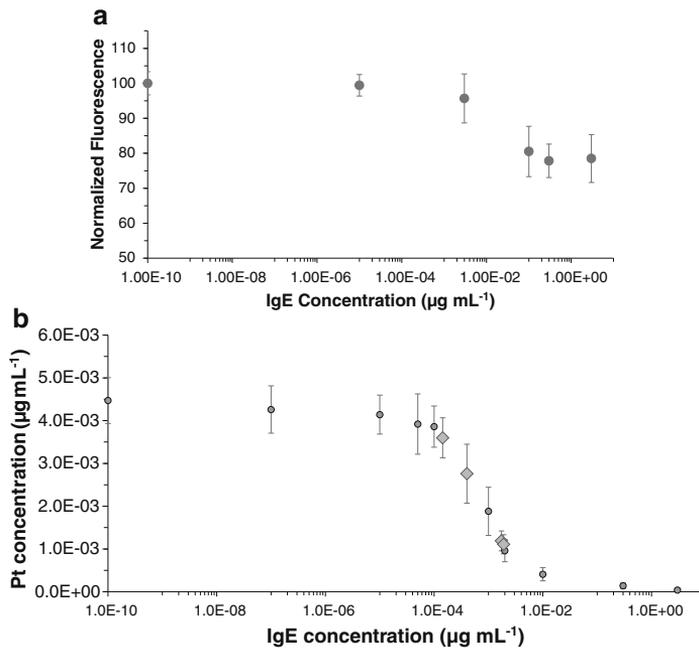
The inhibition curve by ICP-MS detection is collected in Fig. 5b. The calibration plot was fitted, as above, using a four-parameter equation. The LOD ( $IC_{10}$ ) in this case is  $0.08 \text{ ng mL}^{-1}$  of IgE, which is lower than by fluorescent measurements with the same PtNCs immunoprobe. Such LOD is lower than the LOD of  $0.2 \text{ ng mL}^{-1}$  for IgE with fluorescent detection using an immunoprobe labelled with AuNCs [30]. Also, it compares favorably with most recently published methods for IgE determination in human serum (see Table 2) [30–38]. With ICP-MS detection of platinum, the linear range ( $IC_{20}$ – $IC_{80}$ ) extended from  $0.10 \text{ ng mL}^{-1}$  up to  $2.6 \text{ ng mL}^{-1}$  of IgE. In addition, it is interesting to note that for

this linear interval we have observed that the plot of IgE molarity (x axis) used for calibration versus the detected platinum molarity (y axis) follows a linear trend, with a slope of 1264 units. This slope is in agreement with the signal amplification expected (the immunoprobe contains an average of 11.13 PtNCs per Ab and each NC is composed of 116 atoms of Pt on average).

Finally, considering the excellent LOD with ICP-MS, the immunoprobe labelled with PtNCs was investigated for the determination of IgE in human serum samples by ICP-MS. To evaluate the effect of the serum matrix, concentrations of  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1.5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1.5 \cdot 10^{-3}$  and  $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  of IgE were added to a commercial serum diluted 1:1000 and results were introduced (grey marks) into the inhibition curve (Fig. 5b). As can be observed, the spiked samples fit into the calibration plots, demonstrating that there are no matrix effects and it is possible to quantify IgE in diluted serum samples through calibration with PBS. Next, determination of IgE in four

**Table 1** Labelling yield of the Ab in the bioconjugation process determined by ICP-MS

Ab:PtNC molar ratio in the solution for Ab labelling	1:1	1:10	1:15	1:20
Labelling yield, % (ICP-MS measurements)	77.60%	62.41%	57.92%	55.67%
Measured (“real”) Ab:PtNC molar ratio in the labelled Ab	1:0.77	1:6.24	1:8.69	1:11.13



**Fig. 5** Calibration curves for IgE determination by competitive format, using the IgE immunoprobe containing the molar ratio 1:11.13 Ab:PtNCs. (a) Calibration plot by fluorescence detection with laser confocal microscopy ( $\lambda_{\text{exc}} = 470$  nm, range  $\lambda_{\text{em}} = 610\text{--}650$  nm). The y-axis corresponds to the normalized integrated density signal fluorescence from the PtNCs in each well (integrated by ImageJ program). Uncertainties represent the standard deviations of the mean of three independent measurements. (b) Calibration plot by ICP-MS ( $^{195}\text{Pt}$  ion signal intensity was

measured). The y-axis corresponds to the concentration of Pt, calculated by an external calibration curve with internal standard ( $^{193}\text{Ir}$ ). The black marks belong to the IgE protein standards in PBS solution for building the calibration curve and the circle marks correspond to the enriched sera (with different concentrations of IgE standard). Uncertainties represent the standard deviations of the mean of three independent measurements"

**Table 2** Overview of recently reported nanomaterial and/or based optical sensitive methods for determination of Ig E

	Materials used	Method	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Ref.
Commercial kits	–	Classical ELISA absorbance (ABNOVA).	12	–
	–	Microarray chip ImmunoCAP ISAC (Thermo Fisher)	0.24	–
Published methods	Superparamagnetic Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Magnetophoretic immunoassay	0.1	[31]
	Tosyl-activated superparamagnetic beads	Immunoaffinity capillary electrophoresis. Fluorescence detection	2.4	[32]
	Chemiluminescence reagent acts as the signaling molecule and polystyrene beads as the amplification platform	Aptamer-barcode enhanced chemiluminescence immunosensor	0.87	[33]
	Poly(dimethylsiloxane) microfluidic electrokinetic concentration chip	Aptamer affinity probe capillary electrophoresis. Fluorescence detection	7	[34]
	Bioconjugated AuNPs	Lateral flow microarrays	2.4	[35]
	CdS nanospheres and AuNPs	Electrochemiluminescence aptasensor	0.02	[36]
	Aptamer modified with AgNPs	Visual microarray	20	[37]
PtNCs	Polystyrene and super-paramagnetic particle complexes	Microparticle-based competitive immunoassay and visible light absorption	24	[38]
	AuNCs	Competitive fluoroimmunoassay	0.20	[30]
	PtNCs	Competitive immunoassay (fluorescence and ICP-MS)	0.60 (fluorescence) & 0.08 (ICP-MS)	This work

human serum samples was carried out with the immunoprobe labelled with PtNCs and results are collected in Table S1 (*Electronic Supplementary Material*). The applicability was proved through the successful comparison of the IgE concentrations with this methodology and those with a commercial kit (results are also collected in Table S1).

## Conclusions

Fluorescent PtNCs were synthesized and studied in terms of yield, size dispersity, platinum atoms per NC and PtNCs concentration. These PtNCs were used to label an anti-h IgE antibody as a proof of concept. Results showed that the immunoprobe selected as optimum contains an average of 11.13 PtNCs per Ab, which corresponds to about 1300 Pt atoms per Ab. Further studies to improve the size dispersity will be appropriate in order to use them in applications such as single-cell proteins detection.

The bimodal detection capabilities (fluorescence and ICP-MS) of PtNCs were investigated and compared through a competitive immunoassay for sensitive detection of IgE. The huge amplification with ICP-MS detection gave rise to a better LOD as compared to the fluoroimmunoassay. In any case, it should be kept in mind that fluorescence measurements are cheaper than those performed by ICP-MS. Therefore, the fluoroimmunoassay can be selected when sensitivity requirements allow it. In contrast, the low LOD by ICP-MS points out to the use of this detection system for those analyses requiring high sensitivity or for small sample volumes. In addition, it should be noted that in our experiments we have detected  $^{195}\text{Pt}$  which has a 33.775% isotopic abundance. Therefore, the LOD by ICP-MS should be improved with isotopically-enriched PtNCs.

Finally, it is worth to highlight that the combination of the PtNCs immunoprobe with ICP-MS detection opens the door to multiplexed protein analysis by using isotopically-enriched NCs. In the particular case of platinum, it is possible to obtain six different immunoprobes ( $^{190}\text{Pt}$ ,  $^{192}\text{Pt}$ ,  $^{194}\text{Pt}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{196}\text{Pt}$ , and  $^{198}\text{Pt}$ ) with the same synthesis protocol, thus increasing both the multiplexing capabilities and the sensitivity of the analysis. In addition, future research related to bioimaging studies by laser ablation coupled to ICP-MS using PtNCs labels should be expected.

**Acknowledgements** This work was financially supported through project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. A. Lores-Padín and B. Fernández respectively acknowledge the FPU Grant (Ref. MECD-17-FPU16/01363; Ministry of Education) and the contract RYC-2014-14985 through the “Ramón y Cajal Program” (Ministry of Economy and Competitiveness).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** There are no conflicts to declare.

## References

1. Baranov VI, Quinn Z, Bandura DR, Tanner SD (2002) A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. *Anal Chem* 74:1629–1636
2. Liu Z, Li X, Xiao G, Chen B, He M, Hu B (2017) Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: a review. *Trends Anal Chem* 93:78–101
3. Zhang C, Wu F, Zhang Y, Wang X, Zhang X (2001) A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum. *J Anal At Spectrom* 1:1393–1396
4. Mairinger T, Wozniak-Knopp G, Rümer F, Koellensperger G, Hann S (2016) Element labeling of antibody fragments for ICP-MS based immunoassays. *J Anal At Spectrom* 31:2330–2337
5. Perez E, Bierla K, Grindlay G, Szpunar J, Mora J, Lobinski R (2018) 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* 1018:7–15
6. He Y, Chen D, Li M, Fang L, Yang W, Xu L, Fu F (2014) Rolling circle amplification combined with gold nanoparticles-tag for ultra-sensitive and specific quantification of DNA by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosens Bioelectron* 58:209–213
7. Xiao G, Chen B, He M, Shi K, Zhang X, Li X, Wu Q, Pang D, Hu B (2017) Determination of avian influenza A (H9N2) virions by inductively coupled plasma mass spectrometry based magnetic immunoassay with gold nanoparticles labeling. *Spectrochim Acta Part B* 138:90–96
8. Bustos ARM, Trapiella-Alfonso L, Encinar JR, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2012) Elemental and molecular detection for quantum dots based immunoassays: a critical appraisal. *Biosens Bioelectron* 33:165–171
9. García-Cortes M, Encinar JR, Costa-Fernández JM, Sanz-Medel A (2016) Highly sensitive nanoparticle – based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification. *Biosens Bioelectron* 85:128–134
10. Tvrdonova M, Vlcnovska M, Pompeiano L, Viktor V, Vojtech K, Lena AA, Jakubowski N, Vaculovicova M, Vaculovic T (2019) Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 411:559–564
11. Song X-R, Goswami N, Yang H-H, Xie J (2016) Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications. *Analyst* 141: 3126–3140
12. Zhang L, Wang E (2014) Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* 9:132–157
13. Zhang Y, Zhang C, Xu C, Wang X, Liu C, Waterhouse GIN, Wang Y, Yin H (2019) Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: a mini-review. *Talanta* 200:432–442
14. Zheng K, Yuan X, Goswami N, Zhang Q, Xie J (2014) Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters. *RSC Adv* 4: 60581–60596
15. Valencia E, Cruz-Alonso M, Álvarez L, González-Iglesias H, Fernández B, Pereiro R (2019) Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim Acta* 186:429. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3554-y>
16. Hu X, Lui T, Zhuang Y, Wang W, Li Y, Fan W, Huang Y (2016) Recent advances in the analytical applications of copper nanoclusters. *Trends Anal Chem* 77:66–75

17. Cui M, Wang C, Yang D, Song Q (2018) Fluorescent iridium nanoclusters for selective determination of chromium(VI). *Microchim Acta* 185:8. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2553-0>
18. Sharma AK, Pandey S, Sharma N, Wu H-F (2019) Synthesis of fluorescent molybdenum nanoclusters at ambient temperature and their application in biological imaging. *Mater Sci Eng C* 99:1–11
19. Huang X, Ishitobi H, Inouye Y (2016) Formation of fluorescent platinum nanoclusters using hyper-branched polyethylenimine and their conjugation to antibodies for bio-imaging. *RSC Adv* 6: 9709–9716
20. Li J, Zhu J-J, Xu K (2014) Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications. *Trends Anal Chem* 58:90–98
21. Tanaka S, Miyazaki J, Tiwari DK, Jin T, Inouye Y (2011) Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angew Chem Int Ed* 50: 431–435
22. Xu N, Li H-W, Yue Y, Wu Y (2016) Synthesis of bovine serum albumin protected high fluorescence Pt16- nanoclusters and their application to detect sulfide ions in solutions. *Nanotechnology* 27: 425602 (7 pp)
23. Xu N, Li H-W, Wu Y (2017) Hydrothermal synthesis of polyethylenimine-protected high luminescent Pt-nanoclusters and their application to the detection of nitroimidazoles. *Anal Chim Acta* 958:51–58
24. Yu C-J, Chen T-H, Jiang J-Y, Tseng W-L (2014) Lysozyme-directed synthesis of platinum nanoclusters as a mimic oxidase. *Nanoscale* 6:9618–9624
25. Chen D, Gao S, Ge W, Li Q, Jiang H, Wang X (2014) One-step rapid synthesis of fluorescent platinum nanoclusters for cellular imaging and photothermal treatment. *RSC Adv* 4:40141–40145
26. Fernández JG, Trapiella-Alfonso L, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2015) Aqueous synthesis of near-infrared highly fluorescent platinum nanoclusters. *Nanotechnology* 26:215601 (7 pp)
27. Buckle T, van der Wal S, van Malderen SJM, Müller L, Kuil J, van Unen V, Peters RJB, van Bommel MEM, McDonnell LA, Velders AH, Koning F, Vanhaeke F, van Leeuwen FWB (2017) Hybrid imaging labels: providing the link between mass spectrometry-based molecular pathology and theranostics. *Theranostics* 7:624–633
28. Feng D, Tian F, Qin W, Qian X (2016) A dual-functional lanthanide nanoprobe for both living cell imaging and ICP-MS quantification of active protease. *Chem Sci* 7:2246–2250
29. Yang B, Zhang Y, Chen B, He M, Yin X, Wang H, Li X, Hu B (2017) A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells. *Biosens Bioelectron* 96:77–83
30. Cruz-Alonso M, Trapiella-Alfonso L, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2016) Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens Bioelectron* 77:1055–1061
31. Hahn YK, Jin Z, Kang JH, Oh E, Han MK, Kim HS, Jang JT, Lee JH, Cheon J, Kim SH, Park HS, Park JK (2007) Magnetophoretic immunoassay of allergen-specific IgE in an enhanced magnetic field gradient. *Anal Chem* 79:2214–2220
32. Chen HX, Busnel JM, Peltre G, Zhang XX, Girault HH (2008) Magnetic beads based immunoaffinity capillary electrophoresis of total serum IgE with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem* 80:9583–9588
33. Peng Q, Cao Z, Lau C, Kai M, Lu J (2011) Aptamer-barcode based immunoassay for the instantaneous derivatization chemiluminescence detection of IgE coupled to magnetic beads. *Analyst* 136: 140–147
34. Cheow LF, Han J (2011) Continuous signal enhancement for sensitive aptamer affinity probe electrophoresis assay using electrokinetic concentration. *Anal Chem* 83:7086–7093
35. Chinnasamy T, Segerink LI, Nystrand M, Gantelius J, Andersson H (2014) A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst* 139:2348–2354
36. Cao J, Wang H, Liu Y (2015) Petal-like CdS nanospheres-based electrochemiluminescence aptasensor for detection of IgE with gold nanoparticles amplification. *Spectrochim Acta A* 151:274–279
37. Li Z, Li Z, Niu Q, Li H, Vuki M, Xu D (2017) Visual microarray detection for human IgE based on silver nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem* 239:45–51
38. Yescas-González T, Leonard A, Gaude V, Delplanque A, Barre A, Rougé P, Garnier L, Bienvenu F, Bienvenu J, Zelsman M, Picard E, Peyrad D (2019) IgE detection in allergic patient's serum by absorption analysis of biofunctionalised microparticles. *Microelectron Eng* 207:27–32

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

# Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation - Inductively coupled plasma – Mass spectrometry using metal nanoclusters as labels

Ana Lores-Padín<sup>a</sup>, Beatriz Fernández<sup>a,b,\*</sup>, Lydia Álvarez<sup>b,c</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>b,c,\*\*</sup>, Imre Lengyel<sup>d</sup>, Rosario Pereiro<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>c</sup> Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012, Oviedo, Spain

<sup>d</sup> Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine, School of Medicine, Dentistry and Biomedical Science, Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland, United Kingdom

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Metal nanoclusters  
Bioimaging  
Immunohistochemistry  
Multiplex analysis of proteins  
Age-related macular degeneration  
Laser ablation ICP-MS

## ABSTRACT

Simultaneous determination of proteins with micrometric resolution is a significant challenge. In this study, laser ablation (LA) inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) was employed to quantify the distribution of proteins associated to the eye disease age-related macular degeneration (AMD) using antibodies labelled with three different metal nanoclusters (MNCs). PtNCs, AuNCs and AgNCs contain hundreds of metal atoms and were used to detect metallothionein 1/2 (MT1/2), complement factor H (CFH) and amyloid precursor protein (APP) in retina, ciliary body, retinal pigment epithelium (RPE), choroid and sclera from human cadaveric eye sections. First, the labelling of MNCs bioconjugated primary antibodies (Ab) was optimised following an immunolabelling protocol to avoid the non-specific interaction of MNCs with the tissue. Then, the LA and ICP-MS conditions were studied to obtain high-resolution images for the simultaneous detection of the three labels at the same tissue section. A significant signal amplification was found when using AuNCs, AgNCs and PtNCs labelled Ab of 310, 723 and 1194 respectively. After the characterisation of MNCs labelled immunoprobes, the Ab labelling was used for determination of MT1/2, CFH and APP in the RPE-choroid-sclera, where accumulation of extracellular deposits related to AMD was observed. Experimental results suggest that this method is fully suitable for the simultaneous detection of at least three different proteins.

## 1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD), a neurodegenerative eye disease, is the most common cause of irreversible visual loss in older people in developed countries [1]. AMD is characterised by progressive visual impairment due to degeneration of photoreceptors and the retinal pigment epithelium (RPE). Generally, AMD is classified into two clinical stages, early and late. The appearance of extracellular deposits between the RPE and the inner collagenous layer of Bruch's membrane and pigmentary abnormalities of the RPE are the main clinical signs of early AMD. Late AMD is characterised by neovascularisation (wet or exudative AMD) or geographic atrophy (known as non-neovascular, dry, or

non-exudative AMD) [2].

New effective treatments exist for neovascular AMD (e.g., anti-vascular endothelial growth factor therapy [3]), whereas atrophic AMD still requires basic studies. It is known that atrophic AMD is related to the focal dysfunction of the RPE due to the growth of drusen, which results in photoreceptor death [4]. Several studies have identified lipids, proteins and minerals among the components inside these extracellular deposits [5–8]. The exploration of drusen formation and particularly their composition can help to understand not only their growth in the late stage of the disease but also will afford search for effective treatments to decrease its progress. Within this context, three proteins previously identified in drusen composition [8,9] will be investigated in

\* Corresponding author. Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain.

\*\* Corresponding author. Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain.

E-mail addresses: [fernandezbeatriz@uniovi.es](mailto:fernandezbeatriz@uniovi.es) (B. Fernández), [h.gonzalez@fio.as](mailto:h.gonzalez@fio.as) (H. González-Iglesias).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>

Received 29 May 2020; Received in revised form 23 July 2020; Accepted 29 July 2020

Available online 5 August 2020

0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

this work: metallothionein 1/2 (MT1/2), complement factor H (CFH) and  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP).

Inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) offers interesting analytical capabilities, such as multi-elemental and isotopic determinations, limits of detection below ng mL<sup>-1</sup> and comparatively low matrix effects [10,11]. The use of specific probes labelled with exogenous metal-tags makes possible the determination of selected biomolecules with high sensitivity and enormous multiplexing capabilities [12–14]. Additionally, the combination of metal-labelled immunoprobes with laser ablation (LA) - ICP-MS allows to detect the distribution of specific proteins within biological tissues with a micro-metric resolution.

The most widely used method for the localisation of proteins is immunolabelling. Immunofluorescence provides increased sensitivity compared to colorimetric assays, and it is cheaper than LA-ICP-MS. Still, there are several limitations to use this method, such as difficulty to accomplish highly multiplexed assays because of dye bandwidth, troubles to measure simultaneously targets that differ in abundance by an order of magnitude or more, as well as risks of dye fluorescence quenching. Moreover, immunofluorescence procedures are limited by sample autofluorescence and signal scattering, and absolute quantification is difficult. These issues can be overcome by LA-ICP-MS analysis, constituting a promising alternative to conventional immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence [15,16].

Several elemental (or isotopic) reporters have been proposed so far as labels for immunoprobes in LA-ICP-MS measurements. One of the strategies is the use of strong complexes formed by lanthanides with reagents which have additional reactive groups to bind to a recognition biomolecule. These have been effectively used, for example, for multiplex detection of three biomarkers of breast cancer tissue [17] and four proteins related to Parkinson disease [18]. Polymers containing several chelates of a given metal (or isotope) per label have also been employed to increase the number of reporter atoms per tag, allowing signal amplification [14,19,20]. This is an interesting strategy for the analysis of biomolecules in cells by liquid nebulisation ICP-MS [14,19] and LA-ICP-MS [20]. However, non-specific absorptions described in the analysis of biological tissues by LA-ICP-MS can limit the sensitivity of this method [21].

Higher signal enhancements can be obtained by using quasi-spherical metal nanoparticles as labels, with 5–50 nm diameters [22,23]. These nanoparticles contain thousands of metal atoms, but serious non-specific adsorptions have been described. The use of metal nanoclusters (MNCs) with diameters below 3 nm, typically containing a few hundreds of metal atoms, offers lower risk of blocking recognition sites of the biomolecules [24], more efficient penetration within the biological tissue during the IHC procedure, as well as high amplification [25–27]. AuNCs and AgNCs have been successfully investigated for specific proteins bioimaging by LA-ICP-MS [25–27].

In this study we generated AuNCs, AgNCs and PtNCs labelled antibodies against MT1/2, CFH and APP. The distribution of the proteins in human eye sections was subsequently evaluated by comparing signals with home-made gelatine standards. Amplification properties of the selected MNCs, strategies to minimise non-specific absorption, as well as optimisation of LA-ICP-MS set-up to achieve the simultaneous analysis of three proteins along the same tissue section are among the parameters evaluated.

## 2. Experimental section

### 2.1. Reagents and materials

The one-pot syntheses of the water soluble MNCs were individually carried out using H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> (8% wt; Sigma-Aldrich, San Luis, USA), AuCl<sub>4</sub>Na-H<sub>2</sub>O (99% powder; Sigma-Aldrich) and AgNO<sub>3</sub> (99.9% crystalline; Alfa Aesar, Thermo Fisher, Kandel, Germany) as the metal salt precursors for PtNCs, AuNCs and AgNCs, respectively. Lipoic acid

(>98% powder; Acros Organics, Geel, Belgium) was employed in all cases as the stabilising ligand and NaBH<sub>4</sub> (98% powder, Sigma Aldrich) as the reductant. NaOH (Sigma-Aldrich) was used to help ligand solubilisation and to achieve the proper pH of each synthesis solution. Propan-2-ol (Fisher Scientific, Hampton, USA) was used for the synthesis of AuNCs.

The carbodiimide crosslinking reaction was followed to covalently bind the MNCs with the corresponding specific primary antibody (Ab). For such purpose, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (98% powder; Acros Organics) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (>98% powder; Sigma-Aldrich) were used. Furthermore, TRIS base (>99%; Sigma-Aldrich), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Panreac AppliChem, Barcelona, Spain) and L-glutathione reduced (>98%; Sigma-Aldrich) were employed in AgNCs labelling protocol. Mouse monoclonal anti-human MT1/2 A b (anti-h-MT1/2) (Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-human CFH Ab (anti-h-CFH) (Abcam) and rabbit polyclonal anti-human APP Ab KPI Domain (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were the primary antibodies used. Hydroxylamine hydrochloride ( $\geq$ 99% powder; Sigma-Aldrich) was added at the last step of the antibody labelling to reduce non-specific interactions. For the purification of the MNCs and the MNCs labelled immunoprobes (MNCs:anti-h-Ab), 3 and 100 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units (Merck Millipore) were respectively used.

For the characterisation of the labelled immunoprobe, quantification of the available Ab in the immunoprobe was carried out by a non-competitive direct ELISA immunoassay. Protein IgG standard from rabbit (University of Oviedo), secondary Ab labelled with peroxidase (HRP) against rabbit proteins (Sigma-Aldrich), TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate (Sigma-Aldrich) and sulfuric acid (95–97%, Merck Millipore) were used. Furthermore, for the characterisation of the metallic part of the labelled immunoprobe, hydrochloric acid (34–37%, trace analysis; VWR chemicals, Radnor, PA, USA) and nitric acid (67–69%, trace analysis; VWR chemicals) were used for the digestion of MNCs labelled immunoprobes prior to ICP-MS measurements. For LA-ICP-MS measurements, matrix-matched laboratory standards (spiked with Pt, Ag and Au) were prepared using gelatine powder (VWR chemicals) for quantification purposes.

Human eyes were obtained <24 h *post-mortem* through the National Disease Research Interchange (Philadelphia, USA) and the Eye Depository at the UCL Institute of Ophthalmology (London, UK). In all cases eyes were formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) following conventional protocols. The procedures adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. 5 and 10  $\mu$ m thick eye tissue sections (for immunofluorescence and LA-ICP-MS analyses, respectively) from the FFPE blocks were placed on poly-L-lysine surface coated microscope slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Sections were deparaffinised with xylene (Sigma-Aldrich) and dehydrated with absolute ethanol (VWR Chemicals). During the IHC stage, several reagents were used: ammonium chloride (Panreac) to minimise tissue autofluorescence (only in the immunofluorescence validation procedure), Triton X-100 (Sigma-Aldrich) to permeabilise tissue sections, bovine serum albumin (BSA) (99% powder, Merck) and goat serum (Sigma-Aldrich) to block non-specific interactions, and 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) to stain cell nuclei. Washing steps were carried out with phosphate-buffered saline (10 mM PBS - 0.9% NaCl, pH 7.4) (Sigma-Aldrich) and surfactant tween 20 (Sigma-Aldrich). Mounting media for fluorescence detection (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was employed to protect the tissue and maintain the fluorescence signal during microscopy visualisation. Either Alexa Fluor Plus (A32740) consisting on Alexa® 594:goat anti-rabbit IgG or Alexa Fluor Plus (A32742) consisting on Alexa® 594:goat anti-mouse IgG, both from Thermo Fisher, were used as the secondary Ab for indirect immunoassays in the validation procedures.

Deionised ultrapure water, resistivity 18.2 M $\Omega$  cm (Purelab Flex 3&4; ELGA-Veolia, High Wycombe, UK) was utilised throughout.

## 2.2. Instrumentation

LA-ICP-MS analyses were carried out using a LA system (LSX-213 from Teledyne Cetac Technologies, Omaha, USA) coupled to a double-focusing sector field ICP-MS (Element 2, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) working at low mass resolution mode. The commercial ablation chamber was replaced by a Peltier-cooled chamber that allows keeping chamber temperature constant at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [28]. Experimental parameters applied for LA-ICP-MS analysis are collected in Table 1, both for single and multiplex imaging.

Concerning fluorescence and optical microscopy measurements, a Leica microscope (DM6000, digital camera DFC 310 Fx Leica) was used to obtain images of the tissue sections from the immunoassays. The microscope is equipped with  $10\times$ ,  $20\times$  and  $40\times$  objectives and using the RGB (red, green, blue) filter to excite the DAPI staining ( $\lambda_{\text{ex}} = 358\text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 461\text{ nm}$ , blue emission) and the fluorophore Alexa ( $\lambda_{\text{ex}} = 594\text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 620\text{ nm}$ , red emission). Also, contrast phase images of the tissues were obtained. To adjust the exposure and gain of the microscope for the acquisition of the images, a negative control of the immunoassay (without primary Ab addition) was first analysed. Fluorescence images were processed with ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, USA). Furthermore, ELISA measurements were carried out with an absorbance microplate reader (ELX800; Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA). Details about microarray analysis of human MT1/2, CFH and APP in eyes from *post-mortem* donors as well as studies about the Ab penetration into the eye tissues are collected in the Electronic Supplementary Material (ESM).

## 2.3. Experimental procedures

### 2.3.1. Synthesis of metal nanoclusters

The syntheses of the three thiolated MNCs (PtNCs, AuNCs and AgNCs) were carried out following the protocols described elsewhere [26,29,30]. A similar bottom-up procedure was used in all cases: the metal precursor (salt of the metal with a high oxidation state) is dissolved in basic aqueous media (adjusted with a NaOH solution) and subsequently reduced by  $\text{NaBH}_4$  under the presence of the stabilising agent (lipoic acid). The molar ratios (metal:ligand:reductor) have been optimised for each type of MNCs (1:5:1 for PtNCs, 1:3:2 for AuNCs and 1:16:12 for AgNCs). After several hours under continuously stirring (at room temperature for PtNCs and AuNCs, and at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for AgNCs), the MNCs were purified by ultrafiltration using 3 kDa pore size Amicon ultra

**Table 1**  
Operating conditions of laser ablation and ICP-MS instruments for the analysis of proteins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using MNCs labelled immunoprobes.

ICP-MS Element II (Thermo Fischer Scientific)		
Parameters	Single imaging	Multiplex imaging
RF power	1350 W	
Cooling gas flow rate	$16\text{ L min}^{-1}$	
Auxiliary gas flow rate	$1.15\text{ L min}^{-1}$	
Nebuliser gas flow rate	$0.7\text{ L min}^{-1}$	
Isotopes	$^{107}\text{Ag}$ or $^{195}\text{Pt}$ or $^{197}\text{Au}$	$^{107}\text{Ag}$ & $^{195}\text{Pt}$ & $^{197}\text{Au}$
Sampling time	0.01 s	
Mass window	75	
Segment duration	0.23 s	1.74 s
Measurements per peak	30	
Resolution mode	Low mass resolution	
<b>LA System LSX-213 (Teledyne Cetac Technologies)</b>		
Spot diameter	10 $\mu\text{m}$	
Laser energy	1.68 mJ $\rightarrow$ retina and RPE 2.4 mJ $\rightarrow$ ciliary body	
Scan speed	$5\text{ }\mu\text{m s}^{-1}$	
Repetition rate	20 Hz	
Ablation mode	Multi line scan	
Carrier gas (He)	$1.0\text{ L min}^{-1}$	
Sample temperature	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	

centrifugal filter units. The NCs in the filter were restored to a volume equal to the initial one with a buffer solution (PBS for PtNCs and AuNCs, and TRIS-EDTA for AgNCs). Next, MNCs were characterised by fluorescence, HR-TEM and ICP-MS measurements. HR-TEM images showed in the three cases MNCs with a spherical metal nucleus and FCC crystal structure [26,29,30]. As described elsewhere [26,29,30], the average particle size determined for each type of MNCs was:  $1.49 \pm 0.025\text{ nm}$  for PtNCs,  $2.20 \pm 0.04\text{ nm}$  for AuNCs, and  $2.9 \pm 0.1\text{ nm}$  for AgNCs.

### 2.3.2. Synthesis and characterisation of the MNCs labelled immunoprobes

For our experiments, we selected three antibodies for MNCs labelling. The labelling of the specific primary Ab (anti-h-MT1/2, anti-h-CFH or anti-h-APP) was first performed with PtNCs as the elemental label to accomplish the individual bioimaging distribution of the proteins in three consecutive eye tissue sections from the same donor. The procedure was carried out following the carbodiimide chemistry, and it was previously optimised in terms of keeping the properties of both components (i.e., the recognition capabilities of the Ab and the fluorescence properties of the PtNCs) [29]. 198  $\mu\text{L}$  of PtNCs solution was mixed with 100  $\mu\text{L}$  of each primary Ab ( $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ), keeping a 1:20 M ratio Ab:PtNCs. Then, mechanical stirring was started, and carbodiimide cross-linking reagents were added (1:1500:1500 M ratio of Ab:EDC:NHS). After 2 h under vortex stirring at room temperature, purification was performed by ultrafiltration (100 kDa pore size Amicon), thus removing any excess of non-conjugated NCs. To avoid non-specific interactions between the PtNCs and the biological tissues, a final step was required to block free carboxylic groups. For that purpose, a primary amine (hydroxylamine) was added to the purified labelled immunoprobes solutions with a molar ratio of 1:50 Pt NCs:hydroxylamine. After 2 h stirring, the solutions were purified by ultrafiltration (using 100 kDa pore size Amicon). The purified labelled immunoprobes (PtNCs:anti-h-MT1/2, PtNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP) were stored separately in PBS buffer at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

For the multiplexed analysis of MT1/2, CFH and APP in the same tissue section, each Ab was labelled with a specific type of MNCs (AuNCs as labels of anti-h-MT1/2, AgNCs as labels of anti-h-CFH and PtNCs as labels of anti-h-APP) following a protocol similar to that reported above for PtNCs (Ab:MNCs molar ratios of 1:3 for AuNCs, 1:3 for AgNCs and 1:20 for PtNCs were employed). Concerning the blocking step with hydroxylamine, molar ratios of 1:50 were used for AuNCs and PtNCs, whereas 1:20 was used for AgNCs. Finally, the purified MNCs labelled immunoprobes solutions were added into the same Eppendorf tube and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further use.

In order to obtain the bioimaging of the proteins by LA-ICP-MS with MNCs as labels, labelled immunoprobes must be characterised to know their amplification factors. For such purpose, both the concentration of Ab available for recognition purposes and the concentration of reporter metal must be calculated. Thus, a similar procedure to that described by Cruz-Alonso et al. [26,31] for AuNCs was performed for the three MNCs. Two types of experiments were required. On the one hand, a direct ELISA with rabbit IgG protein standard (produced with a known concentration in the "Biotechnology Preparative" unit of the Scientific-Technical Services of the University of Oviedo) was used to determine the available concentration of Ab in the MNCs labelled immunoprobe. On the other hand, the labelled immunoprobes were digested with *aqua regia* (PtNCs, AuNCs) or nitric acid (AgNCs) during 20 min in an ultrasonic bath and then diluted in 2% nitric acid to determine the metal concentration per immunoprobe by ICP-MS analysis (conventional nebulisation).

### 2.3.3. Immunoassay protocol with the MNCs labelled immunoprobes for the bioimaging of proteins in biological tissue sections by LA-ICP-MS

Eye tissue sections (10  $\mu\text{m}$  thick) from FFPE blocks were deposited on poly-L-lysine-coated microscope slides. The fixed tissues were immersed twice ( $2 \times 5\text{ min}$ ) in xylol solution to remove the paraffin and then were rehydrated in a decreasing graded alcohol series (100%, 95%, 80%,

70%, 0%) for 5 min per condition. After washing three times (10 min) with 10 mM PBS pH 7.4, a solution of 0.1% Triton X-100 in PBS was added to the sections for tissue permeabilization (5 min). A further washing step with PBS was necessary and then the blocking agent solution (0.1% BSA and 10% goat serum solution in 10 mM PBS, pH 7.4) was added for 30 min at room temperature. Bioimaging of PtNCs labelled MT1/2, CFH and APP antibodies were independently evaluated on consecutive tissue sections following an overnight incubation at 4 °C into a humidified chamber. For multiplexed analysis, a mixture of purified labelled immunoprobes (AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP) were added to the tissue section. To favour the removal of the non-reactants, several washing stages with PBS were performed. Labelled sections were stored at -20 °C till the analysis by LA-ICP-MS.

### 2.3.4. Bioimaging of proteins in eye tissue sections by LA-ICP-MS

For LA-ICP-MS analyses, LA and ICP-MS instruments were daily optimised. The ICP-MS tuning was performed using a 1 ng g<sup>-1</sup> multi-elemental solution in terms of maximum signal intensity and low oxide formation (ThO<sup>+</sup>/Th<sup>+</sup>). Furthermore, LA-ICP-MS was tuned by the analysis of SRM NIST 612 for maximum signal intensity, good stability (relative standard deviation below 4%), the <sup>238</sup>U<sup>+</sup>/<sup>232</sup>Th<sup>+</sup> ratio close to 1 and the ThO<sup>+</sup>/Th<sup>+</sup> ratio below 0.2%. For the imaging of the ocular tissues, experimental conditions were optimised to ensure a complete ablation of the total tissue thickness (multiple line by line scanning). The selected conditions are summarised in Table 1. Distribution of Pt, Au, and Ag in the tissue sections was obtained by LA-ICP-MS using laboratory gelatine standards. Metal-doped gelatines (0–25 µg g<sup>-1</sup> of Pt, Au and Ag) were measured daily, before and after the imaging analysis of the eye tissue to compensate for drift effects of the LA-ICP-MS instrument as well as for quantification purposes. Detailed information regarding the preparation and characterisation of the standards is collected in ESM. Two-dimensional images of the proteins' distribution (MT1/2, CFH and APP) along the eye structures were built using the software ImageJ-Fiji. For data treatment, the gas blank contribution was eliminated from the raw intensity signals to work with net intensities (counts per second, cps).

## 3. Results and DISCUSSION

### 3.1. Optimisation of the bioconjugation and IHC procedures using PtNCs as labels

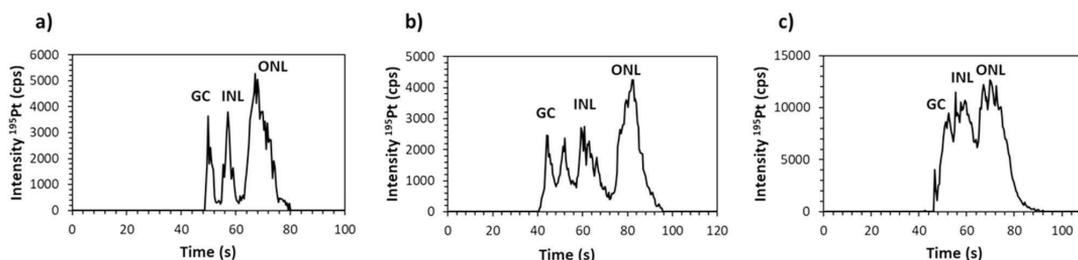
In a previous publication describing the determination of IgE in human sera using PtNCs by conventional nebulisation ICP-MS [29], the molar ratio between the Ab and PtNCs was optimised. Such optimisation was performed to maximise the amount of metal per Ab to achieve high amplification for ICP-MS detection while keeping the recognition capabilities of the Ab. A 1:20 M ratio of Ab:PtNCs was found to be optimal. To employ PtNCs (and MNCs in general) as labels for examining protein

distribution in biological tissues, an additional step is necessary after the binding of the Ab to the MNCs in the preparation of the labelled immunoprobes to minimise non-specific interactions with tissues. Primary amines, such as hydroxylamine have been successfully proved to block carboxylic groups of AuNCs and AgNCs [26,27]. In the present work 3 M ratios of PtNCs:hydroxylamine (1:100, 1:50 and 1:20) were evaluated for reducing non-specific PtNCs:anti-h-APP binding in the eye sections (Fig. 1). Labelling was carried out on consecutive eye sections and the comparison included a tissue without blocking with the primary amine. Fig. 1 shows a LA-ICP-MS line profile for <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> (APP protein) along the different layers of the neurosensory retina using 1:50 and 1:20 M ratios and without the blocking step (Fig. 1a, b and 1c, respectively). Overall, it was found that decreasing the molar ratio between PtNCs and the primary amine both the <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> signal intensity and the non-specific binding increased, resulting in an almost continuous <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> profile where it was not possible to distinguish between the retinal layers (Fig. 1c). The results showed that 1:50 M ratio was optimal for PtNCs: anti-h-APP labelled immunoprobe and this ratio was used for all further experiments with PtNCs.

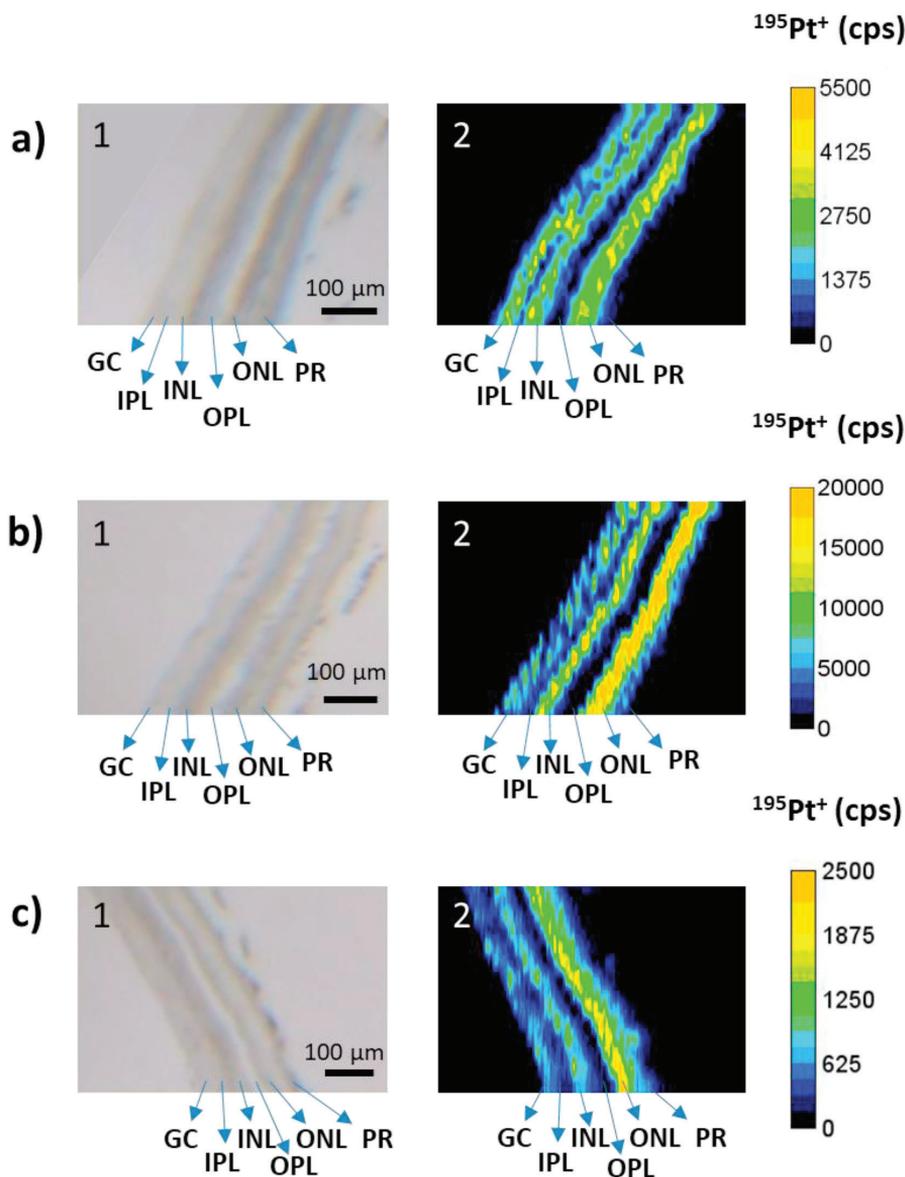
### 3.2. PtNCs as label for the individual bioimaging of proteins in eye tissues by LA-ICP-MS

AuNCs and AgNCs have previously been investigated as metal labels for proteins detection in biological tissues using LA-ICP-MS. However, PtNCs as labels of immunoprobes have not yet been explored for such purpose. PtNCs:anti-h-MT1/2, PtNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP immunoprobes were synthesised and used on three consecutive sections (control donor) to study the distribution of MT1/2, CFH and APP proteins. The neurosensory retina was selected for the study due to its highly organised structure but diverse cellular architecture, following the experimental conditions outlined in Table 1 (ICP-MS set-up denoted as single imaging). Fig. 2 shows the qualitative images obtained by LA-ICP-MS of the <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> signal for MT1/2, CFH and APP distribution (Fig. 2a, b and 2c, respectively). According to the microarray analysis of Fig. S1 (ESM), MT1/2 isoforms were highly expressed in the neurosensory retina, followed by APP, while the expression levels of CFH were lower.

As previously reported using AuNCs and AgNCs immunoprobes [25, 27], MT1/2 (Fig. 2a) was distributed at the outer nuclear layer (ONL), the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cells (GC), while they were not observed in the inner and outer plexiform layers (IPL or OPL, respectively). CFH and APP proteins were not previously analysed using MNCs labels and experimental results obtained by LA-ICP-MS showed that CFH was mainly localised in the ONL and the outer segment of photoreceptors (PR) as well as at the INL, with qualitative lower distribution in GC (Fig. 2b). The APP protein (Fig. 2c) was mainly distributed throughout the ONL, with a lower presence at the INL and the GC, similarly to that observed for MT1/2 and APP. The absence of proteins expression in IPL and OPL must be cautiously considered, since



**Fig. 1.** <sup>195</sup>Pt<sup>+</sup> line profile obtained by LA-ICP-MS for the analysis of retinal layers in consecutive human eye tissue sections from a control donor after IHC protocol with PtNCs:anti-h-APP labelled immunoprobe using different PtNCs:hydroxylamine molar ratios. a) 1:50, b) 1:20; and c) without hydroxylamine. Width of the ablation lines at the ocular tissues range from 165 µm to 285 µm. Retinal layers: ganglion cells (GC), inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL).



**Fig. 2.** Analysis of proteins distribution along retinal layers in three consecutive human eye tissue sections from a control donor after IHC protocol with PtNCs labels by LA-ICP-MS. Column 1 shows the optical images of the analysed region obtained with the camera of the laser system. Column 2 depicts the  $^{195}\text{Pt}^+$  elemental image (intensity signal in cps) obtained by LA-ICP-MS using PtNCs labelled immunoproboscopes for individual detection of MT1/2, CFH, and APP proteins (14 LA lines). a) PtNCs:anti-h-MT1/2, (b) PtNCs:anti-h-CFH, and c) PtNCs:anti-h-APP.

some tissues losses cannot be ruled out during sample processing.

As mentioned above, the distribution obtained for MT1/2 by LA-ICP-MS was confirmed by comparison with results previously reported [25]. However, the proteins APP and CFH have not been studied using MNCs immunoproboscopes with LA-ICP-MS or fluorescence detection up to date. Therefore, immunolocalization of CFH and APP proteins obtained along the retinal layers by LA-ICP-MS was corroborated by conventional immunofluorescence using Alexa® Plus 594. Although fluorescence detection solely permits qualitative analysis, the proteins distribution along micrometres (and even sub-micrometres) structures of eye tissues

can be easily identified. Fig. S2 (ESM) shows the microscopy images of CFH and APP obtained by conventional immunofluorescence (Fig. S2a and S2b, respectively) in consecutive tissue sections to those employed for LA-ICP-MS analyses. A correlation in the localisation of both APP and CFH proteins along the neurosensory retinal layers was observed by LA-ICP-MS and immunofluorescence. However, according to our microarray data (Fig. S1), the observed lower expression levels of CFH in the neurosensory retina may indicate some unspecific Ab labelling which should be attributed to the particular Ab used as immunoprobe. To our knowledge, there is hardly any current literature covering the

IHC localisation of CFH in the human retina. Abundant expression of CFH has been detected in human RPE, considered local source of CFH in the eye, and CFH protein was confirmed in the neurosensory retina by Western blot [32]. Recently, Bhutto et al. [33] found negative staining for CFH in neural retina, although previous studies showed robust CFH expression in human photoreceptor inner and outer segments and in the ganglion cell layer [34]. Therefore, considering that the inherent limitation on CFH Ab specificity cannot ruled out, future studies must address the use of additional antibodies to confirm these observations. However, the validation of the LA-ICP-MS analytical methodology is not compromised, since similar results were obtained using this particular Ab by immunofluorescence and by LA-ICP-MS.

### 3.3. Experimental conditions for multiplex bioimaging by LA-ICP-MS

Next step was to optimise the experimental conditions for the simultaneous analysis of three proteins. For this, three different MNCs were used as labels: PtNCs, AgNCs and AuNCs. Different studies were required to obtain high-resolution images of the three proteins to be detected on the same section using the sequential mass analyser. Both the ICP-MS acquisition method and the LA conditions (e.g., sample temperature, repetition rate and scan speed) were optimised for such purpose.

Concerning ICP-MS parameters, the effect of sequential isotope acquisition (sector-field MS) for multiplex bioimaging was studied by comparing the images obtained for the analysis of MT1/2, CFH and APP in the same tissue region (i.e.,  $^{197}\text{Au}$ ,  $^{107}\text{Ag}$  and  $^{195}\text{Pt}$  isotopes were monitored in the same ICP-MS method) to those obtained in three adjacent regions of the same section after the multiplex IHC protocol (i.e., three different ICP-MS methods were employed, monitoring a single isotope in each one). Fig. S3 (ESM) depicts the images obtained for MT1/2 ( $^{197}\text{Au}^+$ ), CFH ( $^{107}\text{Ag}^+$ ) and APP ( $^{195}\text{Pt}^+$ ) distribution in the human neurosensory retina (control donor) using single and multiplex imaging LA-ICP-MS (Fig. S3a and S3b, respectively). As can be seen, the MT1/2, CFH and APP distribution can be distinguished in both cases, with preferential localisation in the INL, the ONL and the GC for MT1/2 and

CFH, with a lesser extent in the INL and the GC for APP. However, the measurement of one single isotope per analysis (Fig. S3a) allows to reduce the acquisition time of the ICP-MS and, thus, the distribution of MT1/2, CFH and APP throughout the retinal layers can be discriminated with a better lateral resolution.

Another important aspect to be considered is the sample temperature during the LA sampling. Several authors [28,35–37] reported better resolved heteroatoms images for samples analysed at temperatures below  $0^\circ\text{C}$  compared to those obtained at room temperature. A smaller heat affected region as well as less re-deposition into adjacent structures during the ablation was observed at low temperature. In the present work the use of cryogenic conditions ( $-20^\circ\text{C}$ ) and room temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) were compared for the analysis of MT1/2, CFH and APP proteins at ciliary body. The *pars plicata* region was selected for sample temperature evaluation since the sinuous shape of the microstructure of these ciliary processes makes the selection of LA conditions critical to obtain well resolved images. First, the presence of MT1/2, CFH and APP in ciliary body structure was confirmed by conventional immunofluorescence done in consecutive tissue sections to those employed for LA-ICP-MS analyses. Fig. S4 (ESM) collects the images obtained for the three proteins distribution along ciliary processes.

LA-ICP-MS images of ciliary processes obtained using MNCs immunoprobe allowed to visualise MT1/2, CFH and APP distribution in the different cell structures of the *pars plicata* region (Fig. 3). Fig. 3a and b shows, respectively, the images obtained for the proteins distribution along ciliary body, working under cryogenic conditions and at room temperature. Both cases showed that MT1/2, CFH and APP were mainly located in the ciliary epithelial cells, both non-pigmented ciliary epithelium (NPCE) and pigmented ciliary epithelium (PCE). However, the use of low temperatures offered better resolved images and MT1/2, CFH and APP were specifically identified at the NPCE and PCE cells (Fig. 3a). In contrast, a higher abnormal localisation was observed in the ciliary processes at room temperature (Fig. 3b). This fact can be attributed to a less tissue damage as well as less contamination from the neighbouring lines using low temperature. Additionally, a lower scan speed was studied to evaluate its influence on the spatial resolution.

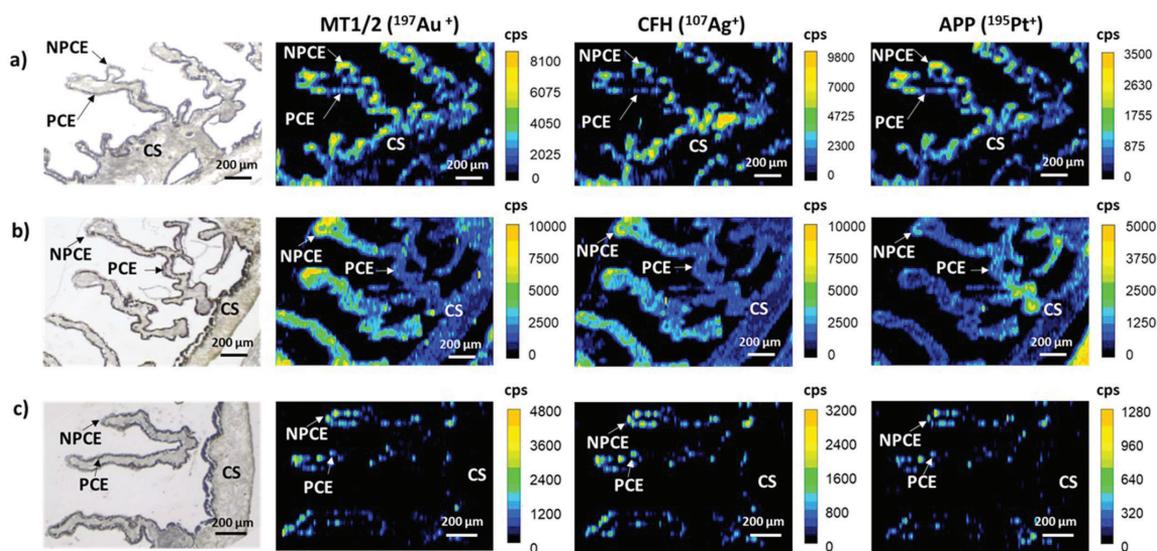


Fig. 3. Analysis of proteins distribution in adjacent *pars plicata* regions of the ciliary body from a human control donor after IHC protocol with MNCs labelled immunoprobe (AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP) by LA-ICP-MS. First column collects the optical image of the region analysed. a) Cryogenic conditions ( $T = -20^\circ\text{C}$ ) and  $5\ \mu\text{m s}^{-1}$  scan speed, b) Room temperature ( $T = 25^\circ\text{C}$ ) and  $5\ \mu\text{m s}^{-1}$  scan speed, and c) Cryogenic conditions ( $T = -20^\circ\text{C}$ ) and  $2.5\ \mu\text{m s}^{-1}$  scan speed. CS: ciliary stroma; PCE: pigmented ciliary epithelium; NPCE: non-pigmented ciliary epithelium.

Fig. 3c shows the distribution of MT1/2, CFH and APP along ciliary processes using  $2.5 \mu\text{m s}^{-1}$  (at low temperature). Although a better lateral resolution was achieved by decreasing to the half the scan speed, the sensitivity significantly decreased, making the identification of the sought proteins almost impossible in some regions (e.g., ciliary epithelium at the basal part of the ciliary process). Thus,  $5 \mu\text{m s}^{-1}$  was selected for further LA-ICP-MS analyses.

### 3.4. Multiplex bioimaging of MT1/2, CFH and APP proteins in human eye sections

#### 3.4.1. Characterisation of PtNCs and AgNCs immunoprobcs

In order to obtain not only the distribution of the proteins along the structures of the eye tissues sections by LA-ICP-MS but also to compare signals of different proteins as well as to obtain the proteins concentration, it is necessary to determine the amplification provided by each MNCs labelled immunoprobcs (the steps required for the metal immunoprobcs characterisation can be followed in the schematic diagram of Fig. S5). To this end, the ratio between the metal detected by ICP-MS (i. e., Au, Ag, or Pt) and the selected antigen (e.g., MT1/2, CFH or APP) must be determined. Furthermore, the number of metal atoms linked to each available Ab (N) must be calculated to know the amplification factor provided for each MNCs immunoprobcs.

As previously reported, the ratio (N) between the concentrations of metal and the available Ab in the labelled immunoprobcs can be experimentally calculated [26,31]. The determination of N was individually carried out for the three labelled immunoprobcs of the present work: AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP (briefly described at ESM). The average amplification factors found for AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP were respectively 310, 723 and 1194, which corresponds to ratios very close to 1:1, 1:1 and 11:1 MNCs:Ab, respectively for each of the above labelled immunoprobcs.

On the other hand, it is crucial to ensure that antibodies have fully penetrated into the whole tissue thickness ( $10 \mu\text{m}$ ). As an example, Fig. S6 (ESM) collects some images obtained by laser confocal microscopy, demonstrating the penetration of the AuNCs:anti-h-MT1/2 immunoprobe (by measuring the fluorescence emission of the AuNCs) in the whole depth of the tissue.

#### 3.4.2. Bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases using MNCs labels by LA-ICP-MS

$10 \mu\text{m}$  thick cross-sections of human eyes from control and AMD *post-mortem* donors were ablated using experimental conditions collected in Table 1 (multiplex imaging). Two dimensional images of MT1/2, CFH and APP proteins covering an area of RPE-choroid-sclera region were simultaneously obtained from the same section by monitoring  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  and  $^{195}\text{Pt}^+$  from MNCs labelled immunoprobcs. In contrast to traditional IHC and immunofluorescence procedures, MNCs labels combined to LA-ICP-MS allows to determine not only the qualitative distribution of the proteins ( $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  and  $^{195}\text{Pt}^+$  signals in cps) but also to compare the signal intensities and to know their concentration along the specific tissue structures. For this, Au, Ag and Pt external calibration was carried out by using laboratory standards based on gelatines spiked with metals (standard-sample bracketing calibration). A detailed description of the laboratory standards is collected at ESM. Furthermore, the flow diagram on Fig. S5 (ESM) illustrates the steps required to transform  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$  and  $^{195}\text{Pt}^+$  intensity signals (MNCs) into MT1/2, CFH and APP concentrations. ESM also collects the calculus carried out to ensure that the IHC procedure was performed under saturation conditions (i.e. the number of the corresponding Ab is much higher than the number of MT1/2, CFH and APP in the analysed tissue specimen).

The semi-quantitative imaging of MT1/2, CFH and APP has been carried out in the RPE-choroid-sclera, where accumulation of extracellular deposits related to AMD may be present. To this end, eye sections

from *post-mortem* donors with and without AMD drusenoid deposits were selected to evaluate specific protein accumulation in control and pathological samples. First, Fig. 4 shows the images obtained from a *post-mortem* human donor without specific sub-RPE deposits characteristic of the macular disease, i.e., a non-AMD diseased human donor sample. The simultaneous determination of MT1/2, CFH and APP has been carried out for this control donor, observing that MT1/2 was widely distributed in the sclera, and it was particularly concentrated at the RPE monolayer. The observed levels in the stroma of the choroid were lower, with some regions (matching the blood vessels) without MT1/2 (see Fig. 4a). The CFH protein was widely distributed and enriched in some parts of the RPE layer, showing similar concentration in the sclera region and lower levels in the stroma of the choroid. The APP was similarly distributed in the sclera and RPE region, but in a lesser extent compared to MT1/2 and CFH. The widely distribution of selected proteins in the control sample was similar to the obtained results with the microarray analysis (see Fig. S1).

Additionally, this methodology has been used for the multiplexed bioimaging of MT1/2, APP and CFH in eye sections with AMD drusenoid deposits. In this case, prior to the LA-ICP-MS analysis of eye sections from *post-mortem* donors, transmission images were obtained by light microscopy to select specific region with sub-RPE deposits that had been shown to contain a number of different proteins (Fig. S7 in the ESM). Drusen were observed between the RPE and the Bruch's membrane (marked with arrows and a square on Fig. S7).

Figs. 5 and 6 depict the imaging obtained by LA-ICP-MS for MT1/2, CFH and APP (#1 and #2 donors, respectively). As can be observed, the MT1/2 and CFH proteins were widely distributed along the RPE monolayer, similar to the control donor, although with increased accumulation in sub-RPE deposits in specific hemispherical aggregates. Drusen deposits are marked with arrows in the images for a better localisation (the red arrow corresponds to the aggregates of deposits also observed in Fig. S7). The APP protein was conspicuously located in sub-RPE deposits. Overall, there is a preferential accumulation of selected proteins in subretinal drusenoid deposits with specific enrichment in the anomalous aggregates. It should be noted that different scales from AMD and control tissues were fixed to properly observe the distribution of proteins in both cases. It must be highlighted that some differences observed on MT1/2, CFH and APP distribution and content along the eye structures can be attributed to biological diversity characteristics or disease severity for each individual patient.

## 4. Conclusions

An immunohistochemical method has been described to simultaneously localise in the same eye tissue section three proteins of interest in neurodegenerative diseases (such as AMD) using LA-ICP-MS. The multiplex methodology developed in this work allows the amplification of the protein detection due to the hundreds of metal atoms per tag (AuNCs, AgNCs and PtNCs). Moreover, knowing the number of tag atoms and available antibodies per labelled immunoprobe, semi-quantification (at least) can be achieved. Deviations related to the uncertainty associated to MNCs diameter are overcome if considering the sensitivity achieved with the LA-ICP-MS method (hundreds or thousands of AuNCs are typically detected per laser shot). Concerning the analysis of MT1/2, CFH and APP proteins in a non-diseased and diseased eye tissues, the multiplexed analysis by LA-ICP-MS showed a preferential accumulation of MT1/2, CFH and APP in sub-RPE drusenoid deposits in eyes from AMD *post-mortem* donors, although Ab specificity must be further considered (particularly for CFH).

It must be noted that a sequential mass analyser was used. However, the use of the state-of-the-art ICP-MS instruments using a time of flight mass spectrometer would allow to increase the multiplexing capabilities using different MNCs labels. In any case, it should be stated that spatial resolution is not uniquely linked with the ICP-MS acquisition time since LA conditions as well as ablation chamber washout time have a critical

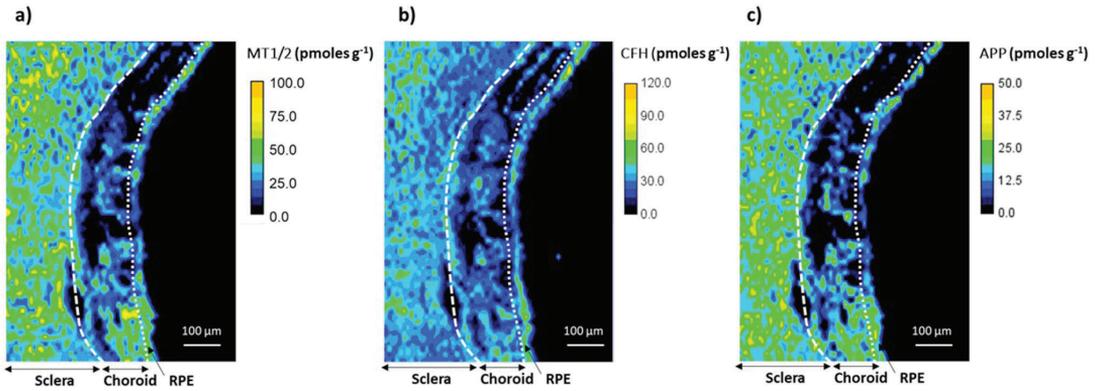


Fig. 4. Bioimaging of MT1/2, CFH and APP proteins in the RPE region from a control donor after simultaneous IHC protocol with MNCs labels (AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH and PtNCs:anti-h-APP immunoprobes) by LA-ICP-MS (60 LA lines). a) MT1/2, b) CFH, and c) APP. 2D images were built with Image J software after  $^{197}\text{Au}^+$ ,  $^{107}\text{Ag}^+$ , and  $^{195}\text{Pt}^+$  intensity signals were converted into proteins concentration (in excel program).

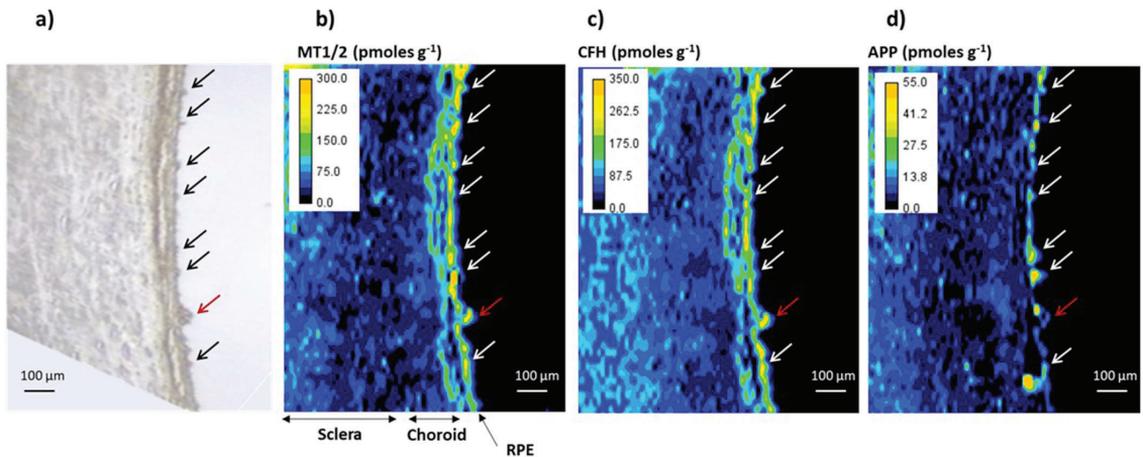


Fig. 5. Simultaneous bioimaging of MT1/2, CFH, and APP proteins in the RPE-choroid-sclera region of an AMD *post-mortem* donor (#1) after simultaneous IHC protocol with MNCs labels (AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH, and PtNCs:anti-h-APP immunoprobes) by LA-ICP-MS (45 LA lines). a) Optical image of the region selected for LA-ICP-MS analysis taken by the camera of the LA system, b) MT1/2, c) CFH, and d) APP. The protein specific localisation observed in drusen deposits are marked with arrows in the images.

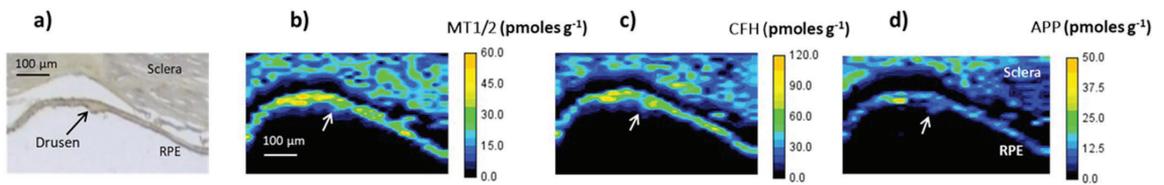


Fig. 6. Simultaneous bioimaging of MT1/2, CFH, and APP proteins in the RPE-choroid-sclera region of an AMD *post-mortem* donor (#2) after simultaneous IHC protocol with MNCs labels (AuNCs:anti-h-MT1/2, AgNCs:anti-h-CFH, and PtNCs:anti-h-APP immunoprobes) by LA-ICP-MS (30 LA lines). a) Optical image of the region selected for LA-ICP-MS analysis taken by the camera of the LA system, b) MT1/2, c) CFH, and d) APP. The protein specific localisation observed in drusen deposit is marked with an arrow in the image.

effect on the spatial resolution obtained.

Finally, we would like to highlight that the combination of MNCs as labels of immunoprobes and LA-ICP-MS permitted the simultaneous localisation and determination of three diverse proteins at the same time

in an eye tissue whose autofluorescence limits the use of immunofluorescence-based techniques to detect protein distribution. In particular, in the current work the detection of MT1/2, CFH and APP was achieved in eye tissues including RPE and PCE, where the

autofluorescence of these pigmented cells make difficult to visualise protein distribution by immunofluorescence.

### CRedit authorship contribution statement

**Ana Lores-Padín:** Investigation, Writing - original draft. **Beatriz Fernández:** Supervision, Conceptualization. **Lydia Álvarez:** Resources, Visualization. **Héctor González-Iglesias:** Visualization, Conceptualization. **Imre Lengyel:** Resources, Writing - review & editing. **Rosario Pereiro:** Supervision, Funding acquisition.

### 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 financially supported through project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. A. Lores-Padín and B. Fernández respectively acknowledge the FPU Grant (Ref. MEC2014-14985 through the “Ramón y Cajal Program” (Ministry of Economy and Competitiveness). This research was also supported by a grant from the Belfast Association for the Blind and the “Eye-Risk” European Union’s Horizon 2020 research and innovation program (grant ref.: 634479) (I.L). Tissue for this project was provided by the University College London Institute of Ophthalmology and Moorfields Eye Hospital Eye Tissue Repository supported by National Institute for Health Research funding.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>.

### References

- W.L. Wong, X. Su, X. Li, C.M. Cheung, R. Klein, C.Y. Cheng, T.Y. Wong, Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Glob. Health* 2 (2014) 106–116.
- P. Mitchell, G. Liew, B. Gopinath, T.Y. Wong, Age-related macular degeneration, *Lancet* 392 (2018) 1147–1159.
- S.D. Solomon, K. Lindsley, S.S. Vedula, M.G. Krzystolik, B.S. Hawkins, Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3 (2019) CD005139, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005139.pub4>.
- H. Al-Hussaini, M. Schneiders, P. Lundh, G. Jeffery, Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells, *Exp. Eye Res.* 88 (2009) 610–612.
- C.A. Curcio, J.B. Presley, G. Malek, N.E. Medeiros, D.V. Avery, H.S. Kruth, Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy, *Exp. Eye Res.* 81 (2005) 731–741.
- J.M. Flinn, P. Kakalec, R. Tappero, B. Jones, I. Lengyel, Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration, *Metall* 6 (2014) 1223–1228.
- A.C.S. Tan, M.G. Pilgrim, S. Fearn, S. Bertazzo, E. Tsolaki, A.P. Morrell, C. A. Curcio, Calcified nodules in retinal drusen are associated with disease progression in age-related macular degeneration, *Sci. Transl. Med.* 10 (2018) eaat4544.
- J.W. Crabb, The proteomics of drusen, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4 (2014) a017194.
- R.B. Thompson, V. Refatto, J.G. Bundy, E. Kortvely, J.M. Flinn, A. Lanzirrotti, I. Lengyel, Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 112 (2015) 1565–1570.
- A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6593–6617.
- D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 890–919.
- C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1393–1396.
- 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, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52.
- S.D. Tanner, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, D.R. Bandura, T.C. George, An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications, *Cancer Immunol. Immunother.* 62 (2013) 955–965.
- 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.
- M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558.
- C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8177–8183.
- B. Neumann, S. Hösl, K. Schwab, F. Theuring, N. Jakubowski, Multiplex LA-ICP-MS bio-imaging of brain tissue of a parkinsonian mouse model stained with metal-coded affinity-tagged antibodies and coated with indium-spiked commercial inks as internal standards, *J. Neurosci. Methods* 334 (2020) 108591.
- H.M. McGuire, T.M. Ashhurst (Eds.), *Mass Cytometry: Methods and Protocols*, Springer Nature, 2019.
- Q. Chang, O.I. Ornatsky, I. Siddiqui, A. Loboda, V.I. Baranov, D.W. Hedley, Imaging mass cytometry, *Cytometry* 91A (2017) 160–169.
- L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P.H. Roos, M.W. Linscheid, Comparison of different chelates for lanthanide labelling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA)-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1311–1320.
- M. Tvrdonova, M. Vlcnovska, L.P. Vanickova, V. Kanicky, V. Adam, L. Ascher, N. Jakubowski, M. Vaculovicova, T. Vaculovic, Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 559–564.
- R. González de Vega, D. Clases, M.L. Fernández-Sánchez, N. Eiró, L.O. González, F. J. Vizoso, P.A. Doble, A. Sanz-Medel, MMP-11 as a biomarker for metastatic breast cancer by immunohistochemical-assisted imaging mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 639–646.
- X.-R. Song, H. Goswami, H.-H. Yang, J. Xie, Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications, *Analyst* 141 (2016) 3126–3140.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Alvarez, H. González-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Pereiro, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags, *Microchim. Acta* 185 (2018) 64.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer’s disease, *Talanta* 197 (2019) 413–421.
- E. Valencia, B. Fernández, M. Cruz-Alonso, M. García, H. González-Iglesias, M. T. Fernández-Abedul, R. Pereiro, Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically-enriched silver nanoclusters, *J. Anal. At. Spectrom.* (2020), <https://doi.org/10.1039/C9JA00365G>, Article in Press.
- I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 88–96.
- A. Lores-Padín, M. Cruz-Alonso, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay, *Microchim. Acta* 186 (2019) 705.
- E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim. Acta* 186 (2019) 429.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151.
- Md Nawajes, A. Mandal, R. Ayyagari, Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 4091–4097.
- I.A. Bhutto, T. Baba, C. Merges, V. Juriasinghani, D.S. McLeod, G.A. Luttly, C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration, *Br. J. Ophthalmol.* 95 (2011) 1323–1330.
- S.D. Martin, E. Bodek, L. Geng, S. Schaal, H.J. Kaplan, T.H. Tezel, Complement factor H (CFH) expression in mammalian retinal pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 206.
- M. Zoriy, A. Matuch, T. Spruss, J.S. Becker, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc and platinum in thin sections

- of a kidney from a mouse treated with cis-platin, *Int. J. Mass Spectrom.* 260 (2007) 102–106.
- [36] J.S. Hamilton, E.L. Gorishek, P.M. Mach, D. Sturtevant, M.L. Ladage, N. Suzuki, P. A. Padilla, R. Mittler, K.D. Chapman, G.F. Verbeck, Evaluation of a custom single Peltier-cooled ablation cell for elemental imaging of biological samples in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1030–1033.
- [37] J.S. Becker, A. Matusch, C. Depboylu, J. Dobrowolska, M.V. Zoriy, Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slug-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6074–6080.



# Real matrix-matched standards for quantitative bioimaging of cytosolic proteins in individual cells using metal nanoclusters as immunoprobes-label: A case study using laser ablation ICP-MS detection

Ana Lores-Padín<sup>a</sup>, Beatriz Fernández<sup>a,b,\*</sup>, Montserrat García<sup>b,c</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>b,d</sup>, Rosario Pereiro<sup>a,b,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

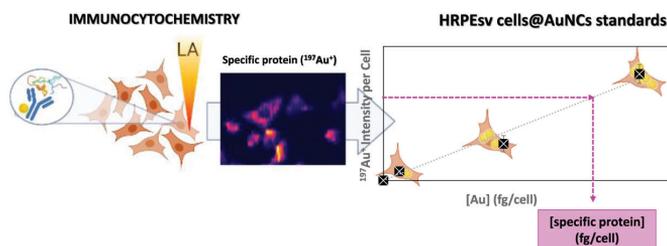
<sup>c</sup> Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012, Oviedo, Spain

<sup>d</sup> Department of Technology and Biotechnology of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Spain

## HIGHLIGHTS

- Quantitative imaging of proteins in individual cells was performed by LA-ICP-MS.
- The matrix-matched calibration standards fully mimic the cultured cells matrix.
- Single-cell laboratory standards based on cells supplemented with AuNCs were used.
- HRPEsv@AuNCs cells standards were characterised by ICP-MS and LA-ICP-MS.
- Au nanoclusters were used as specific antibody labels to develop AuNCs-immunoprobes.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Keywords:

Laser ablation ICP-MS  
Matrix-matched calibration  
Quantitative imaging of proteins  
Metal nanoclusters  
Cytosolic proteins

## ABSTRACT

The persistent lack of adequate matrix-matched reference materials still hinders the quantitative analysis of elements and biomolecules in biological samples by LA-ICP-MS. This fact is especially critical in cell cultures due to their complex matrix. In this work, we propose a novel matrix-matched calibration strategy, which fully mimics the matrix of cultured cells, by using the same cell line of the sample to create laboratory standards. As a model case, the quantitative imaging of two cytosolic proteins (MT2A and APOE) in individual HRPEsv cells was performed by LA-ICP-MS, both in cells subjected to inflammation with cytokine Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and controls (CT). A single biomarker strategy using Au nanoclusters (AuNCs) as specific antibody labels was employed for the analysis of the selected proteins in individual cells by LA-ICP-MS. HRPEsv cells supplemented with suspensions containing nude AuNCs was employed to generate single-cell laboratory standards (HRPEsv cells@AuNCs). The preparation and characterization of the single-cell laboratory standards by both ICP-MS and LA-ICP-MS were optimized as well as the data treatment protocol required for obtaining the quantitative

\* Corresponding author. Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain.

\*\* Corresponding author. Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain.

E-mail addresses: [fernandezbeatriz@uniovi.es](mailto:fernandezbeatriz@uniovi.es) (B. Fernández), [mrpereiro@uniovi.es](mailto:mrpereiro@uniovi.es) (R. Pereiro).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340128>

Received 15 March 2022; Received in revised form 19 May 2022; Accepted 24 June 2022

Available online 27 June 2022

0003-2670/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

distribution of the proteins in individual cells. The mass of APOE and MT2A per cell in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells analysed by LA-ICP-MS using the proposed matrix-matched calibration were successfully corroborated with commercial ELISA kits. In addition, quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) analyses were performed to study the proteins gene expression.

## 1. Introduction

Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) has been widely used for the determination of trace elements as well as metal-based tags in biological fluids [1]. In general, such biological fluids are submitted to a certain treatment prior to ICP-MS analysis and a homogeneous solution is traditionally analysed by conventional nebulization ICP-MS. However, there are certain type of samples where the determination of bulk information is not enough, such as cultured cells. It is well known that cells of the same origin, even under the same physiological conditions or external stimuli, can respond differently, generating cell-to-cell variations [2]. Therefore, there is a need to develop new analytical methodologies that allow not only the identification but also the quantification of target elements and biomolecules at the single cellular level.

Concerning ICP-MS detection, new technological advances, such as single cell (sc) introduction by nebulization, allows cell-to-cell measurements [3]. Nevertheless, subcellular distribution cannot be obtained by sc-ICP-MS and, in addition, risks of non-representative sampling due to size-dependent cellular losses in the transport towards the ICP-MS can take place. Both aspects could be overcome by direct solid sampling with laser ablation (LA) combined to ICP-MS detection [4]. LA-ICP-MS offers interesting capabilities for elemental and isotopic analysis, including high spatial resolution (in the low  $\mu\text{m}$  range) and sensitivity ( $\mu\text{g g}^{-1}$  to  $\text{ng g}^{-1}$ ). Concerning imaging studies, LA-ICP-MS has shown a huge potential for elemental imaging in biological tissues [5]. Additionally, in combination with an immunoassay protocol using elemental-labelled antibodies the imaging of specific proteins can also be achieved [6]. Most of the articles tackled with the imaging of proteins by LA-ICP-MS have been focused onto the proteins distribution along tissue sections. Nevertheless, with the incursion of new technologies (i.e., ultra-fast ablation cells, the use of small laser spot size diameters and new LA-ICP interfaces that enhance the transport of the laser-generated aerosol as well as the sensitivity) studies related to cell cultures have been also addressed by LA-ICP-MS.

Most recently published LA-ICP-MS cellular studies are focused on the distribution of naturally present [7] or supplemented elements [8] as well as the uptake and metabolism of metal-based nanoparticles (MNPs) [9,10]. Additionally, target biomolecules can be detected through metal-labelling strategies. Single lanthanide complexes such as DOTA, polymeric tags containing several lanthanides (i.e., MAXPAR®) and MNPs have been reported for such purpose [6,11]. Noteworthy is the use of LA coupled to CyTOF MS which allows to obtain the simultaneous distribution of dozens of biomolecules by multi-metal-label detection imaging [12].

Nevertheless, the persistent lack of adequate matrix-matched materials still hinders the quantitative analysis of biomolecules in cells by LA-ICP-MS. Several works have recently reported the determination of metals and biomolecules in cells using customized calibration approaches. Drescher et al. [10] proposed the use of nitrocellulose membranes spiked with NPs suspensions for the determination of AuNPs and AgNPs in eukaryotic cells. This strategy was improved by Arakawa et al. [13,14] using micro-array spotter to reduce the size of the dried droplets of NPs suspension for the quantitative AgNPs distribution in 3D spheroids. Also, Wang et al. [15] used dried residues of picodroplets ejected by a commercial inkjet printer for the quantification of internalized AuNPs. Additionally, microarray metal spiked gelatines as standards for Cu quantification [16] or for the determination of membranous receptor (specific labelled with La-chelate) in breast cancer cells was reported by

Vanhackee's group [17]. There are also some works focused on the specific cell membrane biomolecule quantification using peptide-Au clusters as tags and dried metal spiked droplets residues as standards [18–20]. In any case, although the proposed calibration strategies tent to mimic the matrix of individual cells, they do not completely fulfil the characteristics of their complex nature.

In the current work, we propose a novel matrix-matched calibration strategy which fully mimics the complex matrix of cultured cells to perform the quantitative imaging of proteins in individual cells by LA-ICP-MS. As a proof of concept, the sequential determination of two cytosolic proteins (metallothionein 2A and apolipoprotein E; MT2A and APOE) in individual human retinal pigment epithelial immortalized cells (HRPEsv) was pursued by LA-ICP-MS, both in cultured cells subjected to inflammation with the cytokine Interleukin-1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) and controls (CT). Fluorescent Au nanoclusters (AuNCs) were used as specific antibody labels to develop AuNCs-immunoprobes. Aiming to ensure full matrix-matched calibration, HRPEsv cells supplemented with suspensions containing nude AuNCs were prepared to generate single-cell laboratory standards (HRPEsv@AuNCs cells). To corroborate the quantitative results obtained for APOE and MT2A by LA-ICP-MS in HRPEsv cells, commercial ELISA kits were employed, and quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) analyses were performed to study their gene expression.

## 2. Experimental

Details related to the reagents employed for the synthesis and characterization of the AuNCs-immunoprobes, the culture and incubation of HRPEsv cells, the immunocytochemistry (ICC) assays with Alexa® fluorophores, as well as the qPCR and ELISA analyses are collected at **Supplementary Material**. Furthermore, protocols for the synthesis and characterization of AuNCs and AuNCs-immunoprobes are also described at **Supplementary Material**. Fig. 1 shows a workflow of the experimental implemented for the quantitative analysis of APOE and MT2A in HRPEsv cells by LA-ICP-MS.

### 2.1. Experimental methods

#### 2.1.1. HRPEsv cell culture and pro-inflammatory treatment

HRPEsv cells were seeded onto different supports (e.g., flasks, 6-well-plate or chamber slides) at different concentrations ( $6 \cdot 10^4$ – $20 \cdot 10^6$  cells/well) depending on the assay, i.e., ELISA, qPCR, fluorescence, liquid nebulization ICP-MS or LA-ICP-MS. The HRPEsv immortalized cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator using Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEMF12, Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (P/S). Once cells were confluent in each selected support, the medium was changed to CD hybridoma free medium (Gibco) supplemented with 5% L-glutamine and 1% P/S after washing with PBS once. 24 h later, cultured HRPEsv cells were either non-treated (i.e., control cells) or treated with 100 ng mL<sup>-1</sup> of IL1 $\alpha$  (Gold Bio) for 48 h. Subsequently, in order to carry out the ICC assay with the AuNCs-immunoprobes for the target protein analysis by fluorescence or LA-ICP-MS, seeded cells were washed with PBS and fixed, adding 400  $\mu\text{L}$  of 4% paraformaldehyde per well for 10 min at room temperature (RT). Later, after washing with PBS once, the fixed cells were stored in the refrigerator in PBS to prevent possible drying and cell breakage. Specific details regarding HRPEsv cells preparation for ELISA assays and qPCR analyses (in this last case to study APOE and MT2A gene expression) are

collected at **Supplementary Material**.

### 2.1.2. Immunocytochemical assays for APOE and MT2A determination in HRPEsv cells using AuNCs-immunoprobes

ICC assays for the determination of the two selected cytosolic proteins in HRPEsv cells were carried out using a single biomarker strategy by means of sequentially use two AuNCs-immunoprobes (AuNCs:anti-h-APOE and AuNCs:anti-h-MT2A) on both CT and IL1 $\alpha$ -treated cells. Detection of the AuNCs-immunoprobes fluorescence was carried out for the localization of APOE and MT2A in HRPEsv cells, whereas an indirect detection (due to fluorophore Alexa® emission) was used to determine the optimum concentration of the primary antibodies employed in the ICC assay.

The ICC protocol steps followed with HRPEsv cells for MS or fluorescence detection include: (i) Permeabilisation of the cell membranes: 400  $\mu$ L of PBS with 0.1% triton X-100 for 30 min; (ii) Washing (3 times): 400  $\mu$ L of PBS-0.05% tween-20; (iii) Blocking: 400  $\mu$ L PBS with 10% donkey serum and 1% BSA for 1 h of incubation; (iv) Overnight incubation at 4 °C of the AuNCs-immunoprobes (400  $\mu$ L of 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> AuNCs:anti-h-APOE or 400  $\mu$ L of 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> AuNCs:anti-h-MT2A, referring to the antibody concentration) in PBS with 5% donkey serum and 1% BSA; and (v) Washing with 400  $\mu$ L PBS (3 times). In the case of HRPEsv cells analysed by LA-ICP-MS, they were kept in PBS in the chamber slides until the analysis to ensure preservation of cells integrity (PBS was removed just before LA-ICP-MS analysis). The additional steps for fluorescence detection include: (vi) Incubation with secondary antibody (only for indirect detection) Alexa®594:goat antirabbit IgG and Alexa® 488:donkey anti-goat IgG for respectively detecting anti-h-MT2A and anti-h-APOE, for 2 h at RT and in the darkness; (vii) Washing 3 times with PBS; (viii) Nuclei were counterstained by addition of 4',6-diamino phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) stain for 10 min (RT and darkness); (ix) Washing step with PBS; and (x) Addition of a drop of fluorescence mounting medium (Dako, Agilent, USA) and placement of a coverslip over it.

Negative controls (for CT and IL1 $\alpha$ -treated samples) were analysed

by fluorescence microscopy and LA-ICP-MS. Negative immunoassay controls (i.e., without the primary antibody) were prepared for indirect fluorescence analysis to ensure specificity of the secondary antibody. In the case of direct fluorescence (AuNCs-immunoprobes) and LA-ICP-MS measurements, negative controls using AuNCs without the primary antibody were prepared to ensure that nonspecific interactions of AuNCs within the cell are not observed.

### 2.1.3. Preparation of "single-cell laboratory standards": HRPEsv cells@AuNCs

In order to determine the proteins concentration in HRPEsv cells by LA-ICP-MS, HRPEsv cells were also employed to prepare matrix-matched calibration standards. As detailed in the workflow of Fig. 1, HRPEsv cells supplemented with suspensions containing nude AuNCs (HRPEsv cells@AuNCs) were employed as single-cell laboratory standards. For such purpose, HRPEsv cultured cells were prepared in parallel and characterised either by conventional nebulization ICP-MS after mineralization of the cells (average information) or by LA-ICP-MS (single cell). Once the cultured cells were confluent, they were supplemented with different concentrations of nude AuNCs: 0, 5, 25 and 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> in DMEMF12 (10% FBS 1% of P/S) for 24 h (37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator). Higher AuNCs concentrations (up to 350  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) were tested, although they were not employed for quantification.

On one hand, conventional nebulization ICP-MS was employed to determine the average mass of Au per cell in suspensions containing HRPEsv cells@AuNCs, which were collected from the seeding chambers after the AuNCs internalisation process and after washing the medium (3 times with PBS) to remove free AuNCs that may exist in solution and could interfere with the values of gold internalized by the cells. For the quantification of gold, an external calibration with Au (III) liquid standards, was performed by ICP-MS analysis (see experimental conditions in Table S1). The protocols followed with the cells (washing steps, counting with haemocytometer and mineralization) are detailed at **Supplementary Material**.

On the other hand, HRPEsv cells@AuNCs standards were

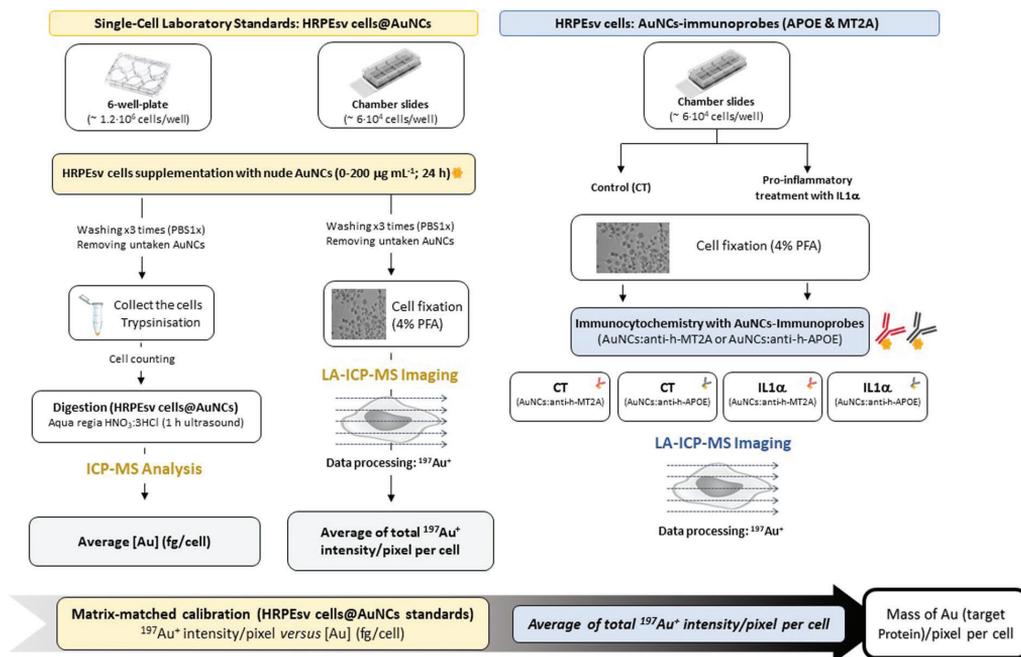


Fig. 1. Workflow of the proposed methodology.

individually analysed by LA-ICP-MS using the optimized experimental conditions shown in Table S1 (same imaging strategy than that used for the analysis of APOE and MT2A in HRPEsv cells). Fixed HRPEsv cells (cultured and treated in the chamber slides) were stored in the refrigerator with a small volume of PBS (200  $\mu\text{L}$ ) to avoid possible drying and cell breakage. Just before the measurement by LA-ICP-MS, the walls of the chamber slide were cautiously removed, and PBS was carefully drained. An average of 30 individual HRPEsv cells@AuNCs were analysed by LA-ICP-MS for each AuNCs concentration used for supplementation. In this case, a 2D-image of  $^{197}\text{Au}^+$  signal for each individual cell was constructed using the Iolite (v4) software.

#### 2.1.4. Imaging of APOE and MT2A proteins in individual HRPEsv cells by LA-ICP-MS

HRPEsv cells after being grown, subjected to IL1 $\alpha$  (or CT) treatment, and fixed with 4% PFA in the chamber slides (as described in Section 2.1.1.) are subjected to the ICC assay using the immunoprobes for the sequential detection of APOE and MT2A. After the ICC assay, HRPEsv were analysed by LA-ICP-MS following the same protocol employed for the analysis of the “single-cell laboratory standards”. In this case,  $^{197}\text{Au}^+$  signal for each individual cell was related to the distribution of a specific protein along the cell. Depending on the AuNCs-immunoprobe employed (AuNCs:anti-h-APOE or AuNCs:anti-h-MT2), APOE or MT2A was detected, both in CT and IL1 $\alpha$ -treated cells. As described above, a 2D-image of  $^{197}\text{Au}^+$  signal for each individual cell was constructed using the Iolite (v4) software.

#### 2.2. Instrumentation

Conventional nebulization ICP-MS analysis (7900 from Agilent) was employed for the determination of the average Au content in the cell suspensions to be used as single-cell laboratory standards. For LA-ICP-MS analysis, the excimer-based laser ablation system NWR193 (Elemental Scientific - ESI) equipped with a two-volume cell (TwoVol2 Ablation Cell, ESI) was coupled to the ICP-MS for the analysis of individual HRPEsv cells (both HRPEsv cells@AuNCs laboratory standards and HRPEsv cells submitted to the ICC assay with the AuNCs-immunoprobes were analysed by LA-ICP-MS) fixed onto the chamber slides. For the high-resolution analysis of specific areas, multiple line scanning mode with a spot size of 6  $\mu\text{m}$  was applied. A laser pulse frequency of 20 Hz and a laser fluence of 0.3  $\text{J cm}^{-2}$  ensured a quantitative ablation (Table S1 depicts the optimized experimental conditions). The  $^{197}\text{Au}^+$  signal was acquired from AuNCs (HRPEsv cells@AuNCs standards) or AuNCs-immunoprobes (HRPEsv cells with the AuNCs-immunoprobe). Data processing (2D-images of  $^{197}\text{Au}^+$  distribution in individual HRPEsv cells, histograms and selection of the cells regions) were performed with Iolite (v4) software. Thermal gradient was chosen as the scale for 2D images and expand by interpolating filter was applied for data treatment.

To study the proteins distribution in HRPEsv cells by fluorescence detection, a laser confocal microscope (DM IRE2; Leica) with a 63 $\times$  oil immersion objective was employed. Images with both lateral (xy axis) and depth (yz or xz axis) resolution were obtained.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimizations of the immunocytochemistry assay with AuNCs-immunoprobes

To develop a target protein quantification strategy in single cells using LA-ICP-MS and antibodies labelled with AuNCs, the characterization of the AuNCs-immunoprobes was performed to determine the amplification factor (i.e., the number of Au atoms labelled per available antibody). Following a strategy previously reported [21], 466 Au atoms on average ( $466 \pm 18$ ) was found as the amplification factor for AuNCs:anti-h-APOE and AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobes (Supplementary

Material collects a description of the procedure).

Optimization of the primary antibodies concentration in both immunoprobes was performed to ensure the total recognition of APOE and MT2A in HRPEsv cells. First, following the dilution range recommended for the antibodies specifications, three serial dilutions of the antibodies stock concentration were independently assayed in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (1  $\text{mg mL}^{-1}$  and 0.23  $\text{mg mL}^{-1}$  were the anti-h-APOE and anti-h-MT2A stock concentrations, respectively). An ICC assay using secondary antibodies labelled with Alexa<sup>®</sup> fluorophore for fluorescence detection was employed for such purpose. Fluorescence measurement of Alexa<sup>®</sup>488 and Alexa<sup>®</sup>594 was performed for anti-h-APOE and anti-h-MT2A antibodies, respectively. As an example, Fig. S1 depicts the fluorescence images obtained for the APOE and MT2A distribution in CT HRPEsv cells. A 1:100 dilution (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for anti-h-APOE (Fig. S1c) and 1:46 dilution (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for anti-h-MT2A (Fig. S1g) were found as optimum for the complete detection of the target cytosolic proteins in HRPEsv cells. A deeper description of the studies related to the selection of antibodies concentration is collected at Supplementary Material.

#### 3.2. Immunolocalization of cytosolic proteins in individual HRPEsv cells by LA-ICP-MS

The use of AuNCs as a single immunoprobe label for the sequential study of APOE and MT2A in HRPEsv cells allowed to determine the qualitative distribution of the two cytosolic proteins by fluorescence microscopy and LA-ICP-MS. Concerning LA-ICP-MS, 2D-images of  $^{197}\text{Au}^+$  signal (i.e., APOE or MT2A distribution depending on the AuNCs-immunoprobe employed) were obtained for CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. In the case of APOE, Fig. 2 collects the 2D-images obtained by LA-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  intensity using AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe (i.e., APOE distribution) in CT (Fig. 2a) and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (Fig. 2c). Additionally, Fig. 2b and d show the merge of the optical image of HRPEsv cells before LA sampling and the  $^{197}\text{Au}^+$  signal to further understand the protein distribution along the cells structure. Intrinsic biological variability and expected cell-to-cell differences contributed to hinder predicting common behaviour in the whole cells population, although some tendencies were observed. APOE was localized throughout the cytoplasm, mainly present in the perinuclear region (e.g., cells #2 and #4 showed a higher level close to the nucleus) and showing almost absent within the nucleus (e.g., cells #1 and #5). Similar qualitative distribution of APOE was found regardless the cells treatment (i.e., CT or IL1 $\alpha$ -treated).

In addition to qualitative 2D-images, histograms for each individual HRPEsv cell analysed by LA-ICP-MS were studied. Histograms allowed to get a better knowledge of the intracellular target cytosolic proteins distribution due to the biological variability or to the effect of pro-inflammatory treatment. They also helped overcome the required adjustment of the intensity scale when several cells were collected in the same image (i.e., scales were adjusted to avoid “burnt” intensity images, but some regions of the cells could be then undetectable in the images). Fig. S2 shows the histogram obtained for two CT and two IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv individual cells (2D-images of the cells are in Fig. 2), representing the number of pixels for each  $^{197}\text{Au}^+$  intensity. As can be seen, (i) A large percentage of the cells area analysed by LA-ICP-MS (i.e., a high number of pixels) presented low  $^{197}\text{Au}^+$  intensity signals, indicating low protein levels, and (ii) A high variability was observed for the maximum  $^{197}\text{Au}^+$  intensity (ranging from 20,000 to 125,000 cps), which can be attributed to intrinsic biological variability of cultured cells, both in CT and IL1 $\alpha$ -treated conditions.

Taking advantage of the bimodal detection that can be achieved with AuNCs-immunoprobes, APOE was also localized in HRPEsv cells by laser confocal microscopy ( $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 650\text{--}750 \text{ nm}$ ). Such measurements confirmed the antibody penetration through the whole cell structure (in-depth fluorescence measurements). Fig. 3a–d show the fluorescence images obtained for APOE distribution following AuNCs

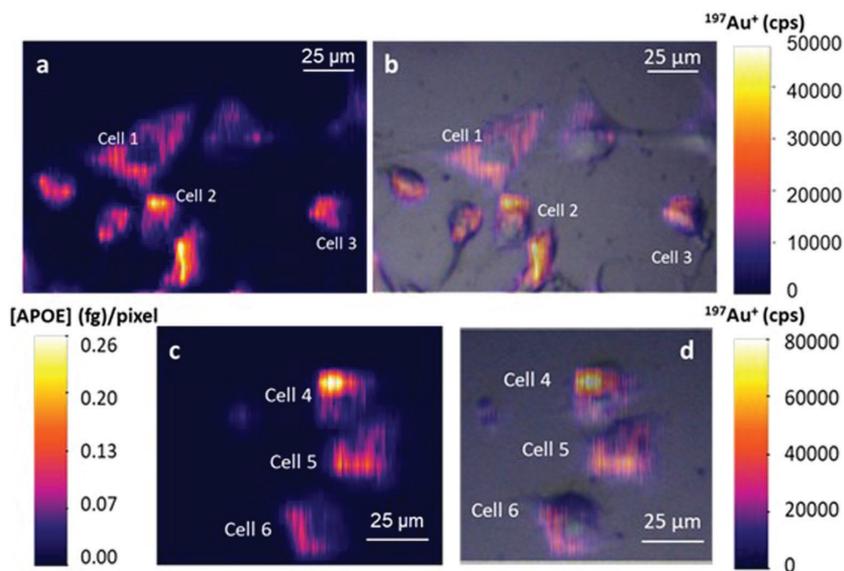


Fig. 2. Qualitative 2D-images obtained by LA-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  signal (cps) using AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe in CT and IL1  $\alpha$ -treated HRPEsv cells. a) APOE distribution in CT cells, b) Merge of  $^{197}\text{Au}^+$  signal and optical image of the CT cells before LA sampling, c) APOE distribution in IL1  $\alpha$ -treated cells, d) Merge of  $^{197}\text{Au}^+$  signal and optical image of the IL1  $\alpha$ -treated cells before LA sampling. In addition to the colour scales following  $^{197}\text{Au}^+$  intensity (cps) per pixel, the quantitative distribution of APOE in cell #4 is indicated in the left scale (expressed as the mass of APOE in fg per pixel). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

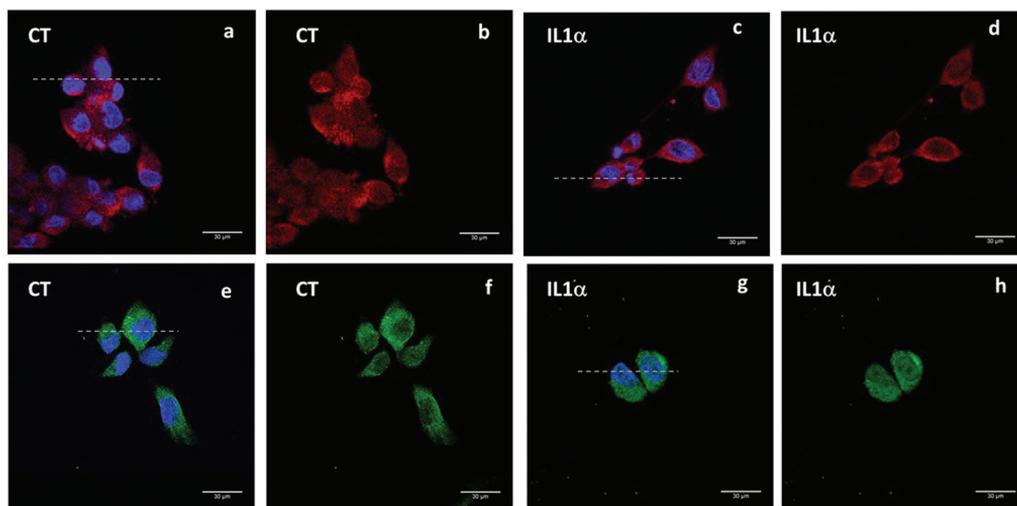


Fig. 3. Fluorescence images obtained by laser confocal microscopy for APOE distribution in CT and IL1  $\alpha$ -treated HRPEsv cells. a & b) CT cells; DAPI (blue) and AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe (APOE distribution in red), c & d) IL1  $\alpha$ -treated cells; DAPI and AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe, e & f) CT cells; DAPI (blue) and secondary antibody Fluor Alexa $^{\text{®}}$ 488 (APOE distribution in green), g & h) IL1  $\alpha$ -treated cells; DAPI and secondary antibody Fluor Alexa $^{\text{®}}$ 488. Note that dotted lines (a, c, e and f) mark the position for the in-depth images of Fig. S3. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

emission for CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells and Fig. 3e–h collect the fluorescence images obtained by the indirect fluoroimmunoassay using Alexa $^{\text{®}}$  488 (for validation purposes). As can be observed, APOE distribution found in HRPEsv cells by LA-ICP-MS for CT and IL1 $\alpha$ -treated cells was in agreement with fluorescence images, both using direct and indirect detection. In addition, in-depth fluorescence measurements (z-axis) using Alexa $^{\text{®}}$  fluorophore confirmed the lower presence of APOE protein within the cell nuclei compared to the high perinuclear and cytoplasmic intensity observed (see Fig. S3). The total penetration of AuNCs-immunoprobe (i.e., anti-h-APOE antibody) inside the cells was

also confirmed by observing fluorescence emission within the whole cell volume. Note that negative controls were always evaluated to ensure nonspecific interactions coming from the primary antibody or the AuNCs (Fig. S4 shows the fluorescence image obtained for AuNCs negative controls in CT and IL1 $\alpha$ -treated cells, demonstrating the absence of nonspecific interactions).

Concerning MT2A, an APOE-like protocol was followed using AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobe. Fig. 4 shows the 2D-images obtained by LA-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  intensity in CT (Fig. 4a) and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (Fig. 4c); Fig. 4b and d show the merge of the

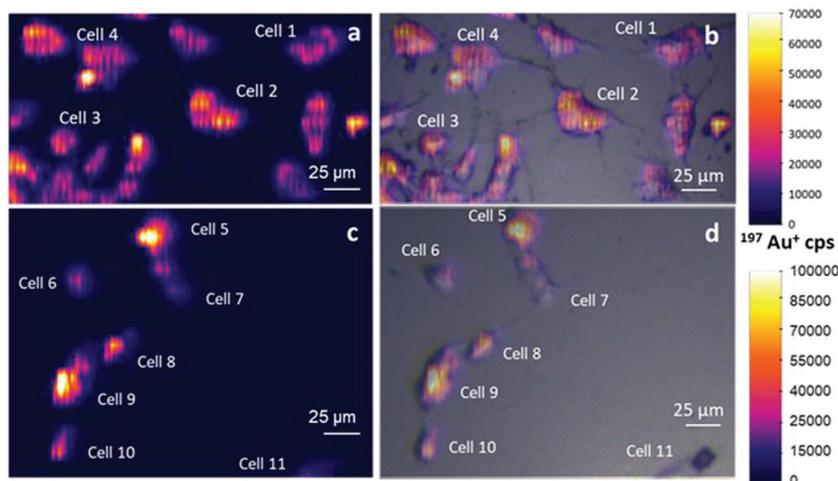


Fig. 4. Qualitative 2D-images obtained by LA-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  signal (cps) using AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobe in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. a) MT2A distribution in CT cells, b) Overlapping of  $^{197}\text{Au}^+$  signal and optical image of the CT cells before LA sampling, c) MT2A distribution in IL1 $\alpha$ -treated cells, b) Overlapping of  $^{197}\text{Au}^+$  signal and optical image of the IL1 $\alpha$ -treated cells before LA sampling.

optical images and the  $^{197}\text{Au}^+$  signal. In contrast to APOE, MT2A was homogeneously distributed within the cytoplasm with a higher presence at nucleus (e.g., cells #2 and #3 in CT and cells #5 and #9 in IL1 $\alpha$ ). Variability of intracellular accumulation of MT2A was high but it agreed with the protein distribution found by fluorescence microscopy (Fig. S1). Additionally, the homogeneous distribution observed for MT2A along the cell as well as the absence of significant changes between CT and IL1 $\alpha$  regarding its localization is consistent with previous studies [22]. Histograms were also studied for MT2A in CT and IL1 $\alpha$ -treated cells (Fig. S5). In this case, MT2A was more homogeneously localized within the whole cell, since a large number of pixels exhibited  $^{197}\text{Au}^+$  signals in the order of 10,000–40,000 cps. For IL1 $\alpha$ -treated cells, a large percentage of the cells area presented low  $^{197}\text{Au}^+$  signals (indicating low protein levels), whereas there were also specific regions of the cells were  $^{197}\text{Au}^+$  signals showed higher signals (up to 125,000 cps), suggesting an accumulation of MT2A (probably attributed to the nucleus region identified in Fig. 4).

### 3.3. HRPEsv cells supplemented with AuNCs as laboratory standards for matrix-matched calibration by LA-ICP-MS

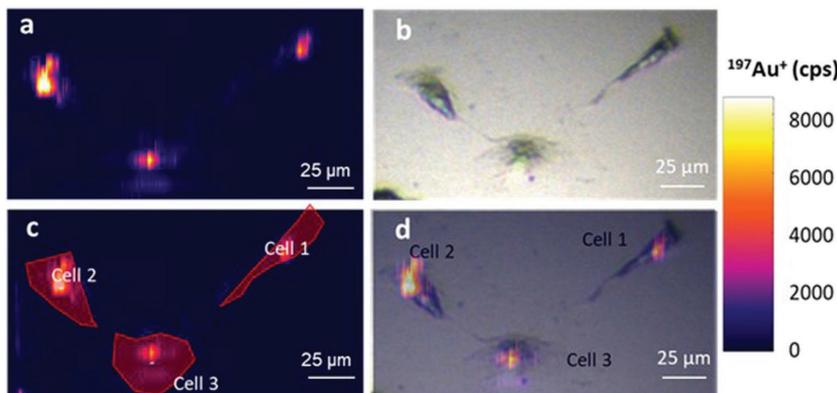
In the present study, the quantitative imaging of APOE and MT2 in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells was pursued. For such purpose, external calibration based on the use of HRPEsv cells supplemented with nude AuNCs as single-cell laboratory standards was proposed. As described in the experimental section and is summarised in Fig. 1, cells were incubated with different concentrations of nude AuNCs and these HRPEsv cells@AuNCs standards were subsequently characterised by conventional nebulization ICP-MS and LA-ICP-MS.

On one hand, conventional nebulization ICP-MS analysis was used to determine the average mass of Au in the cells population for the different AuNCs concentrations added for supplementation. In such way, the Au concentration in HRPEsv cells@AuNCs standards was measured (after counting the cells and its mineralization) using external calibration with Au (III) standard solutions. Different AuNCs concentrations were studied for cells supplementation (up to 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). However, cell viability decreased dramatically after incubation of the cells at high AuNCs concentration (24 h treatment) [23] and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was the maximum amount used for HRPEsv cells@AuNCs standards. As can be seen in Fig. S6, a linear behaviour was observed for the average concentration of

Au found in HRPEsv cells@AuNCs standards (expressed as fg of Au per cell) compared to the AuNCs concentration used for supplementation. Note that it was observed a limit for the AuNCs uptake from the cells; the use of AuNCs concentrations higher than 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gave rise to a plateau in the mass of Au detected in the cells.

On the other hand, HRPEsv cells@AuNCs calibration standards prepared in chamber slides and supplemented with different concentrations of AuNCs concentrations (0, 5, 25, 50, 100 and 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were individually analysed by LA-ICP-MS. In this case, the imaging of the intracellular AuNCs uptake was carried out by LA-ICP-MS measuring 30 cells per condition. For each single cell analysed by LA-ICP-MS, a specific data treatment strategy was developed. As an example, Fig. 5 collects some images for three individual cells from the supplementation with 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AuNCs. Data processing of HRPEsv cells@AuNCs standards were always performed as follows using Iolite (v4) software: i) A 2-D image of  $^{197}\text{Au}^+$  distribution (in cps) was obtained for individual HRPEsv cells by LA-ICP-MS analysis (Fig. 5a); ii) An optical image of each cell (taken just before LA sampling) was used for comparison with the  $^{197}\text{Au}^+$  image (Fig. 5b); iii) The area of each individual cell were specifically marked in the 2-D qualitative image of  $^{197}\text{Au}^+$  (red surface in Fig. 5c), following the cell surface from the optical image. Thus, it was possible to obtain a value of the area of each cell expressed in pixels. In this particular example, 717, 815 and 889 pixels were found for cells #1, #2 and #3, respectively. Note that the area of the cell cannot be directly selected from the  $^{197}\text{Au}^+$  image since there was not a homogeneous distribution of AuNCs in the whole cells surface. iv) The total  $^{197}\text{Au}^+$  intensity for each cell were calculated as the sum of  $^{197}\text{Au}^+$  intensities from the pixels that compose the cell (1.10·10<sup>6</sup> cps, 9.78·10<sup>5</sup> cps and 8.77·10<sup>5</sup> cps for cells #1, #2 and #3, respectively); and iv)  $^{197}\text{Au}^+$  intensity was normalized by the cells size (i.e., the number of pixels which define each cell). In the example collected in Fig. 5 and 1.53·10<sup>3</sup> cps, 1.14·10<sup>3</sup> cps and 9.86·10<sup>2</sup> cps were found as the average  $^{197}\text{Au}^+$  intensity per pixel. HRPEsv cells@AuNCs standards for the different AuNCs supplementation treatments were analysed by LA-ICP-MS and processed following the proposed strategy. Fig. S7 collects the 2D-images obtained for single-cell laboratory standards using 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AuNCs concentration for supplementation.

After the analysis by conventional nebulization ICP-MS and LA-ICP-MS of the single-cell laboratory standards for each AuNCs supplementation condition, and the corresponding data treatment, a calibration



**Fig. 5.** Analysis of HRPEsv cells@AuNCs standards (supplementation of HRPEsv cells with  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  AuNCs, 24 h) by LA-ICP-MS. a) Qualitative 2D-image representing  $^{197}\text{Au}^+$  intensity (cps), b) Optical image of the cells before LA sampling, c) Definition of the area corresponding to each individual marked in red, and d) Overlapping of  $^{197}\text{Au}^+$  signal and optical image of the cells before LA sampling. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

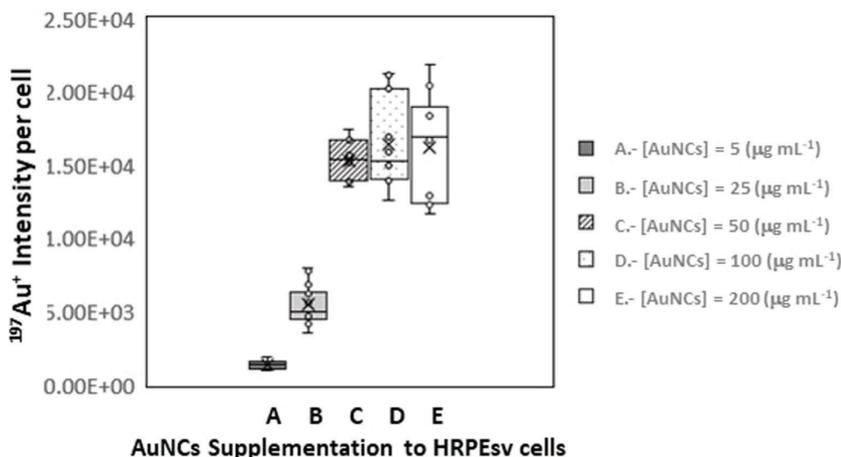
graph was constructed representing the average  $^{197}\text{Au}^+$  intensity per pixel for each cell (determined by LA-ICP-MS analysis) versus the Au concentration of the HRPEsv cell@AuNCs standards (determined by conventional nebulization ICP-MS). Fig. S8 shows the Au calibration graph obtained that was further used for the determination of APOE and MT2A concentration in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. At this point it should be highlighted that both the intrinsic biological variability within the HRPEsv cells culture and the possible differences in the AuNCs uptake contributed to the uncertainty of the measurements, as expected. Fig. 6 depicts the box plot for the average  $^{197}\text{Au}^+$  intensity per cell obtained by LA-ICP-MS for different AuNCs supplementation treatments (in this case  $0\text{--}200 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  AuNCs concentration were represented). Note that uptake of AuNCs increased in a dose-dependent manner up to the cellular saturation observed by the plateau at  $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  and above AuNCs concentrations (upper value employed for quantification purposes). Relative standard deviation values ranged from 9% to 22% (analysis of 30 individual cells per condition).

#### 3.4. Determination of APOE and MT2A concentrations in HRPEsv cells by LA-ICP-MS using single-cell laboratory standards

The proposed quantitative imaging methodology based on the use of

HRPEsv cells@AuNCs standards was applied to sequentially study the APOE and MT2A content in CT and IL1 $\alpha$ -treated cells by LA-ICP-MS. Using the obtained linear regression with the HRPEsv cells@AuNCs standards (Fig. S8) and calculating the total intensity of  $^{197}\text{Au}^+$  per cell in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (following the procedure described for the single-cell laboratory standards), the total mass of Au per cell was determined (at a first step expressed as fg of Au per cell). Next, the total mass of Au per cell was converted into the target protein mass per cell (APOE or MT2A depending on the AuNCs-immunoprobe used) following a protocol previously reported for tissue sections [21, 24].

The APOE mass obtained by LA-ICP-MS for each individual cell of both CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells are collected in Table 1. The Table summarizes the individual values obtained for 22 CT and 11 IL1 $\alpha$ -treated cells analysed with the proposed methodology. It can be seen that the average APOE mass for each condition indicated a decrease on the protein levels from  $27.2 \pm 7.9 \text{ fg of APOE/cell}$  for CT cells to  $16.0 \pm 5.8 \text{ fg of APOE/cell}$  for IL1 $\alpha$ -treated cells (0.58-fold change). Such lessen in the protein levels of HRPEsv cells subjected to the pro-inflammatory treatment with IL1 $\alpha$  was confirmed by qPCR at RNA expression level, where a decreasing about 30% of the gene expression was observed (Fig. S9). Additionally, the mass of APOE determined by



**Fig. 6.** Box and whisker plot representing the average  $^{197}\text{Au}^+$  intensity per cell (determined by LA-ICP-MS analysis) for the different HRPEsv cells@AuNCs standards obtained through the supplementation of HRPEsv cells with different AuNCs concentrations ( $0\text{--}200 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Error bars correspond to the standard deviation calculated for the analysis of 30 individual cells per condition.

**Table 1**

Experimental results obtained for the mass of APOE per cell in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells analysed by LA-ICP-MS using AuNCs-immunoprobe as the elemental label and HRPEsv cells@AuNCs standards for calibration.

	Cell	Total Intensity (cps)	Cell size (pixels)	<sup>197</sup> Au + (Int./pixel)	Au mass (fg/cell)	APOE mass (fg/cell)	APOE mass (fg/cell)
APOE - CT	1	8.19E+06	594	1.38E+04	80.20	29.7	27.2 $\pm$ 7.9
	2	6.56E+06	770	8.52E+03	49.53	18.3	
	3	7.22E+06	543	1.33E+04	77.34	28.6	
	4	1.07E+07	1031	1.04E+04	60.53	22.4	
	5	7.45E+06	587	1.27E+04	73.79	27.3	
	6	1.22E+07	803	1.52E+04	88.51	32.8	
	7	5.64E+06	512	1.10E+04	63.99	23.7	
	8	1.17E+07	606	1.93E+04	112.39	41.6	
	9	7.82E+06	494	1.58E+04	92.04	34.1	
	10	1.04E+07	666	1.56E+04	90.69	33.6	
	11	8.09E+06	640	1.26E+04	73.47	27.2	
	12	1.08E+07	1149	9.38E+03	54.54	20.2	
	13	3.83E+06	424	9.04E+03	52.57	19.5	
	14	3.53E+06	415	8.50E+03	49.42	18.3	
	15	1.34E+07	1732	7.71E+03	44.82	16.6	
	16	6.84E+06	817	8.37E+03	48.66	18.0	
	17	9.05E+06	882	1.03E+04	59.67	22.1	
	18	1.42E+07	1108	1.28E+04	74.32	27.5	
	19	5.52E+06	456	1.21E+04	70.42	26.1	
	20	1.00E+07	542	1.85E+04	107.26	39.7	
	21	2.31E+07	1132	2.04E+04	118.42	43.8	
	22	1.72E+07	1294	1.33E+04	77.12	28.5	
APOE - IL1 $\alpha$	1	5.30E+06	634	8.36E+03	48.63	18.0	16.0 $\pm$ 5.8
	2	5.30E+06	634	8.36E+03	48.63	18.0	
	3	6.07E+06	655	9.27E+03	53.87	19.9	
	4	4.06E+06	726	5.59E+03	32.51	12.0	
	5	7.24E+06	658	1.10E+04	63.96	23.7	
	6	5.09E+06	1104	4.61E+03	26.80	9.9	
	7	6.90E+06	639	1.08E+04	62.77	23.2	
	8	4.83E+06	1460	3.31E+03	19.24	7.1	
	9	5.35E+06	789	6.79E+03	39.45	14.6	
	10	3.53E+06	840	4.21E+03	24.45	9.0	
	11	5.51E+06	568	9.70E+03	56.40	20.9	

LA-ICP-MS using AuNCs-immunoprobe was validated by the determination of APOE concentration using a quantitative ELISA kit. The APOE mass determined by the ELISA was found to be  $17.94 \pm 1.30$  fg APOE/cell for CT cells and  $10.19 \pm 0.53$  fg APOE/cell for IL1 $\alpha$ -treated cells (0.56-fold change). These results were in agreement with the protein content determined by LA-ICP-MS, confirming a lower expression of APOE after the pro-inflammatory stress. Similar results were also reported in a recent study carried out by sc-ICP-MS [25]. It should be highlighted that using the proposed methodology by LA-ICP-MS not only the total mass of protein per cell but also the quantitative distribution of the target protein can be studied. As an example, the APOE distribution expressed as fg of protein per pixel is shown in Fig. 2 (panel c) for cell #4.

MT isoforms play an important role during inflammatory processes and oxidative stress conditions, being widely studied on eye diseases related to oxidative processes [26]. Table S2 shows the mass obtained for MT2A by LA-ICP-MS for CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (individual values for 23 CT and 14 IL1 $\alpha$ -treated cells are collected). As can be observed in the averaged results, the treatment of HRPEsv cells with  $100$  ng mL<sup>-1</sup> of IL1 $\alpha$  during 48 h produced an upregulation of MT2A synthesis in the cells, from  $2.1 \pm 0.9$  fg/cell of MT2A in CT to  $4.6 \pm 1.6$  fg/cell of MT2A in IL1 $\alpha$ -treated cells (2.1-fold change). qPCR analysis confirmed this increase at the gene expression level for MT2A (Fig. S9) and the protein mass obtained using a quantitative ELISA kit was also in agreement with the experimental results obtained by LA-ICP-MS. The MT2A mass determined by the quantitative ELISA kit was  $1.74 \pm 0.28$  fg MT2A/cell for CT and  $3.36 \pm 0.50$  fg MT2A/cell for IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (1.9-fold change), confirming an overexpression of MT2A after the treatment with IL1 $\alpha$ . The same tendency for MT2A (i.e., an overexpression of the protein after the pro-inflammatory treatment) in HRPEsv cells was observed by sc-ICP-MS using AuNCs-immunoprobe [25].

#### 4. Conclusions

In this work, a matrix-matched calibration strategy was successfully developed for the first time with the aim of overcoming the current limitations regarding LA-ICP-MS quantification in cultured cells. In order to fully mimic the complex cell matrix, HRPEsv cells were supplemented with increasing concentrations of suspensions containing nude AuNCs to generate single-cell laboratory standards (HRPEsv cells@AuNCs). A complete characterization of HRPEsv cells@AuNCs standards were carried out by conventional nebulization ICP-MS and LA-ICP-MS, and a data treatment strategy was developed for each single cell analysed by LA-ICP-MS. This strategy allowed the quantitative imaging of protein expression on a cell-to-cell basis, which is really interesting due to the heterogeneity of the cell populations. It should be noted that smaller laser beam sizes than  $6$   $\mu$ m could be carried out in further studies to obtain images of the protein distribution throughout individual cells with a better lateral resolution.

As a proof of concept, the sequential determination of MT2A and APOE in individual HRPEsv cells was carried out by LA-ICP-MS in cells subjected to inflammation with the cytokine Interleukin-1 $\alpha$  and controls. A single biomarker strategy using immunoprobes labelled with fluorescent monodisperse AuNCs ( $1.90 \pm 0.4$  nm) was performed to study the distribution of APOE and MT2A in single cells (about  $30$   $\mu$ m diameter size) with a subcellular resolution. The average results of MT2A and APOE amounts obtained with the proposed methodology were in agreement with the quantitative results obtained by commercial ELISA kits, indicating that APOE levels diminished after the pro-inflammatory treatment whereas MT2A showed an overexpression of the protein after the treatment. It should be stressed that using the proposed methodology by LA-ICP-MS not only the total mass of protein per cell (that will be possible to be achieved by sc-ICP-MS) but also the quantitative distribution of the target protein can be determined.

The average mass of APOE and MT2A per cell found with the proposed strategy is in agreement with the results previously obtained by single cell (sc)-ICP-MS. It should be noted that sc-ICP-MS provides a very fast means for cell-to-cell analysis and, therefore, results could be as representative of the cell culture heterogeneities since thousands of cells can be measured in just a few seconds. However, LA-ICP-MS is well-established as a complementary technique since the cell analysis throughput is much lower, but it allows to obtain the proteins distribution within the cell.

Note that our work opens the way to further studies in cell cultures using LA-ICP-MS and other metal NCs (e. g., Pt, Ir, Pd) to understand the role of biomolecules at cellular level in biological processes. Additionally, the simultaneous determination of different proteins in single cells will be accessible by using different metal NCs together with a time-of-flight mass spectrometer.

### CRedit authorship contribution statement

**Ana Lores-Padín:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Beatriz Fernández:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. **Montserrat García:** Resources, Visualization. **Héctor González-Iglesias:** Visualization, Conceptualization. **Rosario Pereiro:** Supervision, Funding acquisition, Writing – review & editing.

### 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 financially supported through project PID2019-107838RB-I00/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033). A. Lores-Padín acknowledges the FPU Grant (Ref. MEC-D-17-FPU16/01363; Ministry of Education). Authors would like to acknowledge the technical support provided by Servicios Científico-Técnicos of the University of Oviedo.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340128>.

### References

- Calderón-Celis, J. Ruiz-Encinar, A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: update and future perspective, *J. Proteomics* 198 (2019) 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.010>.
- P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells, *Anal. Chem.* 91 (2019) 588–621, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04732>.
- M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: current developments and remaining challenges, *Trends Anal. Chem.* 132 (2020), 116042, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116042>.
- D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 890–919, <https://doi.org/10.1039/C7JA00026J>.
- P.A. Doble, R. Gonzalez-de-Vega, D.P. Bishop, D.J. Hare, D. Clases, Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging in biology, *Chem. Rev.* 121 (2021) 11769–11822, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01219>.
- M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1411-1>.
- T. Büchner, D. Drescher, V. Merk, H. Traub, P. Guttman, S. Werner, N. Jakubowski, K. Schneider, J. Kneipp, Biomolecular environment, quantification, and intracellular interaction of multifunctional magnetic SERS nanoprobe, *Analyst* 141 (2016) 5096–5106, <https://doi.org/10.1039/C6AN00890A>.
- S. Rodríguez-Menéndez, B. Fernández, H. González-Iglesias, M. García, L. Álvarez, J.I. García-Alonso, R. Pereiro, Isotopically enriched tracers and inductively coupled plasma mass spectrometry methodologies to study zinc supplementation in single-cells of retinal pigment epithelium in vitro, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4488–4495, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05256>.
- S. Yamashita, Y. Yoshikuni, H. Obayashi, T. Suzuki, D. Green, T. Hirata, Simultaneous determination of size and position of silver and gold nanoparticles in onion cells using laser ablation-ICP-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4544–4551, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05632>.
- D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, N. Jakubowski, Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9684–9688, <https://doi.org/10.1021/ac302639c>.
- M.G. Mello, M.T. Westerhausen, P. Singh, P.A. Doble, J. Wanagat, D.P. Bishop, Assessing the reproducibility of labelled antibody binding in quantitative multiplexed immuno-mass spectrometry imaging, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 5509–5516, <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03536-9>.
- C. Giesen, H.A.O. Wang, D. Schapiro, N. Zivanovic, A. Jacobs, B. Hattendorf, P. J. Schöffler, 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>.
- A. Arakawa, N. Jakubowski, S. Flemig, G. Koellensperger, M. Ruzs, D. Iwahata, H. Traub, T. Hirata, High-resolution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry used to study transport of metallic nanoparticles through collagen-rich microstructures in fibroblast multicellular spheroids, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 3497–3506, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01827-w>.
- A. Arakawa, N. Jakubowski, G. Koellensperger, S. Theiner, A. Schweikert, S. Flemig, D. Iwahata, H. Traub, T. Hirata, Quantitative imaging of silver nanoparticles and essential elements in thin sections of fibroblast multicellular spheroids by high resolution laser ablation inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10197–10203, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02239>.
- M. Wang, L.N. Zheng, B. Wang, H.Q. Chen, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, H.J. Reid, B. L. Sharp, W.Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10252–10256, <https://doi.org/10.1021/ac502438n>.
- S.J.M. van Malderen, E. Vergucht, M. De Rijcke, C. Janssen, L. Vincze, F. Vanhaecke, Quantitative determination and subcellular imaging of Cu in single cells via laser ablation-ICP-mass spectrometry using high-density microarray gelatin standards, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5783–5789, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00334>.
- T. Van Acker, T. Buckle, S.J.M. Van Malderen, D.M. Van Willigen, V. Van Unen, F. W.B. Van Leeuwen, F. Vanhaecke, High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers, *Anal. Chim. Acta* 1074 (2019) 43–53, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.064>.
- J. Zhai, Y. Wang, C. Xu, L. Zheng, M. Wang, W. Feng, L. Gao, L. Zhao, R. Liu, F. Gao, Y. Zhao, Z. Chai, X. Gao, Facile approach to observe and quantify the αIIbβ3 integrin on a single-cell, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2546–2549, <https://doi.org/10.1021/ac504639u>.
- J. Zhai, L. Zhao, L. Zheng, F. Gao, L. Gao, R. Liu, Y. Wang, X. Gao, Peptide–Au cluster probe: precisely detecting epidermal growth factor receptor of three tumor cell lines at a single-cell level, *ACS Omega* 2 (2017) 276–282, <https://doi.org/10.1021/acsomega.6b00390>.
- X. Zhang, R. Liu, Q. Shu, Q. Yuan, G. Xing, X. Gao, Quantitative analysis of multiple proteins of different invasive tumor cell lines at the same single-cell level, *Small* 14 (2018), 1703684, <https://doi.org/10.1002/sml.201703684>.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernández, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by LA-ICP-MS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03124>.
- S. Rodríguez-Menéndez, M. García, B. Fernández, L. Álvarez, A. Fernández-Vega-Cueto, M. Coca-Prados, R. Pereiro, H. González-Iglesias, The zinc-metallothionein redox system reduces oxidative stress in retinal pigment epithelial cells, *Nutrients* 10 (2018) 1874, <https://doi.org/10.3390/nu10121874>.
- X. Cai, H.H. Chen, C.L. Wang, S.T. Chen, S.F. Lai, C.C. Chien, Y.Y. Chen, I. M. Kempson, Y. Hwu, C.S. Yang, G. Margaritondo, Imaging the cellular uptake of tiopronin-modified gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 809–816, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4986-3>.
- A. Lores-Padín, B. Fernández, L. Álvarez, H. González-Iglesias, I. Lengyel, R. Pereiro, Multiplex biomaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation - inductively coupled plasma - mass spectrometry using metal nanoclusters as labels, *Talanta* 221 (2021), 121489, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>.
- A. Lores-Padín, E. Mavrikis, B. Fernandez, M. García, H. Gonzalez-Iglesias, R. Pereiro, S.A. Pergantis, Gold nanoclusters as elemental label for the sequential quantification of apolipoprotein E and metallothionein 2A in individual human cells of the retinal pigment epithelium using single cell-ICP-MS, *Anal. Chim. Acta* 1203 (2022), 33970, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.33970>.
- A. Álvarez-Barrios, L. Álvarez, M. García, E. Artime, R. Pereiro, H. González-Iglesias, Antioxidant defenses in the human eye: a focus on metallothioneins, *Antioxidants* 11 (2021) 11–89, <https://doi.org/10.3390/antiox11010089>.





# Gold nanoclusters as elemental label for the sequential quantification of apolipoprotein E and metallothionein 2A in individual human cells of the retinal pigment epithelium using single cell-ICP-MS

Ana Lores-Padín<sup>a</sup>, Emmanouil Mavrakis<sup>b</sup>, Beatriz Fernández<sup>a, d, \*</sup>, Montserrat García<sup>d, e</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>a, c, d</sup>, Rosario Pereiro<sup>a, d</sup>, Spiros A. Pergantis<sup>b, \*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Voutes Campus, Heraklion, 70013, Greece

<sup>c</sup> Department of Technology and Biotechnology of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Spain

<sup>d</sup> Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

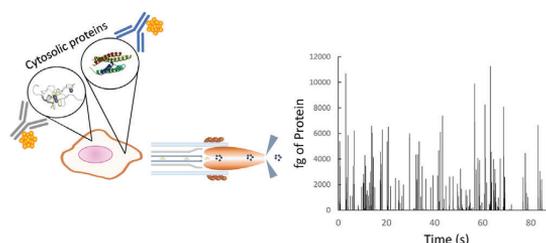
<sup>e</sup> Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012, Oviedo, Spain



## HIGHLIGHTS

- AuNCs were used as label for determination of cytosolic proteins in sc-ICP-MS.
- APOE and MT2A were compared in cells under pro-inflammatory and control conditions.
- Fe was measured to check the integrity of the cells after the immunoassay.
- APOE and MT2A amounts were corroborated with commercial ELISA kits.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 December 2021

Received in revised form

1 March 2022

Accepted 7 March 2022

Available online 9 March 2022

### Keywords:

Metal nanoclusters

Antibody labelling

Cytosolic proteins

Biomolecule quantification

Single cell-ICP-MS

## ABSTRACT

Gold nanoclusters (AuNCs) with a diameter of 1.99 nm on average were synthesized and applied as labels in immunoprobes for the determination of cytosolic proteins in individual human retinal pigment epithelium (HRPEsv) cells by single cell – inductively coupled plasma – mass spectrometry (sc-ICP-MS). For quantitative purposes, the number of gold atoms per immunoprobe (i.e., the amplification factor) was determined; 466 gold atoms on average were obtained. Human metallothioneins (MT), including the 2A isoform (MT2A), and apolipoprotein E (APOE) play an important role under inflammation and oxidation processes in the RPE. The new single biomarker strategy introduced was applied to the sequential determination of MT2A and APOE in HRPEsv cells under pro-inflammatory and control conditions through the development of immunoassays with the corresponding AuNCs immunoprobes and the measurement of the  $^{197}\text{Au}^+$  signal by sc-ICP-MS. In addition,  $^{56}\text{Fe}^+$  signal was measured as constituent element of HRPEsv cells in order to check the integrity of the cells after the immunoassay and to confirm the number of cell events detected when monitoring the protein label ( $^{197}\text{Au}^+$ ). Optimisation of parameters related with the sample preparation for the analysis of cytosolic proteins in intact HRPEsv cells

\* Corresponding author. Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain.

\*\* Corresponding author. Environmental Chemical Processes Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, Voutes Campus, Heraklion, 70013, Greece.

E-mail addresses: [fernandezbeatriz@uniovi.es](mailto:fernandezbeatriz@uniovi.es) (B. Fernández), [spergantis@uoc.gr](mailto:spergantis@uoc.gr) (S.A. Pergantis).

was carried out. The method was successfully applied to the determination of both proteins in control cells and cells treated with the recombinant human interleukin-1 $\alpha$ . Quantitative results obtained per cell for the average protein amounts of APOE and MT2A using the sc-ICP-MS procedure were corroborated with commercial ELISA kits.

© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of irreversible blindness and visual disability in developed countries, is characterised by the accumulation of extracellular deposits (known as drusen), along with progressive damage of retina tissues inducing photoreceptor atrophy [1]. The retinal pigment epithelium (RPE) constitutes the outermost layer of the retina and has many important functions in the homeostasis of the eye to maintain visual function. However, this monolayer of cells is constantly subjected to high levels of oxidative stress, which may trigger a vicious cycle of chronic inflammatory response and consequent development of AMD disease [1]. In this context, human metallothioneins (MT), including the 2A isoform (MT2A), play an important role in Zn buffering and muffling, as a reactive oxygen species chelator or as an inhibitor of pro-inflammatory cytokine activation, which are released under oxidative stress processes [2]. Additionally, the functions of apolipoprotein E (APOE), one of the most abundant proteins accumulated in drusen, are also highly modulated under inflammation and oxidation processes [3]. Thus, inflammatory cytokines can either up- or down-regulate the synthesis of APOE or MTs in tissues [4,5]. The study of dual but antagonistic effects of pro-inflammatory cytokines in protein synthesis in RPE cells may provide valuable information about altered molecular pathways during inflammatory stress and contribute to the knowledge of AMD disease.

Heterogeneity of cell populations is well-known in all biological systems. In fact, cells from the same cell type, even under equal physiological conditions or external stimuli, may differ in the level of biomolecule expression. However, it can be difficult to assess and correctly interpret possible differences between cell populations, unless biological systems are investigated on a cell-by-cell basis [6]. Therefore, there is a need for innovative analytical techniques that allow for the analysis of individual cells, as well as quantitation of their molecules and elemental content.

Single cell inductively coupled plasma - mass spectrometry (sc-ICP-MS) has demonstrated a huge potential for the determination of elemental compositions in individual cells [7,8]. Nowadays, sc-ICP-MS has proved to be a versatile tool for studies on the determination of naturally occurring metals within the cells [9,10], the cellular uptake of metal and metalloid components [11–14], as well as the cellular uptake of metal-containing nanoparticles (NPs) [15,16].

The quantification of endogenous cellular proteins by sc-ICP-MS still remains a challenge. In this case it is necessary to perform an immunoassay in suspended cells by using an immunoprobe conjugated with an elemental label for detection. However, this step can compromise cells integrity. So far, a limited number of studies have reported on the combination of an immunoprobe and sc-ICP-MS for protein analysis [17–21]. Furthermore, the applications related to quantitative protein analysis are very scarce, and in all cases the target biomolecule is a membrane biomarker [17,20,21]. For protein determination, the amplification factor (i.e., the number of elemental labels per immunoprobe) must be known, thus requiring the use of a well characterised immunoprobe. For

example, the quantification of a breast cancer cell membrane biomarker in two human cell lines was reported using a Nd-labelled antibody (MAXPAR® label with 21 Nd atoms per immunoprobe) [17]. In a similar fashion using Lu-labelled MAXPAR®, the targeting of HER2 (breast biomarker) in mixtures of human cell lines was performed [20]. In addition, Liu et al. [21] reported the use of an aminofluorescein-DOTA-Nd bimodal detection label (by MS and near infrared, NIR) for the identification and determination of prostate-specific membrane antigen in circulating tumour cells. At this point, it should be also noted that the technology called as mass cytometry allows detection of several biomolecules (up to 40 cellular parameters) at single-cell resolution [22,23], using a time of flight mass spectrometer (TOFMS).

Increasing the amplification provided by the elemental labels is a critical need especially for the quantification of low abundance proteins by sc-ICP-MS. Therefore, the use of nanostructures providing a larger number of elemental labels per immunoprobe has emerged. For example, virus-like NPs have been shown to provide significant signal amplification [24]. However, relatively big NPs can block the recognition sites of the immunoprobe. As an alternative, metal nanoclusters (NCs) have been recently proposed as elemental labels in ICP-MS detection due to their small metal core size (below 3 nm), along with the resulting high amplification factor they provide (NCs are composed of hundreds of metal atoms) [25]. Several types of metal NCs (e.g., AgNCs [26] and PtNCs [27]) have been successfully employed for the determination of proteins in biological fluids by ICP-MS, as well as in tissue sections by laser ablation ICP-MS [28,29].

In the current work, a single biomarker strategy using AuNCs as elemental labels for the sequential determination of cytosolic proteins in individual human RPE cells (HRPEsv) by sc-ICP-MS is investigated for the first time. The proposed methodology is based on immunoassay performed in a cell suspension by using AuNCs conjugated to protein-specific antibodies for the sequential determination of the cytosolic proteins APOE and MT2A in HRPEsv cells under pro-inflammatory and control conditions. The Au to antibody stoichiometry in the Au-labelled immunoprobes was determined in order to provide quantitative determination of the aforementioned proteins in HRPEsv cells. Furthermore,  $^{56}\text{Fe}^+$  intensity signal was measured as constituent element of HRPEsv cells, assisting to check the integrity of the cells after the immunoassay in suspension and also to confirm the number of cell events detected when monitoring the protein label ( $^{197}\text{Au}^+$ ). Importantly, our strategy makes it possible to quantify the expression levels of cytosolic proteins on a cell-by-cell basis under the same stimulus, providing insight into biological heterogeneity. Results obtained per cell for the average protein amounts of APOE and MT2A using the developed procedure were corroborated with commercial ELISA kits.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and materials

#### 2.1.1. AuNCs synthesis

Water dispersible AuNCs were synthesized using  $\text{AuCl}_4\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$

(99% powder; Sigma-Aldrich), lipoic acid (>98% powder; Across Organics) and  $\text{NaBH}_4$  (98% powder, Sigma Aldrich) as the metal salt precursor, stabilising ligand and the reductant, respectively. Other reagents and solvents were also employed during the sample preparation protocols: NaOH (Sigma-Aldrich) to adjust the water solution's pH in order to help with ligand solubilisation and propan-2-ol (Fisher Scientific) to prepare the reductant solution.

### 2.1.2. Synthesis and purification of the AuNCs immunoprobes

To bind the AuNCs with specific primary antibodies, the carbodiimide strategy was selected. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide (EDC) (98% powder; Across Organics) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (>98% powder; Sigma-Aldrich) were the reagents employed for such a purpose. Goat polyclonal anti-human apolipoprotein E (anti-h-APOE) (Fisher Scientific) and rabbit polyclonal anti-human metallothionein 2A (anti-h-MT2A) (Cloud Clone Corporation) were the primary antibodies employed for the immunoprobes. The synthesis and characterisation of the Au-labelled immunoprobes (AuNCs:anti-h-APOE and AuNCs:anti-h-MT2A) was performed following a protocol similar to that previously reported [27,28]. For the purification of the AuNCs and the AuNCs labelled immunoprobes, 3 and 100 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units (Merck Millipore) were used respectively.

Deionised ultrapure water, resistivity 18.2 M $\Omega$  cm, (Purelab Flex 3&4; ELGA-Veolia) was used throughout, as well as  $\text{HNO}_3$  (67–69%, trace analysis; VWR chemicals) to prepare solutions before conventional ICP-MS measurements.

### 2.1.3. Cell line and culture conditions

The cell line used was the human immortalised RPEsv40 (HRPEsv) [30]. For the growing and preparation of the cell suspension, two culture media and several supplementations were used. At first, during the growing and expansion of the cell line, Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12 (DMEMF12) (Sigma Aldrich), supplemented with 1% (v/v) penicillin/streptomycin (P/S) and 10% (v/v) fetal bovine serum, qualified, heat inactivated (FBSi) (both purchased in Gibco™ Thermo Scientific) was used. Once cells were confluent, the medium was changed to hybridoma serum free (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), supplemented with *L*-glutamine (Thermo Fisher Scientific) and P/S. For HRPEsv cells treated with the pro-inflammatory stressor, the recombinant human interleukin-1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ , Gold Bio) was employed. Afterwards, 0.25% trypsin-EDTA (Gibco™, Thermo Fisher) and 4% paraformaldehyde (PFA) from VWR chemicals were used to remove adherent cells and collect them from the seeding flasks, as well as to perform the cell fixation, respectively. Cells pellets were stored into the fridge at 4 °C in phosphate-buffered saline (PBS) 1x (pH 7.4) until further use. All the material and reagents used were autoclaved.

### 2.1.4. Immunoassay in cell suspension

To perform the immunoassay in cell suspension, apart from the Au-labelled immunoprobes, several reagents were employed: Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for cell membrane permeabilisation, bovine serum albumin (BSA) (99% powder, Merck) and donkey serum (Sigma-Aldrich) to block non-specific interactions. Washing steps were carried out with 10 mM PBS, pH 7.4 (Sigma Aldrich) and surfactant tween 20 (Sigma-Aldrich). Additionally, 4% paraformaldehyde (PFA) solution (Sigma Aldrich) was used for the cell fixation.

### 2.1.5. Solution and suspension preparation for single-cell ICP-MS

For single-cell analysis, cells were suspended in a buffer composed of 50 mM Trizma base (primary standard and buffer

>99.9% crystalline; Sigma Aldrich) and 17 mM NaCl (Sigma Aldrich), while pH was adjusted to 7.4 with diluted HCl (VWR chemicals). The sample transport efficiency of the ICP-MS introduction system was calculated using 60 nm BPEI-coated AgNPs (NanoComposix). The calibration curve for Au quantification was established using dissolved Au standards (7% HCl, Supelco, 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ICP standard, Merck-Millipore).

### 2.1.6. ELISA kits for MT2A and APOE quantitative determination

Two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits from Cloud-Clone Corporation were employed for the determination of APOE (SEA704Hu 96 Tests) and MT2A (SEB868Hu 96 Tests) protein concentrations in the HRPEsv cells (both in control cells and cells treated with IL1 $\alpha$ ). For the extraction of the cytosolic content, cells were centrifuged, re-suspended in a buffer solution of Tris-HCl at pH 7.4 (Sigma Aldrich) and lysed using the ultrasound probe (Bandelin sonoplus HD2070). The cell lysate was then centrifuged (15,700 g, 30 min at 4 °C) and the supernatant (i.e., the cytosolic fraction) was collected for protein quantification with ELISA kits.

## 2.2. Instrumentation

NexION 350 X ICP-MS (PerkinElmer) was used to detect  $^{197}\text{Au}^+$  and  $^{56}\text{Fe}^+$  intensity signals in individual HRPEsv cells. The sample introduction system consists of a high-efficiency nebuliser (HEN) from Meinhard, which was fitted into the Asperon<sup>R</sup> spray chamber (PerkinElmer). Sample introduction was carried out in self-aspiration mode at the determined sample introduction rate of 40  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Data processing following sc-ICP-MS analysis was performed manually based on an iterative algorithm using Microsoft Excel software, enabling the discrimination of cell events from the background signal, which was attributed to the dissolved metal species. Data presentation (i.e., charts, histograms and cell event profiles) was also carried out using Microsoft Excel.

For cell counting, a Neubauer haemocytometer (Sigma Aldrich) plate was used under an optical microscope (Inverted Microscope Leica DM IL LED, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at 10-fold magnification. ELISA measurements were carried out with the spectrophotometer PerkinElmer 2030 Multilabel reader VICTOR™ X5.

## 2.3. Experimental methods

### 2.3.1. Synthesis and characterisation of monodisperse AuNCs and AuNCs immunoprobes

The protocol for the synthesis of AuNCs has been previously reported [31]. Briefly, the protocol is described as follows: 200  $\mu\text{L}$  of 50 mM  $\text{NaAuCl}_4$  were added into a cylindrical flask, along with an aqueous solution of lipoic acid (0.035 g in 20 mL of water) adjusted at pH 8 (adjusted by adding 50  $\mu\text{L}$  of 2 M NaOH). After mixing the metal precursor and the capping ligand,  $\text{NaBH}_4$  (400  $\mu\text{L}$  of 50 mM in propanol solvent) was added dropwise into the solution, and the mixture was left for 4 h at room temperature under continuous stirring. The AuNCs were then subjected to an aging post-treatment (50 °C for 2 h) to improve NCs monodispersity [32]. The average diameter of AuNCs determined by high resolution transmission electron microscopy was  $1.99 \pm 0.04$  nm.

Once the AuNCs were purified by ultracentrifugation, they were bioconjugated to the protein-specific antibodies (anti-h-APOE and anti-h-MT2A). For this purpose, the carbodiimide strategy was used and a protocol similar to that described in the literature was followed [27,29]. Isolation of labelled immunoprobe from the nude AuNCs was also carried out by proper ultracentrifugation. Procedures are briefly described in the Supplementary Material.

To determine the Au-to-antibody stoichiometry in the

immunoprobe, the quantification of the available antibody and the Au concentration in the Au-labelled immunoprobe was required. Thus, a similar procedure to the previously described by Cruz-Alonso et al. [29] was performed for the AuNCs:anti-h-APOE and AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobes. A quantitative direct ELISA with an IgG standard was carried out to determine the available concentration of antibody in the Au-labelled immunoprobe solution followed by conventional ICP-MS analysis to determine the Au concentration. The ratio of these two quantities defined the stoichiometry of Au-to-antibody in the immunoprobes.

### 2.3.2. HRPEsv cell treatment

The HRPEsv immortalized cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator using DMEMF12 complete medium supplemented with 10% FBSi and 1% of P/S. Once cells achieved 80% of confluence, they were washed with PBS 1x and their medium was changed to hybridoma free serum supplemented with 5% L-glutamine and 1% P/S. Twenty-four hours later, cultured HRPEsv cells were either non-treated (i.e., control cells only with hybridoma medium) or treated with the pro-inflammatory cytokine IL1 $\alpha$  (100 ng mL<sup>-1</sup>) for 48 h, according to previous publications [4]. Subsequently, cultured cells were trypsinized by incubation (37 °C in 5% CO<sub>2</sub>) with 3 mL per flask of 0.25% trypsin-EDTA for 3 min. Later, 10 mL per flask of DMENF12 were added to stop the trypsin activity and the cells were collected into different falcon tubes to obtain the cellular pellet from the supernatant by mild centrifugation (3 min at 100 g). Finally, to remove possible dead cells that remained in the medium, cells were washed once with PBS and collected to obtain the cell suspension. This sample preparation procedure was followed both for cell samples subjected to ELISA assays and for those prepared for analysis with sc-ICP-MS. Fig. S1 (Supplementary Material) shows a schematic diagram of the experimental implemented for the preparation of HRPEsv cells for analysis with sc-ICP-MS.

Afterwards, the number of cells in the suspension was determined under the microscope using a Neubauer haemocytometer chamber. Cells at a concentration of 1.2–1.5 · 10<sup>6</sup> (final concentration after fixation ~1 · 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup>) were carefully separated in different Eppendorf tubes where fixation procedure took place, both for control and IL1 $\alpha$  treated cells. Two protocols were evaluated for the fixation of cell cultures before the immunoassay with the AuNCs immunoprobes, denoted as traditional [17] and "mild fixation" conditions. The steps included in both procedures are collected in Table 1. Cells were stored at 4° in the fridge in PBS 1x until further use. The cells morphology was examined with a bright field microscope after every single experimental step to visually ensure the integrity of the cells.

Each of the two target proteins were analysed in three biological replicates for control (CT) and IL1 $\alpha$ -treated cells. In addition, two negative controls were prepared, one for the control cells and

another for the IL1 $\alpha$ -treated cells. Such negative controls were subjected to the immunoassay protocol, but the AuNCs immunoprobes were not added. <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> and <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> intensity signals were detected by sc-ICP-MS for CT and IL1 $\alpha$  HRPEsv cells, whereas only <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> was monitored for the negative controls (neg-CT and neg-IL1 $\alpha$ ).

### 2.3.3. Immunoassay with cells suspension

The immunoassay with the two Au-labelled immunoprobes was independently performed with the CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells in suspension at a concentration of 1 · 10<sup>6</sup> fixed cells. All steps were carried out at room temperature and they are described as follows: (i) Permeabilisation of the membranes with a surfactant: 500  $\mu$ L of PBS 1x with 0.1% Triton X-100 for 15 min; (ii) Washing: 500  $\mu$ L of PBS 1x-0.05% tween-20 and spin at 100 g; (iii) Blocking: 500  $\mu$ L PBS 1x with 10% donkey serum and 1% BSA for 30 min of incubation; (iv) Incubation with the AuNCs immunoprobes: 200  $\mu$ L of AuNCs:anti-h-MT2A or AuNCs:anti-h-APOE in PBS 1x with 5% donkey serum and 1% BSA of AuNCs:anti-h-MT2A or AuNCs:anti-h-APOE were respectively added to the cells in suspension; and (v) Washing with 500  $\mu$ L PBS 1x. This last stage was carefully evaluated since an incorrect washing could generate either undesirable signal events or an increase of the background during sc-ICP-MS analysis.

### 2.3.4. sc-ICP-MS analysis in individual cells and data processing

Upon 1 h incubation with the Au-labelled immunoprobes, the cell pellets were re-suspended in 50 mM Trizma and 17 mM NaCl (pH 7.4) and diluted to a final cell concentration of 1 · 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>. The cell suspension samples were introduced into the ICP-MS through the HEN nebuliser which was operated in self-aspiration mode at 40  $\mu$ L min<sup>-1</sup> sample introduction rate. During the analytical run, the cell suspension was subjected to a soft and continuous shaking on a vortex apparatus.

ICP-MS was operated in time-resolved analysis mode. Experimental parameters set are presented in Table 2. For the data treatment after sc-ICP-MS analysis, an established iterative procedure was performed to discriminate the cell events from the background [33]. Such strategy is based on averaging the entire data set and collecting all data points that are three or five standard deviations (3 $\sigma$  or 5 $\sigma$ ) 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 threshold. Two different criteria were applied for a correct data treatment: 5 $\sigma$  threshold for <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and 3 $\sigma$  for <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup>, as discussed in the Results and Discussion section.

Additionally, to determine APOE and MT2A amount per individual cell from sc-ICP-MS data, different steps must be followed, which involve: (i) Filtering the cell events from the ionic background (ionic <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> from AuNCs immunoprobes); (ii) Converting

**Table 1**

Comparison between the conditions employed to perform the fixation process of the HRPEsv cells with the traditional and mild procedures.

	Traditional fixation	Mild fixation
Steps of the fixation protocol	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Spin off all the PBS 1x (dry cellular pellet)</li> <li>2. Add 500 <math>\mu</math>L of 4% PFA directly on the cells pellet</li> <li>3. Incubation at room temperature (10 min)</li> <li>4. Spin off the 4% PFA (smooth centrifugation)</li> <li>5. Washing with PBS 1x (once)</li> <li>6. Spin off and remove the PBS 1x with the damage cells</li> <li>7. Add 1 mL of PBS 1x for storage</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Add 250 <math>\mu</math>L of 4% PFA into the cell suspension (collected in 250 <math>\mu</math>L PBS 1x, not dry cellular pellet)</li> <li>2. Incubation at room temperature (10 min)</li> <li>3. Spin off the liquid (smooth centrifugation)</li> <li>4. Add other 250 <math>\mu</math>L of 4% PFA on the cell pellet</li> <li>5. Incubation at RT (10 min)</li> <li>6. Spin off and remove PFA</li> <li>7. Washing with PBS 1x (once)</li> <li>8. Spin off and remove the PBS and damage cells</li> <li>9. Add 1 mL of PBS 1x for storage</li> </ol>

Final step: Cell counting to check the cells number and storage of cell suspensions (cells in PBS 1x) in the fridge (4 °C) until further use.

**Table 2**  
Operating conditions for sc-ICP-MS measurements of CT and IL1 $\alpha$  treated HRPEsv cells.

Parameter	Values
ICP RF power (W)	1400
Plasma gas flow (mL·min <sup>-1</sup> )	18
Make up gas flow (mL·min <sup>-1</sup> )	0.6
Nebulizer gas flow (mL·min <sup>-1</sup> )	0.3
Isotopes (m/z)	<sup>197</sup> Au <sup>+</sup> , <sup>56</sup> Fe <sup>+</sup> (collision cell, KED)
He gas flow (KED) (mL·min <sup>-1</sup> )	4
Dwell time (ms)	10

the <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> intensity cell detection signals to mass of Au per cell; and (iii) Calculating the absolute amount of protein per cell from the pre-determined Au-to-antibody stoichiometry. More specifically, for the determination of the absolute mass of Au per cell event, the intensity of <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> acquired per cell event must be transformed to absolute mass of Au. For such purpose, an external calibration using Au liquid standards for ICP-MS (0–50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was employed and the following relationship was established [7,8,34]: where  $m_c$  is the mass of Au,  $F$  is the sample flow rate,  $t$  is the dwell time,  $Int$  is the net event intensity,  $b$  is the slope of the calibration curve and  $\eta$  is the transport efficiency. To determine the transport efficiency, a suspension of a known concentration of commercial 60 nm AgNPs nanoparticles was measured (50  $\text{ng L}^{-1}$ ) [35].

Finally, to transform the amount of Au into the corresponding protein mass (APOE and MT2A) it was followed a similar methodology to that previously reported for tissue sections [28]. For such purpose, the number of Au atoms per immunoprobe (466 atoms on average) as well as the molecular mass of each protein (6 kDa for MT2A and 34 kDa for APOE) must be considered.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sample preparation for the analysis of cytosolic proteins in intact HRPEsv cells by sc-ICP-MS

##### 3.1.1. Monitoring <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> in individual HRPEsv cells.

Maintaining cell integrity while achieving maximum cell transport efficiency to the ICP is of critical importance in sc-ICP-MS. The use of a sample introduction system that triggers breakage of cells during nebulisation and transport would generate not only low transport efficiencies, but also high background signals (resulted from the liberation and solubilisation of the elements present inside the cells, as well as mixing of fragments from different cells). For this reason, the possibility to monitor a cell intrinsic element, along with <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> detection from the Au-labelled immunoprobes within the cells, was explored. These studies provide validation for the number of <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> signal pulses that corresponded to cell detection events. Also, the measurement of an intrinsic element is valuable to evaluate if the treatment with the IL1 $\alpha$ , or the use of AuNCs immunoprobes, can affect the number of detected cell events compared to those detected for negative control HRPEsv cell suspensions.

Thus, Mg, Ca, Cu, P, S, Mn, Co, Zn and Fe were all evaluated as intrinsic elements of HRPEsv cells using a negative control sample (neg-CT: HRPEsv cells without the AuNCs immunoprobe and without IL1 $\alpha$  treatment). However, selection was limited to Ca, Cu and Fe which provided detectable cell events. Although the number of detected cell events was comparable for all three isotopes (<sup>44</sup>Ca<sup>+</sup>, <sup>65</sup>Cu<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup>), monitoring <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> provided higher mean intensities per cell detection event which was 169.7 counts as opposed to 13.71 and 3.16 recorded for <sup>44</sup>Ca<sup>+</sup> and <sup>65</sup>Cu<sup>+</sup>,

respectively. Therefore, <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> was monitored as an intrinsic element throughout this study.

Experimental results also showed agreement in the number of cell events detected for different cell suspensions, such as neg-CT, neg-IL1 $\alpha$ , CT and IL1 $\alpha$ ; telisahus, demonstrating that the IL1 $\alpha$ -treatment or the immunoassay with the AuNCs labels did not compromise the integrity of the HRPEsv cells. Although dual isotope detection would achieve the simultaneous detection of <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> per single cell, such possibility was not available in the ICP-MS instrument employed. Therefore, <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> detection was conducted sequentially for the same cell suspension, with a delay of 1 min; the time required by the instrument to switch from <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> detection (standard mode) to <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> detection (KED mode).

##### 3.1.1. Cell fixation

Fixation of the cells is needed prior to the immunoassay. Moreover, it has been demonstrated that fixation strengthens the cellular structure [7]. Reagents such as PFA or methanol [36] are commonly used for such purpose. However, the use of non-optimized concentrations and/or conditions (e.g., high concentration or large times of incubation) might cause extensive cell breakage and thus cell loss. Thus, a novel fixation protocol, referred here as “mild fixation” was developed in this work to lessen the PFA effect in comparison with traditional fixation protocols (Table 1).

To study both fixation protocols with the HRPEsv cells, the cells (intact and with well-defined shape) were counted using the Neubauer chamber. The counting was repeated 3 times for each sample, before and after the fixation, to obtain the standard deviation associated with the measurement, which was in all cases below 20% RSD (relative standard deviation). Five cell suspensions treated separately with 4% PFA (biological replicates) were employed for cell counting after fixation. Results (Table 3) showed that the percentage of cells loss was reduced from more than 40% of cells with the traditional fixation to only 15% using the “mild fixation” protocol proposed in this work.

##### 3.1.2. Optimisation of the immunoassay

To perform the immunoassay in cell suspensions, in addition to the cell fixation, attention must be paid to other required preparation steps, such as incubation times, to ensure HRPEsv cell integrity and avoid cell structure damage. Three aliquots from CT cells were selected to carry out the immunoassay for the determination of APOE. The samples were analysed by sc-ICP-MS monitoring the <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> signal from the elemental label (evaluation of the immunoassay and the cells integrity) and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> naturally present in the cells (evaluation of the cells integrity). Two times were evaluated for the blocking stage (30 min and 1 h) and the immunoprobe incubation (overnight at 4 °C and 1 h at room temperature, [17]). No significant differences were observed for the two-blocking times evaluated, whereas the use of an overnight incubation for the AuNCs immunoprobe showed a strong effect on the HRPEsv cell integrity. As an example, Fig. S2 (Supplementary Material) presents the time-resolved profiles obtained for <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> isotopes using the overnight incubation of the AuNCs immunoprobe. A significantly lower number of cell events were counted after an overnight incubation (46 events on average; n = 3) compared to 1 h incubation (406 events on average; n = 3). Furthermore, the <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> signal coming from the ionic Au (i.e., dissolved) increased from 7 up to 74 counts (zoom at Fig. S2B), indicating that a significant number of cells had ruptured. An increase of the background signal was also observed for <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup>.

Additionally, the washing step following the incubation with the immunoprobe (AuNCs:anti-h-APOE) must be optimized since it is necessary to ensure that the excess of AuNCs-labelled antibody

**Table 3**

Experimental results obtained for the cell counting, comparing the loss of cells versus the total cells number before and after the two fixation processes (traditional and mild fixation) investigated for HRPEsv cells.

Counting	Traditional fixation (cells mL <sup>-1</sup> )	Mild fixation (cells mL <sup>-1</sup> )
Before fixation (instrumental replicates; n = 3)	1.12 · 10 <sup>6</sup> ± 1.7 · 10 <sup>5</sup>	1.73 · 10 <sup>6</sup> ± 8.9 · 10 <sup>4</sup>
After fixation & washing (biological replicates; n = 5)	5.93 · 10 <sup>5</sup> ± 8.7 · 10 <sup>4</sup>	1.50 · 10 <sup>6</sup> ± 1.9 · 10 <sup>5</sup>
Loss percentage	41.9%	13.6%

does not remain in the cell suspension while a thorough washing procedure may affect the number of cells. A single or double washing step was explored with the aim to effectively remove the unbound immunoprobe and simultaneously minimize cellular breakage and loss. By comparing the results of these two steps, it was observed that a double washing step dropped the number of <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> detected cell events from 123 to 50. Therefore, the double washing step was discarded, and instead the cell suspensions were washed once prior to sc-ICP-MS analysis as both the number of <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> detected cell events agreed. Therefore, it was observed that around 70% of the HRPEsv cells were lost by performing two washing steps and, therefore, one washing step with PBS 1x, spin at 100 g in the centrifuge and resuspension of the cellular pellet with the buffer was selected as the optimal washing step.

### 3.1.3. Sample introduction set-up

The samples were directly introduced from the Eppendorf tubes where the HRPEsv cell aliquots were stored and prepared. To ensure the load of a homogeneous cell suspension into the ICP-MS as well as no-sedimentation and cell integrity, a soft shaking was continuously applied to the tubes using a vortex. In addition, two sample introduction configuration set-ups were compared: (i) an external peristaltic pump to deliver the HRPEsv cell suspension at 20–25 μL min<sup>-1</sup>, and (ii) self-aspiration directly from the Eppendorf tube at 40 μL min<sup>-1</sup>.

In the case of using the external peristaltic pump, a relatively long tubing was needed, resulting in significant adherence of the cells onto the tube walls. For this reason, frequent and time-consuming cleaning steps were carried out between samples. In contrast, the use of self-aspiration proved to be a better choice for sc-ICP-MS analysis of individual HRPEsv cells. The flow rate was two-fold higher compared to the use of the peristaltic pump, but considering the concentration of the cells introduced into the ICP-MS and the ICP-MS dwell time, it can be assured that less than one cell per dwell time entered into the ICP-MS. The transport efficiency was evaluated by measuring a suspension of a reference material (60 nm AgNPs; 50 ng L<sup>-1</sup>). Experimental results showed a transport efficiency of 23.8% for the use of the self-aspiration set-up.

### 3.2. Optimisation of the sample dilution for sc-ICP-MS analysis

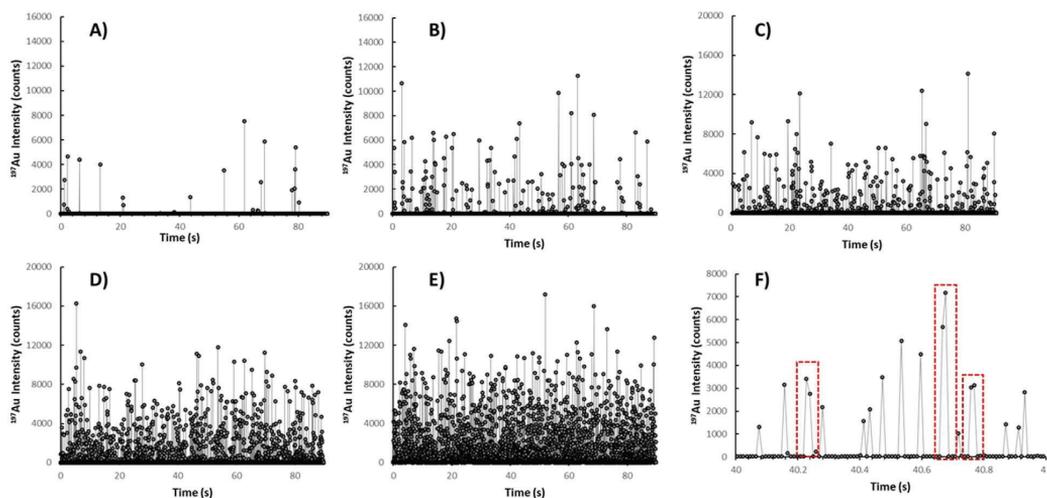
The detection of only one cell per event is required for accurate sc-ICP-MS analysis. The selection of an adequate concentration of HRPEsv cells in suspension was performed using a serial dilution with CT and IL1α-treated cells, acquiring both <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> (label on the immunoprobes) and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> (naturally present in the cells) signals. Comparable numbers of cell events must be obtained for both isotopes by sc-ICP-MS, providing that the conditions selected for the analysis are optimized correctly. As an example, Fig. 1 shows the time-resolved profiles obtained for <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> by sc-ICP-MS analysis for different serial dilutions of CT HRPEsv cells (AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe was used in this case). As can be seen, the number of cell events increased from 1 · 10<sup>4</sup> cell mL<sup>-1</sup> (Fig. 1A) up to 1 · 10<sup>6</sup> cell

mL<sup>-1</sup> (Fig. 1E) as the concentration of the cells in the suspension increased (the same pattern was found for <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> signal, data not shown).

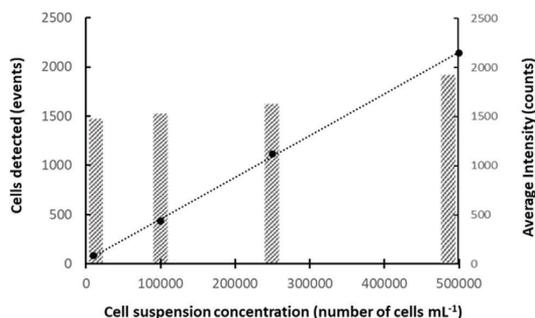
After data analysis, once the threshold was applied to the raw data to subtract the background (ionic Au) and determine the number of cell events, a linear increase in detected cell numbers with the sample concentration, from 1 · 10<sup>4</sup> to 5 · 10<sup>5</sup> cell mL<sup>-1</sup> (depicted in Fig. 2 as circles) were observed. Nevertheless, the <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> average intensity was constant with dilution (depicted as the bar graph in Fig. 2). In addition, the signal coming from the dissolved Au was always below 10 counts, thus demonstrating that the AuNC immunoprobe was efficiently labelled to the specific protein (APOE in this particular case) inside the cell.

The behaviour observed for HRPEsv cell concentrations ranging from 1 · 10<sup>4</sup> to 5 · 10<sup>5</sup> cell mL<sup>-1</sup> was not followed for the highest concentration (1 · 10<sup>6</sup> cell mL<sup>-1</sup>): the number of events did not show a linear relationship when compared with the dilutions and the <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> average intensity signal increased almost two-fold. As it can be seen at the enlarged <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> time-resolved profile (Fig. 1F) for such sample, some events were defined by several acquisition times, which is not the case for the lower cells concentration. For the highest concentration cell sample, a high probability for overlapping of two cells in the same event using the established analysis conditions (10 ms dwell time and 0.04 mL min<sup>-1</sup> flow rate) can take place. Thus, the concentration selected for further sc-ICP-MS analysis was 1 · 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>, at which time-resolved profile signals are well defined and the possibility of multiple cell overlapping is minimal.

Concerning <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> signals from HRPEsv cell suspensions, results showed that a different discrimination criterion (3σ or 5σ) must be applied to the selected two isotopes for the correct determination of the cell events. When applying the 5σ discrimination criterion for both <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> intensity signals resulting from the analysis of HRPEsv cells, the number of cell events counted with the <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> isotope was lower than with <sup>197</sup>Au<sup>+</sup>. This observation can be attributed to an underestimation of the cell events using the 5σ criterion for <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup>. As can be seen at the <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> time-resolved profile (Fig. 3), several cell events with intensities lower than the (5σ) threshold applied for discrimination can be clearly observed. These events (marked in the graph with arrows) should be included since they represent individual cell detection events. As demonstrated in Fig. 3, by applying the 3σ criterion, a higher number of cell events was detected; a number which compares well to the number of cell events determined for a <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> acquisition when a 5σ criterion was applied. This close agreement in the number of cell events was observed for several analyses of CT HRPEsv cell suspensions and is also reflected in the slope obtained from the relationship between the number of cells detected and the cell concentration in the suspension (<sup>197</sup>Au<sup>+</sup> slope = 0.0042; and <sup>56</sup>Fe<sup>+</sup> slope = 0.0041). In addition, it must be noted that the 5σ criterion was used to extract the cell detection events when <sup>197</sup>Au<sup>+</sup> was acquired, allowing to discriminate the cell detection events from the free Au-labelled immunoprobes that were not bound to the cytosolic proteins and were



**Fig. 1.**  $^{197}\text{Au}^+$  time-resolved profiles obtained for the analysis of CT HRPEsv cells (AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe) by sc-ICP-MS using serial dilutions for the sample. A)  $1 \cdot 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ; B)  $1 \cdot 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ; C)  $2.5 \cdot 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ; D)  $5 \cdot 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ; E)  $1 \cdot 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ; and F) Enlarged profile of the  $1 \cdot 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$  concentration for the acquisition time between 40 and 41 s.



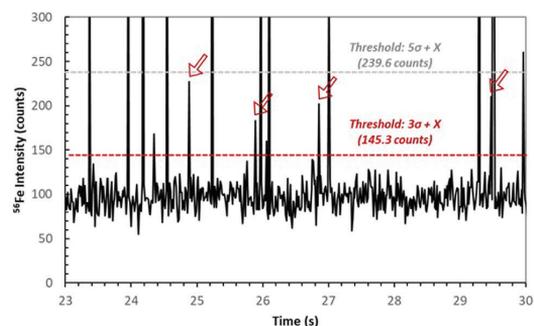
**Fig. 2.** Trends observed correlating the number of cell events and  $^{197}\text{Au}^+$  intensities for the analysis of CT HRPEsv CT cells (AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe) by sc-ICP-MS using different cell suspension concentrations. The number of cells detected in 175 s of acquisition time are shown in the graph as circles and the dotted line (left y-axis), whereas average  $^{197}\text{Au}^+$  signal intensities are depicted as bars (secondary y-axis).

possibly not removed with the washing steps.

### 3.3. Determination of APOE and MT2A in individual HRPEsv cells by sc-ICP-MS

The determination of APOE and MT2A was independently carried out in the cell suspensions submitted to the immunoassay with AuNCs immunoprobes. Taking into account that the same AuNCs label is used for the two selected proteins, the HRPEsv cells were divided in two groups for the individual determination of APOE and MT2A using AuNCs:anti-h-APOE and AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobes, respectively. Each protein was independently quantified in the cultured cells previously subjected to the pro-inflammatory treatment with  $\text{IL1}\alpha$  and the non-treated cells (CT).

The data obtained by sc-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  were used to evaluate the possible changes of the APOE and MT2A concentrations (fg of protein/cell) in individual HRPEsv cells after the pro-inflammatory

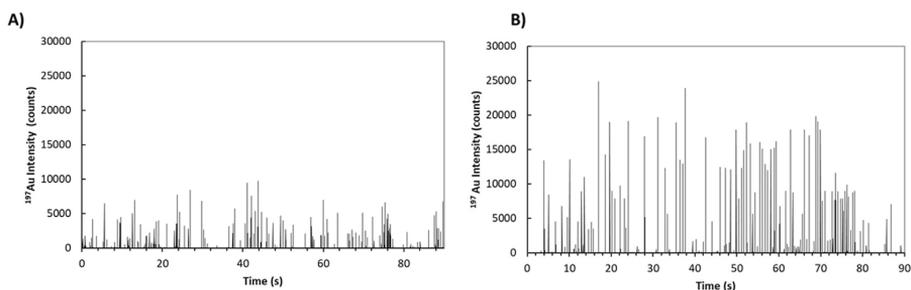


**Fig. 3.** sc-ICP-MS analysis of CT HRPEsv cells (AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe).  $^{56}\text{Fe}^+$  time-resolved profile (23–30 s acquisition time) obtained for the analysis of a cells suspension with  $1 \cdot 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  concentration. Two thresholds are plotted applying the  $3\sigma$  and  $5\sigma$  criteria (as an example, the arrows mark the individual events that are not counted in the case of  $5\sigma$  criterion).

treatment with  $\text{IL1}\alpha$ . For this purpose, after discriminating the cell events from the background by applying the selected threshold, the  $^{197}\text{Au}^+$  intensity was transformed into absolute mass of Au by the external calibration using ionic Au standards (see the Experimental Methods Section). Finally, the mass of Au was converted into protein mass following a protocol previously reported for tissue sections [28,29]. In the case of AuNCs:h-anti-APOE and AuNCs:h-anti-MT2A immunoprobes, the number of Au atoms per immunoprobe (i.e., the amplification factor) was determined as 466 on average. For an easier comprehension of the methodology, the steps carried out are summarized in Fig. S3.

#### 3.3.1. MT2A concentration in individual HRPEsv cells: CT versus $\text{IL1}\alpha$ -treatment

To evaluate if MT2A expression can be induced by a cytokine inflammatory mediator, HRPEsv cells were treated with  $\text{IL1}\alpha$ . As an example, Fig. 4A and B collect the  $^{197}\text{Au}^+$  time-resolved profiles obtained by sc-ICP-MS for CT and  $\text{IL1}\alpha$ -treated HRPEsv cells,



**Fig. 4.**  $^{197}\text{Au}^+$  time-resolved profile obtained for the analysis of MT2A protein in HRPEsv cells (AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobe) by sc-ICP-MS. A) CT cells; B) IL1 $\alpha$ -treated cells (100 ng mL $^{-1}$ ; 48 h).

respectively. It can be seen that the intensity of the Au events (corresponding to the AuNCs immunoprobe and, thus, to the MT2A) increased with the IL1 $\alpha$  treatment (Fig. 4B). This fact suggests an overexpression of MT2A after the pro-inflammatory treatment.

The trend suggested by  $^{197}\text{Au}^+$  intensity signals from qualitative profiles were confirmed after quantitative data analysis (the  $^{197}\text{Au}^+$  intensities were transformed into MT2A concentration, expressed as fg of the protein per cell). Table 4 contains the results obtained by sc-ICP-MS analysis for the MT2A for both CT conditions and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells (three biological replicates per condition and each of them with three analytical replicates). The treatment of HRPEsv cells with 100 ng mL $^{-1}$  of IL1 $\alpha$  for 48 h produced a significant increase of MT2A intracellular levels: a 1.8-fold change was observed between both HRPEsv cells groups. The uncertainty associated to the concentration of MT2A obtained by sc-ICP-MS is high, but it can be mainly attributed to the biological variability between cells suspensions. The standard deviation associated to the MT2A concentration in CT cells was particularly large; CT2 replicate exhibited a concentration significantly lower than other replicates. Such value was included to determine the average protein concentration in the cells, but even discarding this value an overexpression of MT2A in IL1 $\alpha$ -treated cells was observed.

To validate the MT2A concentration (fg MT2A/cell) obtained for HRPEsv cells, the average values determined by sc-ICP-MS were compared to those obtained by a quantitative commercial ELISA kit

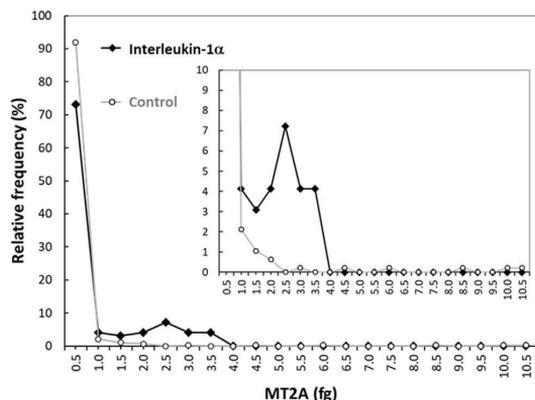
in lysed HRPEsv cells. The MT2A concentration determined by the ELISA kit was found to be  $1.74 \pm 0.18$  fg MT2A/cell for CT HRPEsv cells and  $3.36 \pm 0.50$  fg MT2A/cell for IL1 $\alpha$ -treated cells (1.9-fold change), confirming an overexpression of MT2A after the pro-inflammatory treatment. Therefore, the changes observed indicate the same tendency, i.e., there is an overexpression of MT2A after IL1 $\alpha$  treatment of HRPEsv cells. Although averaged concentrations obtained by sc-ICP-MS and ELISA analysis were in the same range, some differences can be observed. This can be attributed to the fact that a different cell culture was dedicated for the ELISA measurements as well as to specificities of the used antibodies in each method.

The study of the mass frequency histograms obtained by sc-ICP-MS can provide valuable information to understand the effect of the pro-inflammatory treatment on the HRPEsv cells population. As an example, in Fig. 5 shows histograms obtained for one CT condition and one IL1 $\alpha$ -treated cells, representing the percentage of cells containing a certain amount of MT2A (expressed in fg). A high number of cells with very low MT2A amounts were found in both conditions (0.5–1.0 fg MT2A). In addition, it was observed that about 20% of the cells from the total population were significantly affected by the IL1 $\alpha$ -treatment, and the mass of MT2A in such cells was in the range of 1.0–3.5 fg of MT2A. This percentage of cells increased significantly the expression levels of the protein, whereas the remaining cell population exhibited similar values for CT and IL1 $\alpha$ -treated cells, indicating a different biochemical response of

**Table 4**

Experimental results obtained for the determination of MT2A in HRPEsv cells by sc-ICP-MS using AuNCs immunoprobe as the elemental label. Three biological replicates per conditions were analysed (CT and IL) and each of such replicates were analysed three independent times (analytical replicates).

	NUMBER OF EVENTS (90 s)	CELL INTENSITY $^{197}\text{Au}^+$	fg Au/CELL	fg MT2A/CELL	RANGE OF fg MT2A/CELL	INT. AVERAGE fg MT2A/CELL	BIOLOGICAL AVERAGE fg MT2A/CELL
CT1	R1 473	375.6	17.2	1.16	0.032–38.4	1.05	<b>0.66 ± 0.45</b>
	R2 716	231.1	10.97	1.06	0.092–18.1		
	R3 713	210.1	9.94	0.94	0.1–18.87		
CT2	R1 206	43.92	2.07	0.17	0.023–2.7	0.16	
	R2 229	44.11	2.08	0.15	0.02–4.8		
	R3 –	–	–	–	–		
CT3	R1 368	265.6	12.57	0.83	0.026–28.5	0.77	
	R2 396	283.1	13.39	0.76	0.026–27.2		
	R3 467	230.6	10.91	0.72	0.023–31.0		
IL1	R1 469	326.0	15.43	1.04	0.026–23.4	1.04	<b>1.19 ± 0.14</b>
	R2 500	165.9	7.87	0.52	0.026–37.2		
	R3 563	140.3	6.64	0.44	0.029–38.72		
IL2	R1 209	86.2	4.08	0.26	0.023–17.5	1.2	
	R2 215	47.02	2.22	0.15	0.023–6.48		
	R3 483	384.8	18.21	1.2	0.03–48.37		
IL3	R1 422	444.7	21.04	1.38	0.026–30.72	1.34	
	R2 455	408.2	19.31	1.27	0.026–33.21		
	R3 481	414.3	19.6	1.36	0.026–39.11		



**Fig. 5.** Mass frequency histogram for MT2A protein in CT (CT2-R2; grey line) and IL1 $\alpha$ -treated (IL3-R2; black line) HRPEsv cells obtained by sc-ICP-MS analysis. AuNCs:anti-h-MT2A immunoprobe was employed for the analysis of MT2A protein in HRPEsv cells.

individual cells within a population to a pro-inflammatory stimulus in *in vitro* conditions.

### 3.3.2. APOE concentration in individual HRPEsv cells: CT versus IL1 $\alpha$ -treatment

The content of APOE in HRPEsv cells was determined by sc-ICP-MS using AuNCs:anti-h-APOE immunoprobe to evaluate the influence of the pro-inflammatory treatment with IL1 $\alpha$  in individual cells. Fig. S4 (Supplementary Material) shows an example of the time profiles obtained for CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. Table 5 contains the results obtained by sc-ICP-MS analysis for the APOE in CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. It can be observed that the ranges and the average values of concentration obtained for APOE in each condition showed a significant decrease in protein expression, suggesting that APOE levels diminished after the pro-inflammatory treatment. These results were validated by the quantification of the APOE in the lysed HRPEsv cells using the commercial ELISA kit. The averaged APOE concentration determined by the ELISA was  $17.9 \pm 1.3$  fg APOE/cell for CT cells and

$10.2 \pm 0.53$  fg APOE/cell for IL1 $\alpha$ -treated cells, which were in good agreement with the average protein content determined by sc-ICP-MS. In contrast to the overexpression of MT2A observed after the pro-inflammatory treatment, 0.7 and 0.6-fold changes were observed respectively for APOE by sc-ICP-MS and ELISA between CT and IL1 $\alpha$ -treated HRPEsv cells. Finally, Fig. S5 (Supplementary Material) depicts the mass frequency histogram per cell obtained for the APOE by sc-ICP-MS for one CT condition and one IL1 $\alpha$ -treated cells. As can be observed, only around 11% of the cells showed a decrease in protein expression after IL1 $\alpha$  treatment. Moreover, the percentage of cells which had a lower concentration of APOE after IL1 $\alpha$  treatment was in the range of 40–140 fg APOE.

## 4. Conclusions

In this work, immunoprobes labelled with monodisperse AuNCs were synthesized and the Au:antibody stoichiometry characterized for the sequential determination by sc-ICP-MS of two cytosolic proteins (MT2A and APOE) in individual HRPEsv cells, comparing their concentrations in cells under pro-inflammatory and control conditions. The quantitative results were successfully corroborated with commercial ELISA kits.

Several aspects of the research presented must be highlighted, including the convenience to set different thresholds to differentiate events from metal atoms intrinsically constituent of the cells from the gold atoms of the immunoprobe (466 atoms of Au on average per probe), as well as the steps required to develop the immunoassay of the cytosolic proteins with a minimum destruction of the cell membrane.

Therefore, this work paves the way for the further analysis of cytosolic proteins, as well as for the use of this characterized AuNCs-labelled immunoprobes for the determination of other type of proteins or other cell cultures by sc-ICP-MS. In addition, the application of labels constituted of other metal NCs (e.g., Pt, Au, Ir) would allow the simultaneous sensitive determination (NCs contain a high number of the detected isotope per label size) of different proteins in single cells when using TOFMS for detection.

## CRedit authorship contribution statement

**Ana Lores-Padín:** Investigation, Methodology, Writing – original draft. **Emmanouil Mavrákis:** Methodology, Validation, Writing

**Table 5**

Experimental results obtained for the determination of APOE in HRPEsv cells by sc-ICP-MS using AuNCs immunoprobe as the elemental label. Three biological replicates per conditions were analysed (CT and IL) and each of such replicates were analysed three independent times (analytical replicates).

	NUMBER OF EVENTS (90 s)	CELL INTENSITY $^{197}\text{Au}^+$	fg Au/ CELL	fg APOE/ CELL	RANGE OF fg APOE/ CELL	INT. AVERAGE fg APOE/ CELL	BIOLOGICAL AVERAGE fg APOE/ CELL
CT1	R1 237	1470.7	69.58	24.99	0.28–230	20.7	<b><math>18.1 \pm 2.1</math></b>
	R2 250	1354.88	64.1	23.02	0.25–215		
	R3 292	829.57	39.248	14.09	0.23–199		
CT2	R1 –	–	–	–	–	16.6	
	R2 222	1091	51.65	18.55	0.24–498		
	R3 286	857	40.54	14.56	0.26–284		
CT3	R1 341	901.81	42.67	15.31	0.31–238	17.0	
	R2 373	1249	59.13	21.09	0.30–211		
	R3 424	864.34	40.89	14.68	0.30–186		
IL1	R1 307	637	34.74	13.10	0.10–111	12.8	<b><math>13.3 \pm 0.4</math></b>
	R2 345	752	35.60	12.78	0.09–124		
	R3 320	689	35.07	12.59	0.52–169		
IL2	R1 213	786	37.17	13.35	0.23–151	13.5	
	R2 180	879	41.58	14.93	0.23–164		
	R3 184	728	33.96	12.2	0.26–230		
IL3	R1 313	1011	47.84	17.18	0.29–206	13.7	
	R2 349	739	34.53	12.4	0.28–173		
	R3 345	678	32.06	11.39	0.27–191		

– review & editing. **Beatriz Fernández:** Supervision, Conceptualization, Writing – review & editing. **Montserrat García:** Resources, Visualization. **Hector González-Iglesias:** Visualization, Conceptualization. **Rosario Pereiro:** Supervision, Funding acquisition. **Spiros A. Pergantis:** Supervision, Writing – review & editing.

### 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 financially supported through project PID2019-107838RB-I00/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033). A. Lores-Padín acknowledges the FPU Grant (Ref. MEC-D-17-FPU16/01363; Ministry of Education) and “Estancias Breves y Traslados Temporales FPU Grant” (Ref. EST19/00274). A. Lores-Padín would like to thank Assist. Prof. I.V. Pavlidis and his group for the biochemical facility support during her work at the University of Crete.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339701>.

### References

- [1] M. Fleckenstein, T.D.L. Keenan, R.H. Guymer, U. Chakravarthy, S. Schmitz-Valkenberg, C.C. Klaver, W.T. Wong, E.Y. Chew, Age-related macular degeneration, *Nat. Rev. Dis. Prim.* 7 (2021) 32, <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00272-3>.
- [2] X.B. Ling, H.W. Wei, J. Wang, Y.Q. Kong, Y.Y. Wu, J.L. Guo, T.F. Li, J.K. Li, Mammalian metallothionein-2A and oxidative stress, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1483, <https://doi.org/10.3390/ijms17091483>.
- [3] M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between Apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration, *Life* 11 (2021) 635, <https://doi.org/10.3390/ife11070635>.
- [4] L. Alvarez, H. González-Iglesias, M. García, S. Ghosh, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, The stoichiometric transition from Zn<sub>2</sub>Cu<sub>1</sub>-metallothionein to Zn<sub>7</sub>-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 28456–28469, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365015>.
- [5] H. Zhang, L.M. Wu, J. Wu, Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines, 2011, *Mediat. Inflamm.* (2011) 949072, <https://doi.org/10.1155/2011/949072>.
- [6] P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells, *Anal. Chem.* 91 (2019) 588–621, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04732>.
- [7] M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: current developments and remaining challenges, *Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116042, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116042>.
- [8] S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (35) (2020) 1784–1813, <https://doi.org/10.1039/d0ja00194e>.
- [9] K. Shigetani, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenium yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 637–645, <https://doi.org/10.1039/c3ja30370e>.
- [10] Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell-ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells, *Talanta* 206 (2020) 120174, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174>.
- [11] 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>.
- [12] E. Mavrakís, L. Mavroudikis, N. Lydaki-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 soni-spray ionization-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 9590–9598, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00917>.
- [13] Q.X. Sun, X. Wei, S.Q. Zhang, M.L. Chen, T. Yang, J.H. Wang, Single cell analysis for elucidating cellular uptake and transport of cobalt curcumin complex with detection by time resolved ICPMS, *Anal. Chim. Acta* 1066 (2019) 13–20, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.062>.
- [14] M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, 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>.
- [15] R.C. Merrifield, C. Stephan, J.R. Lead, Quantification of Au nanoparticle bio-uptake 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>.
- [16] Z. Chen, B. Chen, M. He, B. Hu, Droplet-splitting microchip online coupled with time-resolved ICPMS for analysis of released Fe and Pt in single cells treated with FePt nanoparticles, *Anal. Chem.* 92 (2020) 12208–12215, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01217>.
- [17] M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, 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>.
- [18] Y. Liang, Q. Liu, Y. Zhou, S. Chen, L. Yang, M. Zhu, Q. Wang, Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8341–8349, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01130>.
- [19] Y. Zhang, N. Zabinyakov, D. Majoris, A. Bouzekri, O. Ornaty, V. Baranov, M.A. Winnik, Tantalum oxide nanoparticle-based mass tag for mass cytometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 5741–5749, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04970>.
- [20] A.F. 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* 235 (2021) 122773, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122773>.
- [21] C. Liu, S. Lu, L. Yang, P. Chen, P. Bai, Q. Wang, Near-infrared neodymium tag for quantifying targeted biomarker and counting its host circulating tumor cells, *Anal. Chem.* 89 (2017) 9239–9246, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02016>.
- [22] 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>.
- [23] D.E. Carvajal-Hausdorff, J. Patsenker, K.P. Stanton, F. Villarroel-Espindola, A. Esch, R.R. Montgomerly, A. Psyrri, K.T. Kalogerias, 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. Cancer Res.* 25 (2019) 3054–3062, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2599>.
- [24] R. Yuan, F. Ge, Y. Liang, Y. Zhou, L. Yang, Q. Wang, Virulike element-tagged nanoparticle inductively coupled plasma mass spectrometry signal multiplier: membrane biomarker mediated cell counting, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4948–4952, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00749>.
- [25] Y. Zhang, C. Zhang, C. Xu, X. Wang, C. Liu, G.I.N. Waterhouse, Y. Wang, H. Yin, Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: a mini-review, *Talanta* 200 (2019) 432–442, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.068>.
- [26] E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim. Acta* 186 (2019) 429, <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3554-y>.
- [27] A. Lores-Padín, M. Cruz-Alonso, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay, *Microchim. Acta* 186 (2019) 705, <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3868-9>.
- [28] A. Lores-Padín, B. Fernández, L. Álvarez, H. González-Iglesias, I. Lengyel, R. Pereiro, Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation - inductively coupled plasma - mass spectrometry using metal nanoclusters as labels, *Talanta* 221 (2021) 121489, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>.
- [29] M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03124>.
- [30] P.-J. Pao, E. Emri, S.B. Abdurahman, T. Soorma, H.-H. Zeng, S.M. Hauck, R.B. Thompson, I. Lengyel, The effects of zinc supplementation on primary human retinal pigment epithelium, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49 (2018) 184–191, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.028>.
- [31] A. Lores-Padín, P. Menero-Valdés, A. Rodríguez-Penedo, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Synthesis of size monodisperse water-soluble metal nanoclusters for protein quantification by elemental mass spectrometry, *Mater. Process.* 4 (2021) 43, <https://doi.org/10.3390/IJOCN2020-07812>.
- [32] Z. Wu, J. Suhana, R. Jin, One-pot synthesis of atomically monodisperse, thiol-functionalized Au<sub>25</sub> nanoclusters, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 622–626, <https://doi.org/10.1039/B815983A>.
- [33] F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles on single particle detection by inductively coupled plasma mass

- spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1362–1371, <https://doi.org/10.1039/c0ja00098a>.
- [34] 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.
- [35] 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.* 15 (2011) 9361–9369, <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- [36] M. Wang, L.-N. Zheng, B. Wang, H.-Q. Chen, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W.-Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10252–10256, <https://doi.org/10.1021/ac502438n>.



Proceeding Paper

# Synthesis of Size Monodisperse Water-Soluble Metal Nanoclusters for Protein Quantification by Elemental Mass Spectrometry <sup>†</sup>

Ana Lores-Padín <sup>1,\*</sup>, Paula Menero-Valdés <sup>1</sup>, Alejandro Rodríguez-Penedo <sup>1</sup>, Héctor González-Iglesias <sup>1,2,3</sup>, Beatriz Fernández <sup>1,2</sup> and Rosario Pereiro <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain; paulamenerovaldes@mail.com (P.M.-V.); rodriguezpenedoalejandror@gmail.com (A.R.-P.); h.gonzalez@fio.as (H.G.-I.); fernandezbeatriz@uniovi.es (B.F.); mrpereiro@uniovi.es (R.P.)

<sup>2</sup> Instituto Universitario Fernández Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Av. Doctores Fernández Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Instituto Oftalmológico Fernández Vega, Av. Doctores Fernández Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain

\* Correspondence: analorespadin@gmail.com

<sup>†</sup> Presented at the 2nd International Online-Conference on Nanomaterials, 15–30 November 2020; Available online: <https://iocn2020.sciforum.net/>.

**Citation:** Lores-Padín, A.; Menero-Valdés, P.; Rodríguez-Penedo, A.; González-Iglesias, H.; Fernández, B.; Pereiro, R. Synthesis of Size Monodisperse Water-Soluble Metal Nanoclusters for Protein Quantification by Elemental Mass Spectrometry. *Mater. Proc.* **2021**, *4*, 43. <https://doi.org/10.3390/IOCn2020-07812>

Academic Editors: Ana María Díez-Pascual, Antonio Di Bartolomeo and Guanying Chen

Published: 15 November 2020

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The use of metal immunoprobes, defined as recognition molecules (e.g., antibodies) labeled with metal tags, constitutes an interesting strategy for the analysis of proteins in biological samples. Fluorescent and biocompatible metal nanoclusters (MNC) have been recently established as powerful tags for detection by spectrofluorimetry, but also by elemental mass spectrometry (MS). Detection of such immunoprobes by elemental MS allows not only the qualitative analysis of the proteins but also their absolute quantification. However, the deviation associated with the MNCs polydispersity will limit the analytical precision, particularly in those samples where the concentrations of the sought protein are very low (e.g., single cell analysis). In this work the synthesis of size monodisperse gold nanoclusters (AuNCs) is investigated by using different experimental conditions such as reaction time and temperature, solvent, reducing agent, and pH, among others. Characterization of AuNCs was performed by spectrofluorimetry, dynamic light scattering (DLS) and high resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) measurements.

**Keywords:** gold nanoclusters; elemental mass spectrometry; ICP-MS; protein quantification; dynamic light scattering; Spectrofluorimetry; High resolution transmission electron microscopy

## 1. Introduction

Strategies based on the use of metal immunoprobes to quantify biomolecules by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) have been widely investigated in recent years in the bioanalytical field [1]. This type of approaches is described as the specific interaction between the analyte (e.g., protein biomarker) and the recognition biomolecule (e.g., antibody) previously labeled with several metals or a metal nanostructure which are easily detected by elemental MS [2].

The metal nanostructures proposed up to date are diverse, from complexes with several atoms (e.g., Maxpar<sup>®</sup> and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid, DOTA) [3] to metallic nanoparticles (NP) with typical diameters above 10 nm [3]. In this context, metal nanoclusters (MNC) have been recently introduced as an interesting alternative for the analysis of biomolecules by elemental MS. MNCs exhibit a low size (<3 nm) and, additionally, they are formed of hundreds of atoms of the same metal, providing a

high amplification signal with a lower risk of blocking antibody recognition sites compared to larger labels (e.g., Maxpar® or typical NPs). Therefore, low concentrations of analytes can be detected through the signal's amplification and the high sensitivity offered by ICP-MS detection [4]. Furthermore, MNCs have unique properties compared to common metallic NPs due to their smaller size, such as molecular fluorescence. Thus, MNCs can be employed for bimodal detection by fluorescence and elemental MS.

MNCs of gold, silver or platinum (AuNCs, AgNCs, and PtNCs) have been recently reported as elemental tags for the determination of proteins in serum samples and biological tissues by using ICP-MS (i.e., serum) and laser ablation (LA) coupled to ICP-MS (i.e., tissues and cultured cells). For example, PtNCs were used as bimodal labels in a competitive immunoassay for immunoglobulin E determination in serum samples [5]. The huge amplification achieved by ICP-MS detection gave rise to a better limit of detection than the fluorimmunoassay and the commercial ELISA kit. Concerning the analysis of tissues and cells, the use of LA solid sampling technique allows to determine the rough proteins concentration and their distribution along the micrometer structures of the samples (lateral resolution in the range of 1 to 5  $\mu\text{m}$  has been reported). In this case, AuNCs, AgNCs, and PtNCs have been successfully investigated as elemental tags for proteins determination in human brain and ocular tissues [6–8]. However, the main limitation of using MNCs for quantification purposes is related to their size variability. The dispersion associated with the MNCs diameter generates a high variability in the number of metals per nanostructure and, therefore, limits the possibility to obtain accurate and precise quantification of the biomolecules (particularly in samples with low analyte concentrations, such as single cells).

In previous studies, we successfully synthesized water-soluble AuNCs following a bottom-up approach by chemical reduction of the Au (III) to Au (I, 0) in the presence of a thiolated ligand [7]. Nevertheless, the deviation associated with the AuNCs diameter must be decreased in order to apply them for quantification of biomolecules in single cells by elemental MS detection. Thus, in this work we introduce our latest efforts to achieve a proper synthesis method which allows to obtain AuNCs with a narrow size distribution.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents and Materials

For the synthesis of AuNCs,  $\text{NaAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (99% powder; Sigma–Aldrich, San Luis, CA, USA) was used as the metal precursor. Lipoic acid (>98% powder; Across Organics, Geel, Belgium), dihydrolipoic acid, and reduced L-glutathione (>98% powder; Sigma–Aldrich) were evaluated as the capping agents.  $\text{NaBH}_4$  (>98% powder; Sigma–Aldrich) was employed as the reductor. Moreover, different solvents were used, such as propan-2-ol (Fisher Scientific, Hampton, VA, USA), acetone, and methanol (both from VWR chemicals, Radnor, PA, USA). In order to purify AuNCs, Amicon ultra centrifugal filter units (3 kDa pore size, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and syringe filter units (PVDF, 0.22  $\mu\text{m}$  pore size, Olim Peak, Teknokroma Analitica S. A., Barcelona, Spain) were employed. The materials and instrumentation needed to carry out the synthesis were a cylindrical flask, a magnet, a stirring plate (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) for the synthesis and a pH meter (Mettler Toledo, Barcelona, Spain) to control the pH.

### 2.2. Instrumentation

Fluorescence measurements in solution were performed with a spectrofluorimeter (Cary Eclipse, Agilent Technologies, CA, USA) using a suprasil quartz cuvette model 101-Qs from Hellma® (Sigma–Aldrich). A high-resolution transmission electron microscope (HR-TEM) (JEOL JEM-2100, Tokyo, Japan) with an energy dispersive X-ray (EDX) spectrometer for microanalysis allowed morphological characterization of the AuNCs. Measurements of hydrodynamic size, as well as the polydisperse index (PDI), were carried out with a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern analytical Ltd., Malvern, UK).

### 2.3. Experimental Procedures

In order to reduce the dispersion associated to the AuNCs diameter, different experimental parameters were evaluated, starting from the previously synthesized AuNCs [6]. Briefly, the synthesis protocol was as follow: a total of 20 mL of ultrapure water and 50  $\mu$ L of NaOH (2 M) were collected in a cylindric flask, then 6.3 mg of lipoic acid were added and, subsequently, the solution was stirred until complete dissolution. Then, 400  $\mu$ L of NaBH<sub>4</sub> solution (50 mM) were slowly dropwise. Next, several modifications of this protocol were tested to achieve higher control in forming the nanostructures.

First, the kinetics of the reduction reaction were studied. For such purpose different conditions were evaluated, such as the temperature of the synthesis (25 or 8 °C), the solvent of the synthesis (water or methanol), the solvent used to dissolve the reducing agent (acetone or methanol), the pH of the synthesis, and the reaction time, among others. In addition, 2 thiol-ligands (used for capping) were evaluated: reduced lipoic acid and glutathione. Besides, a post-treatment of the just synthesized AuNCs was also evaluated. Specifically, polydisperse AuNCs were subjected to an aging treatment to form monodisperse AuNCs by incubating the synthesis at 50 °C for 2 h.

All experiments assayed for the synthesis of AuNCs were characterized by measurements using dynamic light scattering (DLS) to know the hydrodynamic diameter, as well as the polydispersity index (PDI). On the other hand, the AuNCs fluorescence emission ( $\lambda_{em}$ , 720 nm) was always corroborated by spectrofluorimetry measurements. Finally, selected AuNCs synthesis (i.e., using the optimized conditions) was measured by transmission electron microscopy (HR-TEM). Studies about electron diffraction (i.e., crystalline structure) and X ray diffraction (i.e., composition) were also performed.

### 3. Results and Discussion

The first study carried out for the synthesis of monodisperse AuNCs was the evaluation of the reaction time. For such purpose, different reaction times in the range from 0 to 24 h were studied. Experimental results obtained by DLS measurements showed that longer reaction times increase the dispersion in size of AuNCs: by decreasing the time from 15 to 4 h, a significant improvement in polydispersity index (PDI) from 0.4 to 0.28 was observed. On the other hand, fluorescence emission was also measured, and the higher fluorescence emission was observed using 4 h as the reaction time for the AuNCs synthesis, confirming that high-quality AuNCs were formed.

The second attempt was based on the hypothesis that slower kinetics of the chemical reduction can allow a better control in the growth of the AuNCs, leading to more homogeneous sizes. Thus, basic media, organic solvents, or low temperatures were used to decrease the reduction power of the reducing agent (i.e., NaBH<sub>4</sub>). In this case, experimental results showed that the use of a basic pH during the AuNCs synthesis (pH = 13) allowed to reduce the PDI up to 0.12 value (synthesis at pH = 11, the original, showed a PDI of 0.4).

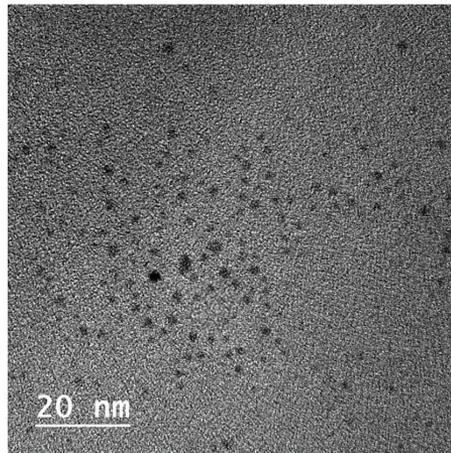
Regarding to the use of different thiolate ligands, bidentate thiols (e.g., lipoic acid) were confirmed as those to provide better control during the growth of AuNCs. The use of lipoic acid, particularly at its reduced form (i.e., dihydrolipoic acid, DHLA), ensured that the sulfhydryl groups were available for the direct chemisorption into the Au surface. DLS measurements of AuNCs synthesized with DHLA showed a PDI of 0.18. In contrast, the use of monodentate ligands (e.g., glutathione) for the synthesis of AuNCs showed to turn out bad quality measures by DLS: different size populations were found as well as the worst PDI value (denoted as 1 value).

The last strategy evaluated for the synthesis of monodisperse AuNCs was based on the employment of a post-synthesis step (denoted as aging step), consisting in incubating the synthesized AuNCs at 50 °C for 2 h (just after the synthesis). This approach produced highly monodispersed AuNCs with a PDI lower than 0.1.

Fluorescence measurements were also carried out with the different synthesis, showing in all cases an intense emission. The intensity of fluorescence was slightly affected

(compared to the original synthesis) when low reaction times and basic pH (pH = 13) was used. However, fluorescence emission decreased significantly when other ligands were employed as capping agents (i.e., dihydrolipoic acid and glutathion). A decrease in fluorescence emission was also observed after submitting the synthesis to the size-focusing treatment.

Additionally, Figure 1 collects the HR-TEM image obtained for the AuNCs synthesized with the reduced lipoic acid. An average diameter for the AuNCs was found to be  $1.99 \pm 0.04$  ( $n = 300$ ). It should be noted that most of the nanoparticles collected in the Figure 1 have this measured diameter, however aggregations of more than one nanostructure can be found. It is probably due to the drying process of the solution containing the AuNCs on the HR-TEM grids.



**Figure 1.** HR-TEM image of the AuNCs synthesis using reduced lipoic acid as ligand.

#### 4. Conclusions

In this work, we assayed different strategies to achieve the synthesis of monodisperse AuNCs for their further application as elemental labels in the determination of proteins by elemental MS. Experimental results showed that low reaction times (4 h), the use of bidentate thiol ligands as capping agents, and basic pH media reduced the polydispersity of AuNCs considerably: PDI was reduced from 0.4 to 0.12. Moreover, the addition of a last step to the synthesis (an aging post-treatment) provided the best results, allowing to obtain AuNCs with a PDI of 0.09. Fluorescence measurements performed with the different AuNCs synthesis showed in all cases an intense fluorescence emission ( $\lambda_{ex}$  325 or 390,  $\lambda_{em}$  720). Finally, HR-TEM images showed that it was possible to obtain monodisperse AuNCs.

**Funding:** This research was funded by project PID2019-107838RB-I00 by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER, and Ana Lores Padín acknowledges the FPU Grant (Ref. MECD-17-FPU16/01363) by Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this article and in the cited literature.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Liu, R.; Wu, P.; Yang, L.; Hou, X.; Lv, Y. Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: A review. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 373–393.
2. Lores-Padín, A.; Menero-Valdés, P.; Fernández, B.; Pereiro, R. Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the determination of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1128*, 251–268.
3. Giesen, C.; Wang, H.A.O.; Schapiro, D.; Zivanovic, N.; Jacobs, A.; Hattendorf, B.; Schüffler, P.J.; Grolimund, D.; Buhmann, J.M.; Brandt, S.; et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 417–422.
4. Greene, M.K.; Richards, D.A.; Nogueira, J.C.F.; Campbell, K.; Smyth, P.; Fernandez, M.; Christopher, J.S.; Chudasama, V. Forming next-generation antibody nanoparticle conjugates through the oriented installation of non-engineered antibody fragments. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 79–87.
5. Lores-Padín, A.; Cruz-Alonso, M.; Gonzalez-Iglesias, H.; Fernandez, B.; Pereiro, R. Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as immunoassay labels. *Microchim. Acta* **2019**, *186*, 705.
6. Cruz-Alonso, M.; Fernandez, B.; García-Díaz, M.; González-Iglesias, H.; Pereiro, R. Quantitative Imaging of Specific Proteins in the Human Retina by LA-ICP-MS using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Labels. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12145–12151.
7. Valencia-Agudo, E.; Fernández, B.; Cruz-Alonso, M.; García, M.; González-Iglesias, H.; Fernández-Abedul, M.T.; Pereiro, R. Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically-enriched silver nanoclusters. *JAAS* **2020**, *35*, 1868–1879.
8. Lores-Padín, A.; Fernández, B.; Álvarez, L.; González, H.; Lengyel, I.; Pereiro, R. Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation—Inductively coupled plasma—Mass spectrometry using metal nanoclusters as labels. *Talanta* **2021**, *221*, 121489.
9. Cruz-Alonso, M.; Fernández, B.; Navarro, A.; Junceda, S.; Astudillo, A.; Pereiro, R. Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta* **2019**, *197*, 413–421.





# Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation–ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered

María Cruz-Alonso<sup>1</sup> · Ana Lores-Padín<sup>1</sup> · Eva Valencia<sup>1</sup> · Héctor González-Iglesias<sup>2,3</sup> · Beatriz Fernández<sup>1,3</sup> · Rosario Pereiro<sup>1,3</sup>

Received: 10 July 2018 / Revised: 17 September 2018 / Accepted: 27 September 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Laser ablation (LA) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is a versatile tool for direct trace elemental and isotopic analysis of solids. The development of new strategies for quantitative elemental mapping of biological tissues is one of the growing research areas in LA-ICP-MS. On the other hand, the latest advances are related to obtaining not only the elemental distribution of heteroatoms but also molecular information. In this vein, mapping of specific proteins in biological tissues can be done with LA-ICP-MS by use of metal-labelled immunoproboscopes. However, although LA-ICP-MS is, in principle, a quantitative technique, critical requirements should be met for absolute quantification of protein distribution. In this review, progress based on the use of metal-labelled antibodies for LA-ICP-MS mapping of specific proteins is reported. Critical requirements to obtain absolute quantitative mapping of specific proteins by LA-ICP-MS are highlighted. Additionally, illustrative examples of the advances made so far with LA-ICP-MS are provided.

**Keywords** Immunohistochemistry · Antibody labelling · Laser ablation · Inductively coupled plasma mass spectrometry · Protein quantification

## Introduction

Increasing research effort is being addressed to the study of proteins to understand their biological functions. The great analytical challenge in this area is to combine specificity (biological samples are complex matrices), high sensitivity (the species of interest can be at very low concentrations) and absolute quantitative information (i.e. the capability to assess not only differential protein expression between two samples but also protein absolute

quantities) [1, 2]. Optical spectroscopy and mass spectrometry (MS) techniques offer interesting capabilities in this field for liquid samples and for chemical imaging of solid specimens [3, 4].

In particular, molecular MS techniques with soft-ionization sources, such as electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), are commonly used in protein analysis. However, although several technical and methodological improvements have been developed to remove or circumvent limitations [5, 6], MALDI-MS and ESI-MS are typically not considered for absolute quantification purposes. On the other hand, elemental MS, and particularly the inductively coupled plasma (ICP) ion source, can facilitate quantitative research in the life sciences. Low detection limits, wide linear dynamic range, elemental specificity, multielement (and multi-isotope) analysis and virtual species- and matrix-independent ionization are among the main analytical features of ICP-MS. Such performances are of particular interest to obtain absolute concentrations of biomolecules in complex samples without the need for specific standards [1, 7].

Absolute protein quantification by ICP-MS can be done by direct measurement of many proteins through naturally present heteroatoms such as S, Se, P and metal atoms; however, in this case the protein sought must be carefully isolated from the

Published in the topical collection *Elemental and Molecular Imaging by LA-ICP-MS* with guest editor Beatriz Fernández García.

✉ Héctor González-Iglesias  
h.gonzalez@fio.as

✉ Beatriz Fernández  
fernandezbeatriz@uniovi.es

<sup>1</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>2</sup> Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

sample matrix. Additionally, exogenous elemental (or isotopic) labelling of biomolecules makes almost all proteins detectable by ICP-MS. I [8], Fe [9], Hg [10] or lanthanides [11, 12] have been used to directly label the analyte for ICP-MS quantification, with different degree of success; such direct labelling strategies require the careful isolation of a given target biomolecule with appropriate separation techniques (e.g. liquid chromatography or gel electrophoresis) before the detection step. As a step forward, pioneering experiments at the beginning of this century [13–15] were performed using specific immunochemical reactions between the species sought and a metal-labelled antibody. Although the approach is not ideal because it has the typical drawbacks related to the use of antibodies [16], it is fair to say that it has opened new perspectives in specific and multiplexed protein quantification by ICP-MS [17–20]. Single metal chelates [21], polymers containing several chelates [22] and metal nanoparticles (NPs) [14, 23] have been proposed as chemical reporters to label the antibody to be used in the immunochemical reaction.

In the case of chemical imaging by ICP-MS, maps of specific proteins in biological tissues can be obtained by laser ablation (LA) sampling after an immunohistochemistry (IHC) protocol with metal-labelled antibodies [24]. LA-ICP-MS is currently regarded as a versatile MS tool for trace (element and isotopic) direct analysis of solids, offering quantitative capabilities [25]. Moreover, LA-ICP-MS allows high spatial resolution (typically higher than 1  $\mu\text{m}$ ) and, with the development of faster ablation cells [26, 27], well-resolved images of the specimen can be obtained in rather short times. In addition, the use of mass analysers with quasi-simultaneous spectral acquisition capabilities, such as time-of-flight (TOF) analysers, allows multielemental (hyperspectral) imaging [28, 29]; unfortunately, the sensitivity of TOF-MS analysers is not as high as that of other MS systems, particularly for lighter elements. LA-ICP-MS is being used for a wide range of different analyses, and a main area of interesting applications of LA-ICP-MS lies in the biomedical field [25, 30–32].

Several approaches based on the use of metal-labelled antibodies have been developed for simultaneous mapping of specific proteins by LA-ICP-MS, constituting an interesting alternative to commonly used fluorescence detection. Fluorescent labels with different emission lines have made possible multiplexed fluorescence analysis. Unfortunately, the development of highly multiplexed assays is hampered by the dye bandwidth (i.e. the potential spectral overlap), the difficulty in measuring simultaneously targets that differ in abundance by an order of magnitude or more and the risks of dye fluorescence quenching. In the case of biological tissues and cells, IHC imaging based on fluorescence measurements is, in addition, limited by sample autofluorescence, signal scattering and lack of robust quantification procedures [33, 34].

However, although the expectations for specific protein mapping by LA-ICP-MS are high, some issues should be

addressed to achieve absolute quantification of the specific proteins within the biological tissue. In the following sections we summarize the challenges to be faced for absolute quantitative mapping as well as the advances made so far with LA-ICP-MS.

### Critical requirements for absolute quantitative mapping of specific proteins by LA-ICP-MS

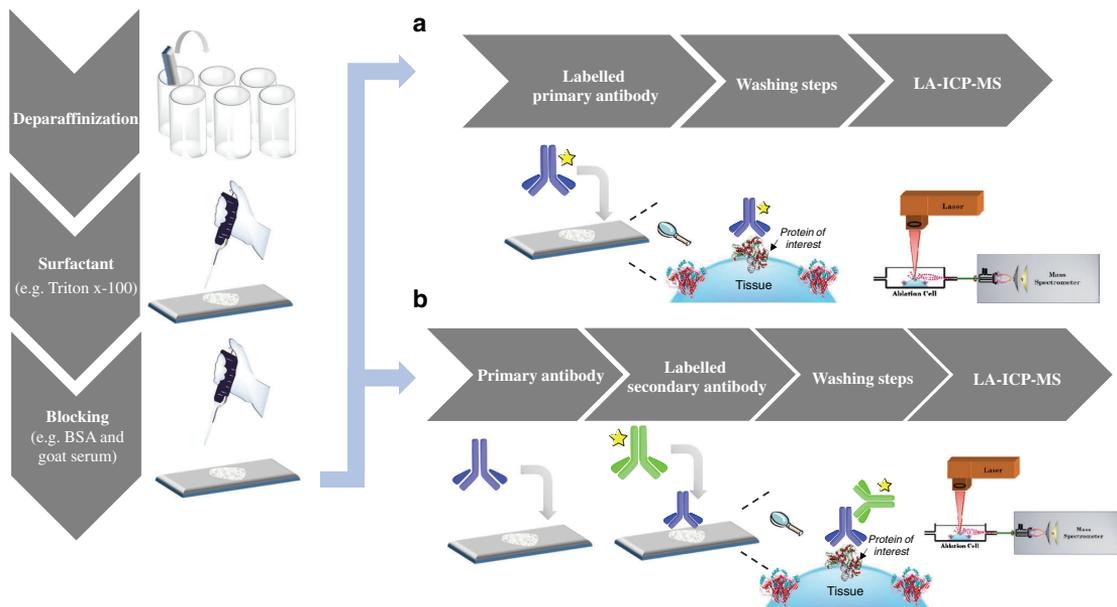
Quantitative elemental information on heteroatoms naturally present in biological tissues can be achieved by LA-ICP-MS by use of appropriate calibration standards (e.g. homogenized and spiked tissues, agarose gels, gelatin and polymeric films) [25, 30–35]. However, the analytical concept is more complex in the case of proteins. Mapping of specific proteins by LA-ICP-MS requires the use of proper labelled antibodies and the development of IHC protocols [36]. In principle, such protocols can be similar to those used in conventional immunofluorescence and immunoperoxidase staining, except that the label (chemical reporter) should contain an element (or isotope) detectable by ICP-MS. In addition, special care should be taken when conventional IHC protocols are used because the microchemical composition can be altered during the sample preparation procedure (e.g. formalin fixation and paraffin embedding) [3, 37].

Figure 1 shows the steps of two general IHC protocols for LA-ICP-MS mapping of biomolecules. Tissue sections (a few microns thick) from formalin-fixed paraffin-embedded blocks are mounted on IHC microscope slides. After paraffin removal, a surfactant is added to the slides. A further washing step is necessary, and then a blocking agent solution is added for a certain time. Then, depending on the procedure chosen, two different protocols can be followed:

- (a) The labelled primary antibody is added and incubated. This is followed by washing step, and the specimen is then ready for LA-ICP-MS measurement.
- (b) Incubation with a primary antibody is followed by a washing step, and then a labelled secondary antibody (which recognizes the unlabelled primary antibody) is added and incubated; this is followed by a final washing step, and the specimen is then submitted to LA-ICP-MS analysis.

Both protocols have inherent advantages: labelled primary antibodies offer higher specificity and greater potential for multiplexing, whereas the use of labelled secondary antibodies allows higher sensitivity and they may be used as a generic platform [3].

Studies aiming at quantitative mapping of biomolecules in tissue sections by LA-ICP-MS are still scarce. The use of a



**Fig. 1** Main steps of immunohistochemistry protocols required for laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) analysis of biological tissue sections: primary antibody labelled with the

selected elemental/isotopic label (a), and secondary antibody labelled with the selected elemental/isotopic label (b). BSA bovine serum albumin

homogeneously distributed internal standard should correct the data for variation in laser power, changes in transport, drift in the plasma sensitivity and the ablated mass introduced into the ICP-MS system. Several internal standardization strategies have been proposed within this context, such as iodination to correct data for tissue inhomogeneities [38]; unfortunately, iodine has some limitations such as a long wash out (memory effects). Also, labelling with an Ir intercalator that targets nuclei has been proposed [39]; unfortunately, this strategy can be used only for low-resolution imaging because at the 5- $\mu\text{m}$ -resolution level certain structures in the intensity are recognized. Printing of metal-spiked inks onto tissue sections has also been proposed for internal standardization [40]. Moreover, Mueller et al. [41] presented an interesting approach using lanthanide-labelled antibodies for quantitative immunoimaging of single eukaryotic cells; the calculation of an exact labelling degree and the correlation factor between the amount of lanthanide per cell and the amount of antibody–antigen complex were reported as critical aspects for further optimization.

In this context, there is still a lack of reliable and universal quantification strategies for protein images within tissues by LA-ICP-MS after IHC protocols. Ten general points (“golden rules”) are identified in Table 1 which should be carefully considered in the development of a method for absolute quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by elemental MS. First, it is necessary to keep in mind that to avoid risks of signal background from the sample, it is

recommended that the elements (or isotopes) used for labelling should not be present at detectable concentrations in the biological tissue. Rare earth elements, Au, Ag, Pt and Ir are examples of elements of choice. The use of monoisotopic elements such as Au will allow higher amplification with cheaper labels. Conversely, isotopically enriched stable elements will be more expensive but would allow higher multiplexing capabilities.

The next aspect to be considered is related to the label size. Small labels should be used to prevent size impediments, since big labels have a higher risk of blocking active sites in the antibody or will make the bioconjugate too big to properly penetrate the tissue section. In contrast, to get signal amplification (i.e. high sensitivity for protein detection) a high number of atoms of the element (or isotope) per label is required. Therefore, a compromise is needed regarding label size: the optimum labels will be those having a high ratio of the number of atoms of the element (or isotope) sought per label size. Another point related to label requirements is to know, as accurately as possible, the number of atoms of the detected element (or isotope) per label. Moreover, the concentration of the label in the solution for antibody labelling should be known.

Regarding the bioconjugation of the metal label with the antibody, it is necessary to keep in mind that the experimental conditions should be as mild as possible to prevent risks related to antibody degradation. Moreover, binding properties of

**Table 1.** Requirements and steps to follow for absolute quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by elemental mass spectrometry

	Requirements	Steps to follow
1	Elements not detected in the biological tissue to be analysed are recommended for labelling	It should be checked that the element to be used as a chemical reporter is not present at detectable levels in the native tissue
2	Compromise between label size and amplification provided	A label should be selected that provides high amplification but that is small enough to not affect the recognition capabilities of the antibody
3	Number of atoms of the detected element (or isotope) per label should be known, as well as the concentration of the label in the antibody labelling procedure	Combination of studies with TEM and ICP-MS can provide the number of atoms per label as well as the concentration of the label in the labelling solution
4	Antibody labelling conditions as mild as possible	A search should be conducted for efficient labelling conditions that do not affect antibody reactivity
5	Reproducible antibody labelling procedures producing stable bonds between label and protein	Experiments should be done to check reproducibility. Also, the stability of the bond should be investigated with time and in different media
6	Unlabelled antibodies should not be present after the antibody labelling process, or at least the labelling yield should be known	To achieve this, it is convenient to use an excess of the label in the antibody labelling procedure. Also, different strategies can be studied for removal of the excess of unconjugated antibody (e.g. by chromatography or ultrafiltration)
7	Aggregation of labelled antibodies should be avoided	This should be checked with gel electrophoresis, fluorescence microscopy and electron microscopy techniques
8	The number of labels per available antibody should be known	The stoichiometry should be determined by ICP-MS and ELISA
9	Quantitative immunohistochemistry processes	The labelled antibody should be in excess and the interaction with the specimen should be maintained for sufficient time
10	Detection system with high sensitivity, structure-independent response and wide dynamic linear range	A detection system such as an LA-ICP-MS system should be used

*ICP-MS* inductively coupled plasma mass spectrometry, *TEM* transmission electron microscopy

antibodies may be altered during labelling. Therefore, labelling compromise conditions are required to achieve effective labelling without affecting the binding properties and the specificity of the antibody (i.e. it is convenient to use physiological labelling conditions). One of the critical points is the labelling yield. If the labelling is not complete (close to 100% yield), at least the labelling degree must be reproducible and must be known for accurate quantification. Also, the labelled antibody should preferably be stable under different pH conditions and salt concentrations.

Once the labelling of the antibody has occurred, unconjugated antibodies should not be present in the solution used for IHC (their presence will produce incorrect results since antibodies not detectable by ICP-MS can be connected with the analyte sought). This can be achieved by use of the antibody as a limiting reactant in the procedure for labelling the antibody, or by removal of the excess of unconjugated antibody (e.g. by chromatography or ultrafiltration) before the IHC protocol. On the other hand, care should be taken to avoid aggregation of the labelled antibodies. Gel electrophoresis, fluorescence

microscopy and electron microscopy techniques can be used to assess aggregation. In addition, the number of labels per available antibody (stoichiometry) should be known. For such a purpose, both the label concentration in the purified bioconjugate solution and the available antibody concentration should be defined. Here, it is important to highlight that the determination of total protein per bioconjugate unit will not provide enough information because during the bioconjugation process some antibody molecules could be partially degraded or impeded for interaction with the analyte. Therefore, the immunoreactivity of the labelled antibody should be calculated with an ELISA experiment. On the other hand, the concentration of the heteroatom label in the labelled antibody can be calculated, for example, by ICP-MS.

Regarding the IHC procedure and to facilitate a quantitative interaction between the labelled antibody and the target molecule in the biological tissue, the sample should be thin enough (i.e. a few microns) to ensure full labelled antibody penetration in the sample tissue. A probably more important factor is that the labelled antibody should be in excess and the interaction

with the specimen should be maintained for sufficient time (overnight incubation is typically used to ensure complete tissue penetration and the commonest dilution for antibodies is in the range from 1:1000 to 1:5000). Finally, the excess (unreacted) of labelled antibody must be efficiently removed.

Finally, the use of an elemental mass detection system with high sensitivity, structure-independent response and wide dynamic linear range (i.e. LA-ICP-MS system) will be most convenient. Here, special attention should be paid to proper calibration using suitable matrix-matched standards and, preferably, internal standardization as well.

### Labels used for protein mapping of specific proteins by LA-ICP-MS

Proteins contain several reactive groups which can be used as targets for modifications by chemical labelling [42, 43]. For example, amino groups react with isothiocyanate and *N*-hydroxysuccinimide functionalities. For labelling thiol groups of reduced cysteine residues, maleimides and halogenacetamides can be used. Carboxyl-reactive chemical groups in biomolecular probes can also be used for labelling through carbodiimide chemistry by cross-linking carboxylic acids to primary amines. Click chemistry can be used for labelling after artificial introduction of azide or alkyne moieties into the proteins. Several strategies and label types have been proposed for heteroatom labelling in immunoassays. We briefly review these, focusing on those reported with LA-ICP-MS detection.

Most LA-ICP-MS applications deal with labels containing only one detectable element/isotope. Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) (Fig. 2a) and the macrocycle 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) (Fig. 2b) [21] form strong complexes with metals and can be used as antibody labels. High multiplexing and quantification capabilities are the main advantages resulting from such combination. To be used as labels, they should contain, additionally, a reactive group which binds covalently to antibodies. Furthermore, labels with a high number of detectable elements/isotopes (e.g. polymers, NPs) have also been proposed, aiming at signal amplification and, therefore, increasing sensitivity for protein detection.

#### Labels with one detectable element/isotope atom

Single metal chelates, and specially the macrocyclic DOTA coordinated with heteroatoms (typically lanthanide ions which have high complexation affinities for DOTA and low natural background in biological samples), have been widely used for elemental/isotopic labelling [21, 44]. As indicated already, to be of use for antibody labelling they should contain a reactive residue. Various bifunctional DOTA molecules have been

developed. Among the groups most commonly used for such purposes are isothiocyanatobenzyl (Bz-SCN) and maleimide (see Fig. 2c and d) [21, 45, 46]. Depending on the linking chemistry, an average of between one and four detectable atoms per antibody are introduced [20].

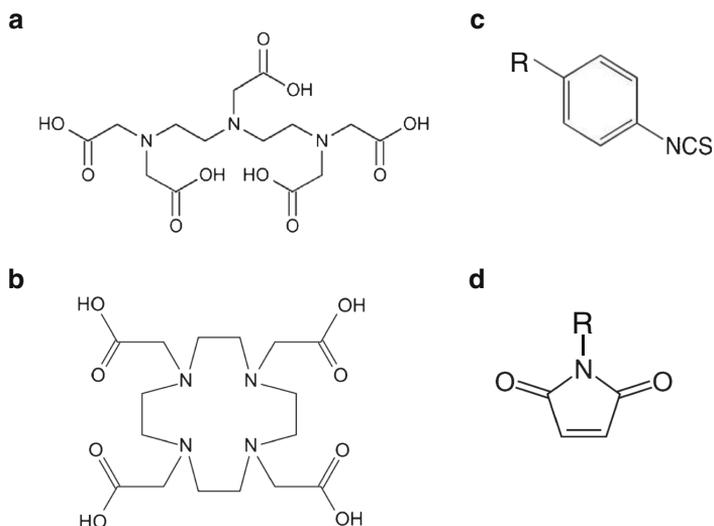
Bz-SCN-DOTA lanthanide complexes [47], which bind to lysine residues, have been applied in several LA-ICP-MS applications, such as the multiparametric analysis of cytochrome P450 isoenzymes after electrophoretic separation and blotting [48], or the multiplexed IHC detection of the tumour markers human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin 7 (CK7) and mucin 1 (MUC1) in breast cancer tissue by labelling anti-Her2, anti-CK7 and anti-MUC1 with Ho, Tm and Tb Bz-SCN-DOTA complexes (see Fig. 3) [44]. Unfortunately, it has been shown that Bz-SCN-DOTA do not lead to one kind of labelled antibody molecule. Instead, a label distribution and a high percentage of unmodified molecules (the reported labelling yield is as low as 0.03) could occur [49].

Another common labelling strategy involves a maleimide linker, which binds covalently to sulfhydryl residues (such as maleimido-monoamide-DOTA [50] and metal-coded affinity tags [45, 51]). In this case, reduction of disulfide bridges is a necessary step. For a suitable labelling, the challenge is to reduce as many disulfide bonds of the antibody as possible to produce reaction sites for the maleimide group without affecting the binding capability of the antibody [49]. Application examples of maleimide-DOTA-related compounds include the multiplexed analysis of plant thylakoid proteins by Western blots [50] and the development of a multiparametric microarray for simultaneous analysis of eight different cytochromes [51]. The labelling efficiency is higher than in the case of Bz-SCN-DOTA [49]; however, severe risks of high complexity of the metal-labelled antibody have been reported. Antibody fragments of different sizes and labelling degrees were obtained following the chemistry required for maleimide-DOTA labelling [52]. This prevents the development of a quantification procedure because the calculation of antibody molecules in the sample is not possible. As an alternative, a labelling concept resulting in one label per antibody has been proposed. The strategy is based on the previous modification of small antibody binding domains, C2<sub>Fc</sub> and C2<sub>Fab</sub>, with a metal maleimide-DOTA compound. Antibodies are then labelled with these modified C2 domains by mixing and their being subjected to far-UV light [53].

#### Highly amplified label methods for protein analysis by LA-ICP-MS

Polymeric labels containing several metal chelates of a given metal or isotope provide noticeable signal amplification [22, 28, 29, 54]. Here, we highlight the commercially available MAXPAR® labelling kits containing DTPA chelating compounds. Two polymer types are commercially available: the 7-

**Fig. 2** Chemical formulas of the chelating compounds diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) and of groups frequently used for linking to antibody residues used in combination with laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry detection: **a** DTPA, **b** DOTA, **c** isothiocyanatobenzyl, and **d** maleimide

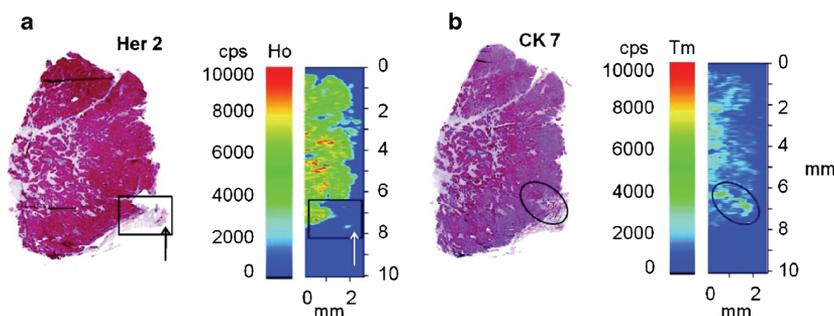


nm-long linear X8 polymer containing about 22 chelators per polymer and the branched DN3 polymer with 5-nm diameter and containing about 16 chelators per polymer. The metal polymeric label is bound to the antibody through a maleimide linker, by disulfide reduction. Typically, four or five such polymers will be conjugated to each antibody [19].

These polymers have been successfully used as antibody labels in varied applications, mostly in combination with ICP-TOF-MS for mass cytometry [19], where it has shown outstanding value. In addition, the strategy has been coupled with LA for imaging mass cytometry [28] and for highly multiplexed imaging of tissues at subcellular resolution. Here, it is worth highlighting the pioneering work of Giesen et al. [29] where simultaneous imaging of 32 target biomolecules (proteins and protein modifications) was achieved with polymers containing rare earths as reporters on antibodies. However, the polymeric non-metallic part of these labels gives

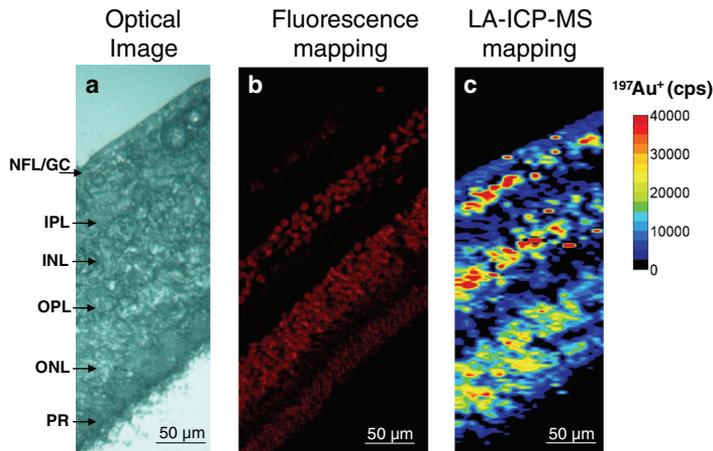
room for improvement of the ratio of “number of detectable metal atoms per label size”. Moreover, the risk of non-specific interactions has been reported in the case of IHC procedures in biological tissues [49].

Finally, antibodies labelled with metal NPs have proved to be another interesting strategy for immunoassay detection in liquid samples by ICP-MS [14, 23]. In the case of LA-ICP-MS, the use of antibodies labelled with metallic NPs is still scarce. For instance, 10-nm Au NPs were used in blotting membranes after protein separation by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis [55]. Bioimaging of breast cancer biomarkers using secondary antibody labelled with 5-nm Au NPs was performed [56]. In addition, this protein labelling approach, based on the use of a secondary IgG antibody (labelled in this case with 10-nm Au NPs), was used for bioimaging tyrosine hydroxylase (rate-limiting enzyme in dopamine biosynthesis) in mouse brain [57, 58].



**Fig. 3** Immunohistochemical staining of 3- $\mu$ m-thick breast cancer tissue sections, positive for **a** human epidermal growth factor receptor 2 (Her 2) and **b** cytokeratin 7 (CK 7). Laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry images are shown on the left in **a** and **b**. Laser spot size

200  $\mu$ m. Characteristic microscopic findings are highlighted by black frames. (From [42] with permission of the American Chemical Society. Copyright 2011)



**Fig. 4** Dual study of the distribution of metallothioneins 1 and 2 (MT1/2) in neurosensory retina of an eye tissue section after immunohistochemistry with Au nanocluster bioconjugate (MT1/2) by fluorescence detection and laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). **a** Transmission image for the analysed area, **b** Au nanocluster–antibody bioconjugate fluorescence obtained by confocal microscopy

and **c** qualitative image obtained by LA-ICP-MS (4- $\mu$ m spot size) for  $^{197}\text{Au}^+$  (i.e. MT1/2) distribution. (From reference [24] with permission of Springer. Copyright 2018). NFL/GC nerve fiber layer/ganglion cells, IPL inner plexiform layer, INL inner nuclear layer, OPL outer plexiform layer, ONL outer nuclear layer, PR photoreceptors

Recent advances in nanotechnology have introduced a new class of fluorescent labels, named “fluorescent metal nanoclusters” (NCs), with sizes between 0.2 and 3 nm (this type of nanostructure is characterized by sizes comparable to the Fermi wavelength of electrons and, therefore, they can exhibit molecule-like properties) [59]. These NCs are composed of a few to several hundred metal atoms, and the surface of the nanostructure can be tailored with selected groups for different chemistries [60]. Au NCs exhibit strong fluorescence, good photostability and biocompatibility. Therefore, they constitute a promising alternative to more conventional luminescent markers used in the bioanalytical field [61]. Moreover, these small labels can provide signal amplification as elemental labels in LA-ICP-MS bioimaging. In addition, there will be no accessibility restrictions to the target protein within the tissue (this is one of the problems associated with larger labels). Finally, Au NCs will allow sequential bimodal detection (fluorescence detection by microscopy and elemental/isotopic detection by LA-ICP-MS) in the same sample spot. Recently, the proof of concept was demonstrated for the mapping of metallothioneins in the human retina (see Fig. 4) using water-soluble Au NCs with an average size of 2.7 nm and more than 500 Au atoms per label [24]. In such an example, carboxylic groups of the Au NC surface were bioconjugated with specific primary antibodies by carbodiimide coupling. This format offers advantages as compared with the use of a labelled secondary antibody (labelled with Au NPs) as described above [56–58], such as higher multiplexing capabilities with use of a different type of metal NC per specific primary antibody. Moreover, this format can be further extended to NCs of other metals, such as Ag [62] or Pt [63]. This opens the door for the

synthesis of isotopically enriched metal NCs (thus increasing the palette of chemical reporters for antibody labelling compared with the monoisotopic Au NCs).

## Conclusions

There is no doubt that the combination of IHC with spectroscopic and MS techniques offers great possibilities for quantitative imaging of specific proteins in biological tissues, with detailed aid in experimental design provided in previous reviews [3].

In particular, the combination of LA-ICP-MS with IHC is of great interest for chemical imaging of specific proteins. For example, in this context it is worth pointing out that the use of antibodies labelled with metal isotopes (e.g. lanthanides) and rapid-response ablation cells combined with ICP-TOF-MS allows amazing hyperspectral capabilities for fast multiprotein imaging [29, 38].

Any increase in spatial resolution with LA-ICP-MS implies lower sensitivity. Therefore, labels providing signal amplification (e.g. several metal atoms per label) are most convenient to obtain highly resolved images, such as MAXPAR® labels and metal NCs. Here, studies should aim at selecting a compromise between the number of metal atoms and label size: labels with a high number of metal atoms will provide high signal amplification, but the limit will be given by steric impediments with the antibody. On the other hand, we highlight the interest in developing labels for multimodal imaging detection (e.g. fluorescence and MS detection), allowing

complementary analytical information to be obtained [24, 64, 65]. Additionally, although fluorescence measurements are more prone to troubling effects (e.g. autofluorescence and signal scattering), they are typically cheaper and faster than conventional LA-ICP-MS measurements. Therefore, these dual probes can serve both for optimization of the method and for a first test of the samples after the IHC protocol before measurement by LA-ICP-MS.

LA-ICP-MS is an intrinsically quantitative technique. However, it is not easy to obtain absolute quantitative information for protein maps by LA-ICP-MS after an IHC protocol because different requirements (considered in the previous sections) must be fulfilled during the whole procedure. Probably the most critical one to achieve a reliable absolute quantitative IHC image by LA-ICP-MS is to ensure a controlled chemistry for antibody metal labelling. In this vein, new, interesting approaches have been recently proposed [53, 66] but further intense collaborative work between specialists in different fields would be of high value to achieve more progresses in this direction.

Finally, it is worth mentioning that research in this field can be extended to other cutting-edge studies, such as the elucidation of mechanisms related to antibody–drug conjugates for oncology therapeutics [67, 68], as well as for nucleic acid (DNA and RNA) assays [69].

**Acknowledgements** This work was supported through the project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. B.F. acknowledges her contract RYC-2014-14985 with the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal programme. The Instituto Oftalmológico Fernández-Vega and Fundación de Investigación Oftalmológica acknowledge support from Cátedra Rafael del Pino (Fundación Rafael del Pino), and Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias of Principado de Asturias and FEDER (project IDE/2016/000214).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Calderón-Celis F, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2017;1–23. <https://doi.org/10.1002/mas.21542>.
- Cid-Barrio L, Calderón-Celis F, Abásolo-Linares P, Fernández-Sánchez ML, Costa-Fernández JM, Ruiz Encinar J, et al. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *Trends Anal Chem*. 2018;104:148–59. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.024>.
- Bishop DP, Cole N, Zhang T, Doble PA, Hare DJ. A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging. *Chem Soc Rev*. 2018;47:3770–87. <https://doi.org/10.1039/C7CS00610A>.
- Sancey L, Motto-Ros V, Busser B, Kotb S, Benoit JM, Piednoir A, et al. Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. *Sci Rep*. 2014;4:6065. <https://doi.org/10.1038/srep06065>.
- Rzagalinski I, Volmer DA. Quantification of low molecular weight compounds by MALDI imaging mass spectrometry – a tutorial review. *Biochim Biophys Acta*. 1865;2017:726–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.12.011>.
- Higashi T, Ogawa S. Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: a review. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;130:181–93. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.04.033>.
- Sanz-Medel A, Montes-Bayón M, Bettmer J, Fernández-Sánchez ML, Ruiz EJ. ICP-MS for absolute quantification of proteins for heteroatom-tagged, targeted proteomics. *Trends Anal Chem*. 2012;40:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.020>.
- Jakubowski N, Messerschmidt J, Anorbe MG, Waentig L, Hayen H, Roos PH. Labelling of proteins by use of iodination and detection by ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2008;23:1487–96. <https://doi.org/10.1039/b718074h>.
- Bomke S, Pfeifer T, Meermann B, Busche W, Karst U. Liquid chromatography with complementary electrospray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection of ferrocene labelled peptides and proteins. *Anal Bioanal Chem*. 2010;397:3503–13. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3123-z>.
- Kutscher DJ, del Castillo Busto ME, Zinn N, Sanz-Medel A, Bettmer J. Protein labelling with mercury tags: fundamental studies on ovalbumin derivatised with p-hydroxymercuribenzoic acid (pHMB). *J Anal At Spectrom*. 2008;23:1359–1364. <https://doi.org/10.1039/b806118a>.
- de Bang TC, Husted S. Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Trends Anal Chem*. 2015;72:45–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.021>.
- El-Khatib AH, Esteban-Fernández D, Linscheid MW. Dual labeling of biomolecules using MeCAT and DOTA derivatives: application to quantitative proteomics. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:2255–67. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5910-1>.
- Zhang C, Wu F, Zhang Y, Wang X, Zhang X. A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum. *J Anal At Spectrom*. 2001;16:1393–6. <https://doi.org/10.1039/B106387C>.
- Zhang C, Zhang Z, Yu B, Shi J, Zhang XR. Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74:96–9. <https://doi.org/10.1021/ac0103468>.
- Baranov VI, Quinn Z, Bandura DR, Tanner SD. A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection. *Anal Chem*. 2002;74:1629–36. <https://doi.org/10.1021/ac0110350>.
- Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: standardize antibodies used in research. *Nature*. 2015;518(7537):27–9. <https://doi.org/10.1038/518027a>.
- Carei M, Elvirí L, Mangia A. Element-tagged immunoassay with inductively coupled plasma mass spectrometry for multianalyte detection. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393:57–61. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2419-8>.
- Liu Z, Li X, Xiao G, Chen B, He M, Hu B. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: a review. *Trends Anal Chem*. 2017;93:78–101. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.05.008>.
- Tanner SD, Baranov VI, Omatsky OI, Bandura DR, George TC. An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62:955–65. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1416-8>.

20. Mueller L, Traub H, Jakubowski N, Drescher D, Baranov VI, Kneipp J. Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406:6963–77. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8143-7>.
21. Schwarz G, Mueller L, Beck S, Linscheid MW. DOTA based metal labels for protein quantification: a review. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:221–33. <https://doi.org/10.1039/c3ja50277e>.
22. Majonis D, Herrera I, Ornatsky O, Schulze M, Lou X, Soleimani M, et al. Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays. *Anal Chem.* 2010;82:8961–9. <https://doi.org/10.1021/ac101901x>.
23. Liu J-M, Yan X-P. 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.* 2011;26:1191–7. <https://doi.org/10.1039/c0ja00232a>.
24. Cruz-Alonso M, Fernandez B, Álvarez L, González-Iglesias H, Traub H, Jakubowski N, et al. Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags. *Microchim Acta.* 2018;185:64. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2597-1>.
25. Limbeck A, Galler P, Bonta M, Bauer G, Nischkauer W, Vanhaecke F. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:6593–617. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8858-0>.
26. Wang HAO, Grolimund D, Giesen C, Borca CN, Shaw-Stewart JRH, Bodenmiller B, et al. Fast chemical imaging at high spatial resolution by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85:10107–16. <https://doi.org/10.1021/ac400996x>.
27. Van Malderen SJM, Managh AJ, Sharp BL, Vanhaecke F. Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bioimaging applications. *J Anal At Spectrom.* 2016;31:423–439. <https://doi.org/10.1039/C5JA00430F>.
28. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Loboda A, Baranov VI, Hedley DW. Imaging mass cytometry. *Cytometry Part A.* 2017;91A:160–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23053>.
29. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014;11:417–22. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2869>.
30. Konz I, Fernández B, Fernández ML, Pereiro R, Sanz-Medel A. Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403:2113–25. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6023-6>.
31. Pozebon D, Scheffler GL, Dressler VL. Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review. *J Anal At Spectrom.* 2017;32:890–919. <https://doi.org/10.1039/c7ja00026j>.
32. Sussulini A, Becker JS, Becker JS. Laser ablation ICP-MS: application in biomedical research. *Mass Spectrom Rev.* 2017;36:47–57. <https://doi.org/10.1002/mas.21481>.
33. Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods.* 2014;70(1):46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.016>.
34. Matos LL, Truffelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights.* 2010;5:9–20.
35. Rodríguez-Menéndez S, Fernández B, García M, Álvarez L, Fernández ML, Sanz-Medel A, et al. Quantitative study of zinc and metallothioneins in the human retina and RPE cells by mass spectrometry-based methodologies. *Talanta.* 2018;178:222–30. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.024>.
36. Taylor CR, Levenson RM. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006;49:411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>.
37. Bonta M, Török S, Hegedus B, Döme B, Limbeck A. A comparison of sample preparation strategies for biological tissues and subsequent trace element analysis using LA-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409:1805–14. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0124-6>.
38. Giesen C, Waentig L, Mairinger T, Drescher D, Kneipp J, Roos PH, et al. Iodine as an elemental marker for imaging of single cells and tissue sections by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2011;26:2160–5. <https://doi.org/10.1039/c1ja10227c>.
39. Frick DA, Giesen C, Hemmerle T, Bodenmiller B, Günther D. An internal standardisation strategy for quantitative immunoassay tissue imaging using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2015;30:254–9. <https://doi.org/10.1039/c4ja00293h>.
40. Hoessl S, Neumann B, Techritz S, Sauter G, Simon R, Schlüter H, et al. Internal standardization of LA-ICP-MS immune imaging via printing of universal metal spiked inks onto tissue sections. *J Anal At Spectrom.* 2016;31:801–8. <https://doi.org/10.1039/c5ja00409h>.
41. Mueller L, Herrmann AJ, Techritz S, Panne U, Jakubowski N. Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409:3667–76. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0310-1>.
42. Boutourea O, Bernardes GJ. Advances in chemical protein modification. *Chem Rev.* 2015;115:2174–95. <https://doi.org/10.1021/cr500399p>.
43. de Gruyter JN, Malins LR, Baran PS. Residue-specific peptide modification: a chemist's guide. *Biochemistry.* 2017;56:3863–73. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00536>.
44. Giesen C, Mairinger T, Khoury L, Jakubowski N, Panne U. Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83:8177–83. <https://doi.org/10.1021/ac2016823>.
45. Ahrends R, Pieper S, Kühn A, Weisshoff H, Hamester M, Lindemann T, et al. A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:1907–16. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700152-MCP200>.
46. Schwarz G, Beck S, Weller MG, Linscheid MW. MeCAT—new iodoacetamide reagents for metal labelling of proteins and peptides. *Anal Bioanal Chem.* 2011;401:1203–9. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5189-7>.
47. Waentig L, Roos PH, Jakubowski N. Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. PART III. Optimization of antibody labelling for application in a Western blot procedures. *J Anal At Spectrom.* 2009;24:924–33. <https://doi.org/10.1039/b905224k>.
48. Waentig L, Jakubowski N, Roos PH. Multi-parametric analysis of cytochrome P450 expression in rat liver microsomes by LA-ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2011;26:310–9. <https://doi.org/10.1039/c0ja00077a>.
49. Waentig L, Jakubowski N, Hardt S, Scheler C, Roos PH, Linscheid MW. Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser. *J Anal At Spectrom.* 2012;27:1311–20. <https://doi.org/10.1039/c2ja30068k>.
50. de Bang TC, Pedas P, Schjoerring JK, Jensen PE, Husted S. Multiplexed quantification of plant thylakoid proteins on western blots using lanthanide-labeled antibodies and laser ablation

- inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Anal Chem.* 2013;85:5047–54. <https://doi.org/10.1021/ac400561q>.
51. Waentig L, Techritz S, Jakubowski N, Roos PH. A multi-parametric microarray for protein profiling: simultaneous analysis of 8 different cytochromes via differentially element tagged antibodies and laser ablation ICP-MS. *Analyst.* 2013;138:6309–15. <https://doi.org/10.1039/c3an00468f>.
  52. Mueller L, Mairinger T, Hermann G, Koellensperger G, Hann S. Characterization of metal-tagged antibodies used in ICP-MS-based immunoassays. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406:163–9. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7416-x>.
  53. Kanje S, Herrmann AJ, Hober S, Mueller L. Next generation of labelling reagents for quantitative and multiplexing immunoassays by the use of LA-ICP-MS. *Analyst.* 2016;141:6374–80. <https://doi.org/10.1039/c6an01878e>.
  54. Lou X, Zhang G, Herrera I, Kinach R, Ornaty O, Baranov V, et al. Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angew Chem Int Ed.* 2007;46:6111–4. <https://doi.org/10.1002/anie.200700796>.
  55. Müller SD, Diaz-Bone RA, Felix J, Goedecke W. Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies. *J Anal At Spectrom.* 2005;20:907–11. <https://doi.org/10.1039/B504571A>.
  56. Seuma J, Bunch J, Cox A, McLeod C, Bell J, Murray C. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics.* 2008;8:3775–84. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800167>.
  57. Hare DJ, Lei P, Ayton S, Roberts BR, Grimm R, George JL, et al. An iron–dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. *Chem Sci.* 2014;5:2160–9. <https://doi.org/10.1039/c3sc53461h>.
  58. Paul B, Hare DJ, Bishop DP, Paton C, Nguyen VT, Cole N, et al. Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. *Chem Sci.* 2015;6:5383–93. <https://doi.org/10.1039/c5sc02231b>.
  59. Li J, Zhu J-J, Xu K. Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications. *Trend Anal Chem.* 2014;58:90–8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.02.011>.
  60. Zhang L, Wang E. Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today.* 2014;9:132–57. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.02.010>.
  61. Alonso MC, Trapiella-Alfonso L, Fernández JMC, Pereiro R, Sanz-Medel A. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens Bioelectron.* 2016;77:1055–61. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.011>.
  62. Diez I, Ras RHA. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale.* 2011;3:1963–70. <https://doi.org/10.1039/C1NR00006C>.
  63. Fernández JF, Trapiella-Alfonso L, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A. Aqueous synthesis of near-infrared highly fluorescent platinum nanoclusters. *Nanotechnology.* 2015;26:215601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/21/215601>.
  64. Buckle T, van der Wal S, van Malderen SJM, Müller L, Kuil J, van Unen V, Peters RJB, van Bommel MEM, McDonnell LA, Velders AH, Koning F, Vanhaeae F, van Leeuwen FWB. Hybrid imaging labels: providing the link between mass spectrometry-based molecular pathology and theranostics. *Theranostics.* 2017;7:624–633. <https://doi.org/10.7150/thno.17484>.
  65. Yang B, Zhang Y, Chen B, He M, Yin X, Wang H, et al. A multi-functional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells. *Biosens Bioelectron.* 2017;96:77–83. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.041>.
  66. Ruhe L, Ickert S, Beck S, Linscheid MW. A new strategy for metal labeling of glycan structures in antibodies. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410:21–5. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0683-1>.
  67. Beck A, Goetsch G, Dumontet C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16:315–37. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.268>.
  68. Marquez BV, Ikotun OF, Zheleznyak A, Wright B, Hari-Raj A, Pierce RA, et al. Evaluation of 89Zr-pertuzumab in breast cancer xenografts. *Mol Pharm.* 2014;11:3988–95. <https://doi.org/10.1021/mp500323d>.
  69. Zhang S, Zhang S, Zhang X, Liu R. Analysis of proteins and DNAs using inductively coupled plasma mass spectrometry and elemental tagging. In: *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation.* 2018:1–45. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9639>.



## Review

# Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the determination of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry

Ana Lores-Padín, Paula Menero-Valdés, Beatriz Fernández\*, Rosario Pereiro

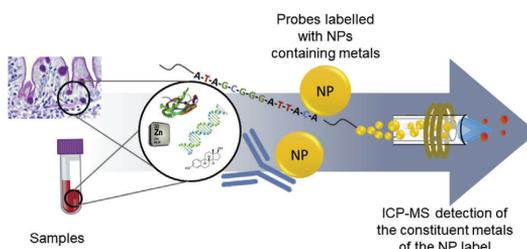
Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain



## HIGHLIGHTS

- Surveyed literature using NPs as biomolecule labels and ICP-MS detection.
- Emphasized applications for biological fluids, cell cultures and body tissues.
- Discussed characteristics, pros and cons and development directions.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 February 2020

Received in revised form

30 June 2020

Accepted 1 July 2020

Available online 19 July 2020

## Keywords:

Elemental mass spectrometry

Laser ablation

Metal nanoparticles

Antibody labelling

Biomolecule quantification

Immunohistochemistry

## ABSTRACT

Inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS) is an essential tool for quantitative ultra-trace elemental and isotopic determinations in the biological and biomedical fields. In addition, sensitive and multiplexed quantification of target biomolecules in biological fluids and single-cells by ICP-MS can be carried out using metal elements or their isotopes as labels of immunoreaction and hybridization specific-recognition reactions. Following similar strategies, the bioimaging of biomolecules in tissues and single-cells by laser ablation (LA)-ICP-MS can be also achieved. Sensitivity can be further increased by resorting to amplification strategies based on the use of labels containing several atoms of a given elemental (or isotopic) reporter, such as inorganic nanoparticles (NPs).

In this review, we intend to highlight the progress achieved in this active research area. Following the introduction, a short report of the characteristics of the most relevant NPs used as labels of specific-recognition reactions for ICP-MS detection, as well as the most common labelling routes are given. Then, the applications of NPs-labelled detection probes used in combination with ICP-MS (either with liquid nebulization or LA sampling) for identification and determination of proteins and oligonucleotides in biological samples are thoroughly reviewed. In the conclusions section, the challenges faced and the expected advances in this topic are underlined.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

\* Corresponding author.

E-mail address: [fernandezbeatriz@uniovi.es](mailto:fernandezbeatriz@uniovi.es) (B. Fernández).

1. Introduction	252
2. NP-labelled recognition probes: synthesis of NPs, characterization and bioconjugation	253
2.1. Metallic nanoparticles	253
2.2. Quantum dots	254
2.3. Upconversion nanoparticles	254
2.4. Dye-doped silica nanoparticles	254
2.5. Purification and characterization of nanoparticles	254
2.6. Biomolecule-labelling with nanoparticles	254
2.6.1. Bioconjugation approaches	254
2.6.2. Characterization of the labelled nanoprobe	255
3. Application of NP-labelled recognition biomolecules and ICP-MS detection	255
3.1. NPs as labels of specific-recognition reactions combined with detection by liquid nebulization-ICP-MS	255
3.1.1. Separation by using functionalized magnetic nanoparticles and microparticles	260
3.1.2. Single-particle ICP-MS detection	260
3.1.3. Combination with additional amplification strategies	261
3.1.4. Multimodal detection capabilities	262
3.2. Identification and determination of biomolecules by laser ablation-ICP-MS using NPs as labels	262
4. Conclusions	264
Declaration of competing interest	264
Acknowledgements	264
References	264

## 1. Introduction

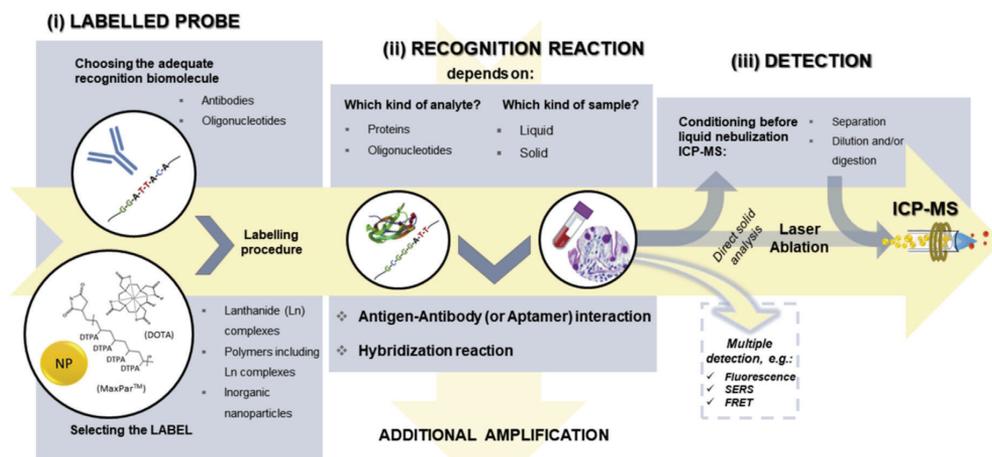
In the last few decades, ICP-MS has become an essential tool for ultratrace elemental and isotopic detection in a wide variety of sample matrices. Molecular information can be achieved through ICP-MS by measuring heteroatoms such as S, Se, P, and metal atoms naturally present in the molecule. In addition, exogenous elemental (or isotopic) labelling can be carried out with a metal or metalloid to make the target molecule(s) more easily detectable by ICP-MS [1,2].

Molecular detection is particularly crucial in the biological and medical fields to determine biomolecules such as antigens, antibodies, DNA and RNA. Biological samples (biological fluids, cells, tissues) are very complex and, therefore, determination of target biomolecules through the measurement either of endogenous or directly-labelled exogenous elements requires the rigorous isolation of the analyte by chromatographic or electrophoretic techniques preceding ICP-MS detection. As an alternative, the target biomolecule can be detected after highly selective biochemical reactions, such as antigen-antibody (Ab) interactions, antigen-aptamer interactions or nucleotide hybridization, where a recognition biomolecule has been previously labelled with a metal element or with a stable nuclide [2–4]. Fig. 1 depicts the main steps of the analytical process (i) selection/construction of a recognition probe (e.g. a selective Ab or an oligonucleotide): labelled with a molecule containing one or several atoms of a given metal (e.g. a metal complex, a polymer containing several metal complexes, or a nanoparticle (NP)) (ii) biochemical procedure (e.g. immunoassay or nucleotide hybridization), to recognize the analyte by the labelled probe, and (iii) final conditioning for ICP-MS measurement and detection. This last step will depend upon the nature of the sample, whether it is introduced into the ICP as a liquid (by conventional nebulization) or direct solid analysis is carried out by laser ablation (LA).

ICP-MS operation costs are higher than those associated to conventional measurements by molecular absorption or fluorescence. Therefore, an initial aspect to consider are the advantages offered by the ICP-MS that make it worthwhile for the detection of metal-labelled biomolecules. Interesting analytical features of ICP-MS are: detection limits (DLs) below  $\text{ng mL}^{-1}$ , wide linear dynamic range, sample-matrix effects that are either low or can be reduced or eliminated, and multi-element (and multi-isotope) capabilities that offer less risk of spectral overlaps as compared to molecular

fluorescent dyes [5]. Additional advantages of ICP-MS include the feasibility of measuring analytes that differ in abundance by one order of magnitude or more, and the possibility to simultaneously determine the protein and the coordinated metals in metalloproteins. Moreover, while background signals due to colored or autofluorescent samples are a common problem in the imaging of biological tissues by fluorescence detection [6], these issues do not affect direct solid analysis by LA-ICP-MS [7].

A wide variety of metal-reporters have been proposed for the development of specific probes for ICP-MS detection. The first work was published in 2001 by Zhang and co-workers for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum [8]. In the proposed method, the analyte was captured by anti-TSH Ab immobilized on a support. Biotinylated anti-TSH Ab and  $\text{Eu}^{3+}$ -labelled streptavidin (SA) were then added to form the immunocomplex “capture Ab – TSH – biotinylated anti-TSH Ab –  $\text{Eu}^{3+}$  – SA”. After unbound reactants were removed, the Eu bound to the immunocomplex was extracted by diluted nitric acid and measured by ICP-MS. In this work, the Eu signal was proportional to the TSH concentration. The selection of Eu, a lanthanide (Ln), as reporter in this first application was a good choice both from the point of view of the sample (background levels of lanthanides in biological samples are almost negligible) and the detection technique since their ionization efficiencies are high in ICP-MS [9]. In addition, the Ln series consists of 14 stable elements (promethium is radioactive) with their corresponding isotopes, thus allowing for high multiplexing capabilities (care should be taken to avoid spectral interferences, particularly those derived from oxide polyatomic ions of the lighter lanthanides). In this vein, a strategy commonly reported is the use of strong complexes formed by lanthanides and other reagents which have additional groups able to bind to a recognition biomolecule [10]. The two compounds most used within this context are diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)-based tags [11–14]. Sensitivity can be increased by using labels containing more than one atom of the reporter metal. As such, the use of Ln-containing polymer microspheres (2  $\mu\text{m}$  in diameter) has been proposed [15]. Other alternative, based on the use of polymers containing several DOTA [16] or DTPA [17] units, has gained enormous attention. Nowadays, the latter approach has given rise to the commercial Maxpar® labelling reagents, which are used in a myriad of applications with ICP-MS detection [18–20]



**Fig. 1.** Workflow of the analytical process: preparation of the labelled immunoprobe, procedure for specific recognition of the analyte, and steps (e.g. separation, dilution and/or digestion for liquid samples, or laser ablation sampling for direct analysis of solids) before ICP-MS detection.

for biological fluids and cells. However, problems related with non-specific adsorptions have been described for Maxpar® reagents in the case of biological tissues [21].

In parallel to the use of Ln as reporters, several research works were published in 2002 using gold nanoparticles (AuNPs) as immunoassay labels combined to ICP-MS detection [22–25]. One of the advantages of metal NPs compared to chelates and polymers (that contain a considerable non-metallic part) is the high sensitivity expected, which is attributed to the high ratio of metal atoms detected by ICP-MS per label-size. The approach has been extended to other NPs, including fluorescent metal nanoclusters (NCs), quantum dots (QDs), upconversion nanoparticles (UCNPs) and metal-dye-doped silica nanoparticles (SNPs). Some of these NPs have been employed for advantageous dual detection of the target biomolecules, e.g. photoluminescence and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) along with ICP-MS.

A short description of the characteristics of the NPs habitually used as labels in combination with ICP-MS detection, as well as the common routes to label the recognition biomolecule are briefly described below. Next, the application of probes labelled with NPs for the identification and determination of specific proteins and oligonucleotides by both liquid nebulization and LA-ICP-MS is thoroughly reviewed. Finally, the most significant advances and the challenges faced are underlined in the conclusions section.

## 2. NP-labelled recognition probes: synthesis of NPs, characterization and bioconjugation

NPs exhibit physical and chemical properties different from those of the bulk state or atoms due to quantum-size effects, resulting in specific electronic structures. A lot of effort has been recently driven into develop new and/or improved NPs to be used in various fields (e.g. medicine, catalysis, industry, agricultural activities and (bio)chemical analysis).

Inorganic NPs can be synthesized either by top-down or bottom-up methods, using physical, chemical and green procedures (with biological microorganisms such as bacteria, fungi and plant extracts) [26–29]. The sensitivity expected by ICP-MS will be affected by the detectability characteristics of the metal acting as reporter (e.g. ionization efficiency) and by the number of reporter metal atoms per label. However, it must be kept also in mind that

the attachment of a rather “massive” particle to an Ab can produce negative effects on the physicochemical behavior of that Ab, decreasing its efficacy as recognition biomolecule. Both its size and mass are substantially affected, producing accessibility restrictions to the target biomolecule (particularly critical in the case of biological tissues [30]) as compared to smaller labels such as single metal chelates.

The NPs most usually employed in combination with ICP-MS for determination of specific biomolecules are described below. It must be highlighted that some of these NPs are fluorescent, and this opens the way to use complementary detection techniques. Brief sections related with purification and characterization of synthesized NPs and the bioconjugation of the recognition biomolecules to prepare the labelled recognition probe are also included.

### 2.1. Metallic nanoparticles

AuNPs and AgNPs have attracted special attention in the (bio) analytical field [31,32] due to their localized surface plasmon resonance (LSPR) absorption bands. Optical response of these NPs can be tailored over a broad spectral range by changing the particle size, shape, dielectric environment and arrangement.

Spherical (or quasi-spherical)-shaped metallic NPs can be considered as the most interesting biomolecule-labels for ICP-MS detection, since they are highly compact NPs with a high ratio of reporter element per NP diameter. The synthesis of AuNPs and AgNPs by chemical reduction consists of two major steps: (i) reduction of the metal salt, and (ii) stabilization [29,33]. Nucleation and growth of NPs are governed by reaction parameters, including concentration and type of precursor, reducing and stabilizing agents, as well as molar ratio of stabilizer and precursor, reaction temperature, reaction time, and pH.

The use of citrate (both as stabilizing and reducing agent) for the synthesis of AuNPs, by reduction of HAuCl<sub>4</sub>, has been very popular since its introduction in 1951 [34]. It is possible to produce AuNPs with diameters typically larger than 10 nm using such procedure. Modifications of the initial synthesis route produced AuNPs with better size homogeneity [29]. The approach can be also applied to the synthesis of AgNPs [33].

Fluorescent metal NCs with diameters smaller than 3 nm constitute a specific type of NPs. NCs of elements like Au, Ag or Pt do

not have LSPR absorption in the visible (VIS) - near infrared (NIR) regions, but they display tunable fluorescence which makes their use as fluorescent reporters in biomedical assays feasible [35–37]. In addition, their small size as compared to bigger NPs is advantageous for their use as labels (as indicated above).

Metal NCs are composed of a few to several hundred metal atoms. The selection of appropriate ligands capable of stabilizing NCs is of key importance to enhance NCs fluorescence [38–40]. Small molecules containing thiol groups are stabilizers commonly employed in metal NCs synthesis. Polymers, DNA, peptides and proteins are used as templates in some fluorescent metal NCs synthesis [38]. However, voluminous scaffolds present difficulties to remove the free templates and isolate the NCs.

## 2.2. Quantum dots

Semiconductor nanocrystals, or QDs, comprising elements from the periodic groups II–VI, III–V or IV–VI, are roughly spherical and highly luminescent NPs with diameters in the range 1–12 nm. Quantum confinements are responsible for the attractive optoelectronic properties of QDs, including high emission quantum yields, and tuneable and narrow (typically 15–40 nm) spectral bands [41]. CdSe, ZnSe, CdTe and PbS are examples of QD composition. Coating the QD surface with a shell of an inorganic wide-band semiconductor reduces non-radiative surface deactivations and results in brighter emission, such as CdSe coated with ZnS (CdSe@ZnS) [42]. Most common synthesis processes render QDs inherently hydrophobic. In order to make CdSe@ZnS water-soluble, they can be coated, for example, with mercaptoacetic acid [42] or with an amphiphilic polymer [43]. Furthermore, QDs have been also evaluated as host lattices using transition-metal and Ln ions as dopant agents [44]. Such dopants increase the lifetime of the QDs fluorescence, giving rise to a phosphorescence-like emission.

## 2.3. Upconversion nanoparticles

Luminescent UCNPs generally consist of an inorganic optically transparent crystalline host lattice that primarily serves as a scaffold where luminescent Ln<sup>3+</sup> dopant ions are embedded at low concentrations in appropriate positions. Fluoride-based lattice systems such as NaYF<sub>4</sub> and LaF<sub>3</sub> are habitually employed [45]. These systems are doped with a single Ln<sup>3+</sup> ion or a combination of two Ln<sup>3+</sup> ions (Yb<sup>3+</sup> serves as a sensitizer ion absorbing NIR light and transferring the excitation energy to a neighboring activator ion such as Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> and Ho<sup>3+</sup>). Minimization of surface quenching can be achieved by coating the NP with a protective shell of the host material or silica [46].

## 2.4. Dye-doped silica nanoparticles

SNPs can contain large numbers of dye molecules within a silica matrix. As a result, their fluorescence intensity is higher than single organic fluorophores. A wide variety of organic dye molecules, QDs, metal NPs, metallic ions, or magnetic NPs (MNPs) can be incorporated into SNPs giving rise to multi-functional NPs. Additionally, reactive groups (e.g. amine, carboxyl, or thiol) can be introduced in the SNP surface by attachment to additional silica layers.

## 2.5. Purification and characterization of nanoparticles

Laboratory-synthesized NPs (and, in many cases, commercial NPs) should be purified to remove rests of reactants. For such purpose, centrifugation, ultrafiltration or dialysis can be used. Additionally, it is convenient to isolate NPs as monodisperse as possible from polydisperse NPs. For such isolation, powerful

separation techniques like chromatography [47,48], electrophoresis [49] and field flow fractionation [48,50] play an important role [51,52].

Characterization of NPs can be performed in terms of several features, such as average size and size distribution, aggregation/agglomeration state, shape, crystal structure, stability, solubility, chemical composition, functional groups, number of atoms per NP, concentration, etc. Scattering techniques (e.g. dynamic light scattering, zeta potential and X-ray diffraction), electron microscopy, spectroscopic techniques (e.g. absorbance, luminescence), thermal analysis, and mass spectrometry (e.g. ICP-MS, electrospray-MS) [53] are among the techniques of interest for NPs characterization. Here, it should be highlighted that the recent instrumental advances and the improved methods developed in single particle (SP)-ICP-MS allow the reliable measurement of size and size distribution of NPs in suspensions as well as NPs concentration [54–56]. In SP-ICP-MS, the transient signals induced by the flash of ions arising from the ionization of NPs entering the ICP can be individually measured by MS as long as only one transient signal appears during a given dwell time. Signal intensity is a function of NP size and frequency of the pulse signal is correlated with the particle number concentration. In addition, the on-line coupling of separation techniques to SP-ICP-MS, such as capillary electrophoresis or asymmetric flow FFF (AF4), allows NPs to be distinguished by their shape or to characterize NPs with different coatings [54,57].

## 2.6. Biomolecule-labelling with nanoparticles

### 2.6.1. Bioconjugation approaches

Non-covalent binding is a simple way to label biomolecules with NPs, as they can be attached electrostatically, through hydrophobic interactions, or by specific binding affinity like “avidin (or neutravidin) – biotin” and “SA – biotin” interactions [58]. Alternatively, major strategies for conjugation include direct attachment of a thiolated biomolecule to the AuNPs surface [59,60] or through intermediate linkers like amine – carboxylate coupling (carbodiimide coupling, i.e. EDC chemistry) [61], maleimide chemistry to conjugate primary amines to thiol groups [62] and click chemistry [63] (see Fig. 2).

For the synthesis of the labelled nanoprobe, it is important to choose the appropriate conjugation strategy to link the recognition molecules to the NPs. Biomolecules spontaneously adsorb to the NP surface due to electrostatic and hydrophobic interactions. Although this is the simplest conjugation strategy, the requirement of a high concentration of the recognition molecule, random orientation, bond strength depending on pH and ionic strength, and the replacement by other molecules due to the weakness of the interaction, are some of the major shortcomings [64,65]. The avidin-biotin system and covalent strategies through intermediate reactions (e.g. maleimide or carbodiimide strategies) overcome most of the above drawbacks. However, in some cases poor conjugation efficiency as well as heterogeneous distribution of recognition probes (due to the inability to control biomolecule orientation on the NP surface) can be obtained [66]. Binding orientation maximizes the functional availability of the recognition probe [67]. In this context, the click chemistry strategy (generally based on a cycloaddition reaction [3 + 2] between a terminal alkyne and an azide using Cu (I) as a catalyst) is being recently exploited as it ensures control over the orientation in the reaction [66,68]. Moreover, other innovative approaches have been reported to tackle this challenge, such as that presented by S. Kanje et al. [69] where a specific and covalent bond is established by photocrosslinking between a concrete region of the Ab and a Cys-modified domain of a small protein previously linked to MeCAT.

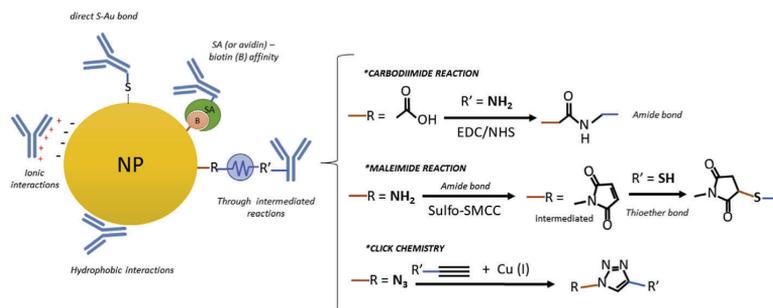


Fig. 2. Summary of common bioconjugation procedures to label biomolecules with NPs (note: the NP is not to scale).

### 2.6.2. Characterization of the labelled nanoprobe

The labelled biomolecules to be employed as detection probes must be isolated from excess of reactants and by-products, and they need to be properly characterized before further use. Isolation of products from excess of reactants can be carried out using separation techniques such as ultrafiltration, electrophoresis, chromatography, AF4, etc. [53]. The reaction efficiency can be calculated by measuring the metal concentrations in the separated fractions (i.e. the free NPs and the bioconjugated NPs) using ICP-MS.

Bioconjugation adds additional characterization parameters to those listed above for NPs, being particularly important the average ratio of NP/biomolecule (i.e. stoichiometric ratio) in the labelled probe, the activity of the recognition biomolecule upon attachment of the NP, and the stability of the labelled probe throughout the intended application. The separation of labelled probes with different stoichiometry can become complex [70] and, thus, just the average NP/biomolecule stoichiometric ratio is characterized in many cases. The average number of biomolecules bound to a NP can be estimated by establishing the ratio of the molar concentrations of biomolecules and NPs in the purified labelled probe. For example, in the case of proteins, assays such as the Bradford test can be used as a first approach to measure the total concentration of protein per labelled probe. This will not provide enough information because some biomolecules can be partially destroyed or impeded for recognition reactions during the preparation of a labelled immunoprobe. Therefore, assays like a quantitative ELISA (in the case of antigens or antibodies bound to the bioconjugated) are required in order to determine the concentration of biomolecules available in the labelled probe for further reaction with the analyte [71].

## 3. Application of NP-labelled recognition biomolecules and ICP-MS detection

At least ten different aspects can be considered to classify the applications related to NP-labelled recognition biomolecules combined with ICP-MS detection: (i) the kind of target biomolecule (proteins, DNA, or RNA), (ii) the number of target biomolecules: single target determination or simultaneous determination of several targets (i.e. multiplexing), (iii) the nature of the biological sample (liquid, cell culture or tissue), (iv) the procedure to label the biomolecule used as detection probe (see above section), (v) the specific reaction between the target and the recognition molecule (e.g. immunoreaction for proteins and hybridization for nucleic acids), (vi) the detectable label (e.g. metallic NPs, metallic NCs, QDs, UCNPs, or doped SNPs), (vii) the combination of strategies for dual (or multi)-amplification, (viii) the detection by more than one technique (e.g. fluorescence, fluorescence resonance energy transfer

(FRET), phosphorescence, upconversion luminescence, SERS and ICP-MS), (ix) the use of magnetic separation in the analytical method, and (x) the ICP-MS sample introduction mode (e.g. liquid nebulization or LA sampling). The following review sub-sections will separate applications according to the last aspect (both sections will also encompass the other aspects outlined above).

### 3.1. NPs as labels of specific-recognition reactions combined with detection by liquid nebulization-ICP-MS

Tables 1 and 2 collect, nearly in chronological order, representative bioanalytical methods published for the determination of biomolecules through the use of NPs as labels of primary antibodies (Ab1), secondary antibodies (Ab2), or oligonucleotides in specific-recognition reactions using liquid nebulization-ICP-MS. It must be noted that a reference in Table 1 deals with ICP coupled to atomic emission spectrometry (AES) detection [72], while in another the sample is introduced through electrothermal vaporization [73]. AuNPs are the most commonly employed detectable labels of specific-recognition processes and ICP-MS detection. This fact can be attributed to different aspects: (i) Au is non-toxic and is present at negligible levels in the human body, (iii) the AuNPs synthesis procedures are well established because extensive research has been conducted to synthesize water-soluble and stable AuNPs, and (ii) Au is a monoisotopic element and, consequently, high signal amplification can be expected by ICP-MS even when small AuNPs are employed.

All the research articles compiled in Table 1 made use of AuNPs as labels. In those cases where more than one analyte was detected (multiplexing) the other label(s) is(are) also presented in that Table. In contrast, AuNPs were not employed in representative literature collected in Table 2. In both Tables different items have been summarized: (i) details of the NPs selected for the bioanalytical method, either for target-capture (e.g. MNPs and magnetic micro-particles (MMPs)) or as detection labels, (ii) the target(s) and the type of samples analyzed, and (iii) a brief description of the corresponding method along with the DLs achieved, if provided by the authors. It is important to note that some steps of the working procedures have not been mentioned (such as blocking or cleaning/washing steps) to simplify the contents of both Tables. Of course, if the reader is interested in a particular method, it is compulsory to consult the corresponding research article.

AuNPs have been conjugated with recognition molecules such as antibodies and oligonucleotides for the detection of targets whose presence is crucial to be known at very low concentrations, like tumor-biomarkers (e.g. PSA [74], CA19-9 [88], CEA [81,91] and AFP [91,99]), tumor cells [85,93,94,106], bacteria (e.g. E. coli [79] or salmonella [89]), viruses (e.g. dengue virus [59]), virions (e.g. avian

**Table 1**  
Determination of biomolecules with AuNPs labels of specific-recognition reactions by liquid nebulization-ICP-MS. Applications for the multiplex detection of more than one analyte are also collected in the Table, using other metallic label(s) in addition to AuNPs.

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the method & detection limits	Ref.
*Goat-anti-rabbit IgG (Ab2) labelled with 15 nm citrate-stabilized AuNPs	A: rabbit-anti-human IgG	Human IgG was first immobilized to a solid phase. The rabbit-anti-human IgG and Ab2 – AuNPs were then added to form a sandwich complex of human IgG – rabbit-anti-human IgG – Ab2 – AuNPs. Then, the immunocomplex was dissociated with diluted nitric acid. DL: 0.4 ng mL <sup>-1</sup> of rabbit-anti-human IgG.	[22]
*Nanogold® – Fab', consisting of corresponding affinity Fab' fragments covalently bound to AuNCs, *Eu-labelled monoclonal anti-FLAG conjugate (6–10 atoms of Eu per Ab)	A: Human IgG, 3 x FLAG-BAP & GST-Smad2 proteins	Analyte immobilization through reaction between maleic anhydride (plates) with the N-terminal and lysine amine groups of proteins, and then with the corresponding Ab1. Next, Nanogold® – Ab2 was added. Finally, the plates were treated with diluted hydrochloric acid. Two protein targets were determined, simultaneously (human IgG & 3 x FLAG-BAP, or GST-Smad2 & 3 x FLAG-BAP). Linear range: 2–100 ng mL <sup>-1</sup> of proteins.	[23]
*Goat anti-rabbit Fab' – Nanogold®	A: Smad2 protein S: COS & C2C12 cells	Cells were fixed, blocked with 1%BSA/PBS and then probed with rabbit anti-Smad2 Ab. The cells were washed, probed with goat anti-rabbit Fab' – Nanogold® and digested with hydrochloric acid.	[24]
*Goat anti-human Fab' – Nanogold®	A: human IgG	Different immunoassays formats were evaluated: (i) centrifugal filtration to discriminate between bound and unreacted Fab' – Nanogold, (ii) immunoprecipitation assay with protein A sepharose to precipitate the target and allow a reaction to occur with Fab' – Nanogold, and (iii) use of a column of sephacryl S200 to separate unbound Fab' – Nanogold from IgG/Fab' – Nanogold.	[25]
*1 μm polyamine-MMPs functionalized with anti-prostate-specific antigen (PSA) monoclonal Ab (mAb), *30 nm AuNPs with hybridized oligonucleotides & anti-PSA polyclonal Ab (pAb)	A: PSA	Functionalized MMPs were used to extract PSA. The MMP – PSA were separated. Then, the AuNPs probes were added. The AuNPs probe reacted with the PSA on the MMPs and provided DNA strands for PCR. Afterward, the MMPs were separated and DNA strands were dehybridized from the NPs and separated for PCR. Alternatively, the AuNPs were detected by ICP-MS (DL: 30 attom of PSA).	[74]
*Goat anti-mouse (Ab2) – 10 nm AuNPs	A: c-myc peptide epitope attached to synthetic aquaoligonucleotides	Oligonucleotide-peptide conjugates were immobilized on a nitrocellulose membrane. Then, the samples were incubated with an anti-c-myc mAb, followed by incubation with the AuNPs probe. To finish, digestion with aqua regia was carried out. Estimated DL: 0.2 pmol of DNA.	[75]
*Oligonucleotides capable of hybridizing with half of the target DNA sequence labelled either with 13 nm citrate-stabilized AuNPs or 400 nm SiNPs, *amino-MMPs functionalized with capture oligonucleotides capable of hybridizing with the other half	A: Target DNA	Amino-modified MMPs functionalized with DNA were utilized to capture and separate target DNA, which then underwent hybridization with SiNPs or AuNPs probes in solution. A magnetic field was applied to separate the sandwich structure from the rest of the solution. The resulting system was dissolved by diluted aqua regia. DL: 350 pM DNA using ICP-AES detection.	[72]
*Goat-anti-rabbit IgG labelled with citrate-stabilized AuNPs (NPs of 10 and 15 nm were compared)	A: anti-erythropoietin Ab (anti-EPO Ab) S: human serum	Recombinant human (rhEPO) was immobilized to a solid phase and, then, captured anti-rhEPO Ab. The captured anti-rhEPO Ab reacted with Au-labelled goat-anti-rabbit IgG Ab. The immunocomplex was dissociated with diluted nitric acid. DL: 10.7 ng mL <sup>-1</sup> of anti-EPO Ab.	[76]
*Apt29 (binds to the heparin-binding site of thrombin) – 10 nm AuNPs, *Apt15 (binds to the fibrinogen-binding site of thrombin) attached to SA – MMPs (1.05 μm)	A: α-thrombin S: human serum	α-Thrombin was sandwiched between two aptamers: the first attached to MMPs & the second to AuNPs. The sandwich complex was isolated from the sample with a magnet. After washing, the sandwich complex was heat dissociated, the MMPs were removed, leaving AuNPs in the solution. DL: 10 pM of α-thrombin.	[77]
*AFP antibody adsorbed on AuNPs (AuNPs with average diameters of 20, 45, and 80 nm were tested)	A: α-fetoprotein S: human serum samples	A competitive immunoassay was developed. Detection was carried out by SP-ICP-MS.	[78]
*mAb for E. coli O157:H7 – 10 nm AuNPs (ca. 30000 Au atoms per NP)	A: E. coli O157:H7	Anti-E. coli O157:H7 Ab-AuNPs were mixed with E. coli O157:H7 and incubated. The separation of cells (micrometer size) was achieved by centrifugation. The cell pellets were redispersed and digested with diluted nitric acid. DL: 500 E. coli O157:H7 cells mL <sup>-1</sup> .	[79]
*Anti-mouse IgG Ab2 conjugated with 40 nm AuNPs (3.5 × 10 <sup>6</sup> Au atoms estimated per NP)	A: ochratoxin A (OTA) S: wine	Indirect competitive immunoassay. The solid support was coated with OTA-BSA followed by incubation of sample and Ab; washing removes unbound Ab. Then, incubation with Ab2 – AuNPs and acid digestion. DL: 0.003 μg L <sup>-1</sup> of OTA.	[80]
*CEA Ab2 labelled with 12 nm citrate-stabilized AuNPs	A: carcinoembryonic antigen (CEA) S: human serum	CEA Ab1 was attached to the solid substrate. CEA-containing solutions and "CEA Ab2 – AuNPs" were added and incubated. Immunogold-silver amplification was carried out followed by silver detection. DL: 0.03 ng mL <sup>-1</sup> of human CEA.	[81]
*AuNPs (28 nm) functionalized with two sets of single-stranded DNA (probe 1 & probe 2)	A: DNA	DNA targets were hybridized with AuNP-probe 1 and AuNP-probe 2 in buffer solution and the solution of AuNP aggregates was introduced into SP-ICP-MS for detection.	[82]
*Amino-MMPs functionalized with the capture probe, *thiolated oligonucleotide (designed for the selected RNA fragment) – 20 nm AuNPs as reporter probe	A: A virus-specific RNA sequence of dengue virus serotype 2 (DENV2) S: BHK-21 cells	The MMPs probe was added to capture and isolate the target oligonucleotide. The AuNPs probes were then added to form a sandwich structure with the MMP – target oligonucleotide. After removing the unbound AuNPs, the AuNPs on the MMP surface were thermally released. DL: 1.6 fM of the target oligonucleotide.	[59]

Table 1 (continued)

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the method & detection limits	Ref.
*300 nm amine-functionalized silica coated MMPs, *thiolated DNA aptamer for targeting cytochrome c (cyt c) labelled with 14.8 nm AuNPs, *anti-insulin Ab labelled with 34.1 nm AgNPs	A: cyt c & insulin S: human serum	The sample was added to the surface-activated MMPs suspension and incubated. Then, the aptamer – AuNPs & Ab – AgNPs were added and incubated. The MMPs were separated magnetically, redispersed and the suspension heated to dissociate the ab – antigen and aptamer – protein complexes. The MMPs were removed magnetically and the solution with the AuNPs & AgNPs released from the MMPs was analyzed. DLs: 1.5 fmol for cyt c & 5.5 fmol for insulin.	
*Chloramphenicol (CAP)-BSA protein labelled with 10 nm AuNPs	A: CAP	Wells were pre-coated with rabbit-anti-mouse IgG. Then, Ab-anti-CAP coated each well. Afterward, CAP-BSA labelled with AuNPs premixed with the analyte was added and incubated. Finally, it was treated with diluted aqua regia. DL: 4.52 ng mL <sup>-1</sup> of CAP.	[84]
*Anti-CD3 conjugated to 200 nm MMPs as capture probe, *anti-CD2 labelled with 15 nm AuNPs	A: Jurkat T cells S: human blood	Jurkat T cells were immunomagnetically separated with anti-CD3 – conjugated MMPs. Then, captured Jurkat T cells were incubated with AuNPs – anti-CD2. The immunocomplex of MB – anti-CD3 – Jurkat T cells – anti-CD2 – AuNPs was dissociated in diluted formic acid. DL: 86 Jurkat T cells.	[85]
*Biotinylated DNA (aptamer) bioconjugated with SA – 15 nm AuNPs, *SA – MMPs (1 μm)	A: DNA S: human serum	Dual amplification (rolling circle amplification on SA – MMPs & subsequent labelling with bioconjugated AuNPs). For detection, the AuNPs-tagged MMPs were dispersed in diluted nitric acid and then heated at 90 °C. DL: 10 <sup>-16</sup> M of DNA.	[86]
*SA – 15 nm AuNPs	A: HIV-1 p24 antigen S: human serum	Sandwich type immunoreaction with anti-HIV-1 p24 mAb (immobilized), p24 antigen, biotinylated anti-p24 pAb & SA – AuNPs. Diluted nitric acid was used to introduce the AuNPs in the ICP-MS. DL: 1.49 pg mL <sup>-1</sup> of p24 antigen.	[58]
*25 nm AuNPs, *25 nm AgNPs, & *20 nm PtNPs, each functionalized with proper HIV, HAV or HBV probe strands	A: three DNA targets associated with clinical diseases (HIV, HAV and HBV)	DNA capture strands were immobilized. DNA targets were added into the well and mixed with the NP – DNA probes. Then, DNA targets hybridized with DNA capture strands and NP – DNA probes to form sandwich conjugations. NP – DNA probes were thermally released and measured by SP-ICP-MS.	[87]
*112.5 nm amino-functionalized silica-coated multicore MNPs (MMNPs) consisting on Cs and fluorescein isothiocyanate (FITC) silica cores & Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , *10 nm AuNPs labelled with Ab2	A: CA19-9 S: human serum	The MMNPs extracted CA19-9 non-specifically. The isolated MMNPs were tagged with Ab1 of CA19-9 and then detected through AuNPs labelled with Ab2. The Au/Cs ratio was measured for higher precision. DL: 0.02 units mL <sup>-1</sup> of CA19-9. FITC allowed fluorescence monitoring.	[88]
*mAb M3038 bioconjugated to popcorn-shaped 44 nm AuNPs	A: salmonella DT104	Salmonella was incubated with Ab – AuNPs. Dual detection: SERS for fast identification and, after centrifugation to isolate the nano-hybrids and acid digestion, ICP-MS for quantification. DL: 100 CFU mL <sup>-1</sup> salmonella DT104.	[89]
*Oligonucleotide – 30 nm AuNPs containing thiol modified P1 & P2, *reporter DNA modified – 5 nm AuNPs, *hairpin DNA – functionalized MMPs	A: hepatitis B virus DNA target S: serum & lysates of HeLa cell	Triple amplification: nicking–displacement, rolling circle amplification & AuNPs. Hairpin DNA-functionalized MMPs were used for capture of targets and displacement process. The final product was treated with 0.01 M HCl-0.5 M NaCl-0.5 mM Br <sub>2</sub> solution, and then heated at 90 °C for 30 min to remove any remaining bromine. DL: 3.2 10 <sup>-17</sup> M of DNA.	[90]
*500 nm boronic acid functionalized MMPs for glycoproteins capture, *anti-AFP – 20 nm AuNPs, *anti-CEA – 8 nm AgNPs	A: alpha-fetoprotein (AFP) & CEA S: human serum	AFP and CEA were captured with functionalized MMPs. Then, labelling probes were added and incubated. Under an external magnetic field, MMPs were separated from the solution and then the labelling probes were eluted with diluted formic acid. DL: 0.086 μg L <sup>-1</sup> for AFP & 0.054 μg L <sup>-1</sup> for CEA.	[91]
*Goat anti-rabbit IgG (Ab2) – AuNPs	A: caspase 3 S: cell lysates of Hg <sup>2+</sup> -induced HepG2	An immunocomplex of caspase-3, rabbit anti-caspase-3 Ab1 & Ab2 – AuNPs was formed. After incubation and washing, diluted nitric acid was added. DL: 0.42 ng mL <sup>-1</sup> for caspase-3.	[92]
*Carboxyl-MMPs conjugated with Ab against epithelial cell adhesion molecule (anti-EpCAM), *DNA concatemers labelled by SA – 12 nm AuNPs	A: HepG2 cells S: peripheral blood	Dual amplification: hybridization chain reaction & AuNPs. Target cells were firstly captured by anti-EpCAM conjugated MMPs, then labelled by DNA concatemer-AuNPs, and detected according to the Au signal after elution with citric acid. DL: 15 HepG2 cells.	[93]
*Carboxyl-MMPs conjugated with anti-EpCAM Ab, *anti-MUC1 – 15 nm AuNPs, *anti-ASGPR – 7 nm CdSe QDs	A: EpCAM & ASGPR in HepG2 cells; EpCAM & MUC1 in MCF-7 cells S: human blood	HepG2 & MCF-7 cells were captured by functionalized MMPs and then specifically labelled by CdSe QDs-anti-ASGPR & AuNPs-anti-MUC1, respectively (Cd & Au signals). DLs: 89 HepG2 & 50 MCF-7 cells.	[94]
*SA – 40 nm AuNPs	A: aflatoxin M1 S: milk	Competitive immunoassay in which free aflatoxin M1 inhibits the binding of specific Ab to the solid phase coated with aflatoxin M1-BSA. Biotinylated Ab2 and SA – AuNPs were added. For detection, AuNPs were treated with a digestion acid mixture. DL: 0.005 μg kg <sup>-1</sup> of aflatoxin M1.	[95]
*Anti-influenza A H9N2 hemagglutinin mAb (mAb-HA) conjugated with carboxyl-MMPs (1 μm), *mAb-HA labelled with 20 nm citrate-stabilized AuNPs	A: avian influenza A (H9N2) virions S: chicken dung	Immuno-MMPs were incubated with H9N2 virions. After magnetic separation, the bead-virions complexes were washed. Then, immuno-AuNPs were added and incubated. The complexes were washed, and detection was carried out after treatment with diluted acetic acid to destroy the bead-virions – AuNPs complexes. DL: 0.63 ng mL <sup>-1</sup> H9N2 virions.	[96]
		Dual amplification: hybridization chain reaction & AuNPs. H9N2 virions from samples were captured by mAb-HA conjugated	[97]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the method & detection limits	Ref.
*mAb-HA conjugated MMPs prepared by coupling anti-H9N2 HA onto the surface of carboxyl-MMPs, *Mannose modified DNA concatemer labelled with 12 nm SA – AuNPs	A: avian influenza A (H9N2) virions S: chicken dung & serum	MMPs. The MMPs-H9N2 virions complexes were labelled by concanavaline A (Con A). Then, the functionalized AuNPs were added for the labelling of H9N2 virions through the recognition of Con A and mannose, and afterward were magnetically separated. DL: 0.12 ng mL <sup>-1</sup> H9N2 virions.	
*SA – MMPs, *TSH Ab labelled with AuNPs, *Eu <sup>3+</sup> labelled free thyroid hormone (FT4) Ab	A: TSH & FT4 S: human serum	The method comprises SA-MMPs, the biotinylated Ab, and the metal labelled Ab. A one-step immune reaction was conducted before the MMPs were added to absorb the complexes. DLs: 0.06 mU L <sup>-1</sup> of TSH & 1.59 pmol <sup>-1</sup> of FT4.	[98]
*SA – citrate stabilized 15 nm AuNPs (3 nm & 30 nm AuNPs were also compared)	A: alpha fetoprotein (AFP) S: human serum	Dual amplification: tyramide signal amplification & AuNPs. After immobilization of anti-AFP1, the sample is added. Next, anti-AFP2-HRP, biotin – tyramine (it deposits on the nearby proteins in the presence of anti-AFP2-HRP) and SA – AuNPs were subsequently added. After incubation, the excess is removed and treated with diluted formic acid. DL: 1.85 pg mL <sup>-1</sup> of AFP.	[99]
*A fluorescent dye (FAM) bound to a biotin modified aptamer (FAM-Apt) was fixed to SA – MMPs (1 μm). *Biotin-modified complementary to Apt-FAM (c-Apt) was fixed to SA – 15 nm Au NPs	A: MCF-7 cells S: human whole blood	Counting of MCF-7 cells by ICP-MS and imaging by fluorescence microscopy was achieved. During the incubation, the target MCF-7 cells would bind with the aptamer modified on MBs and release AuNPs for ICP-MS measurement. The MB-bound MCF-7 cells can be collected with a magnet, and the fluorescence (FAM) image of MCF-7 cells observed. DL: 81 MCF-7 cells	[100]
*AuNCs conjugated on to metal organic frameworks (MOFs) through a peptide. The MOFs contain anticancer drug, and were modified with pegylated folate	A: caspase-3 S: HepG2 cells	Endocytosis was mediated by receptor-ligand interactions. The anticancer drug was released and initiated death of cells. To monitor the treatment process, the peptide linking AuNCs to MOFs was cleaved by caspase-3 and the quenched fluorescence of AuNCs on MOFs was recovered. The fluorescence allows in situ and real-time imaging. Quantification was carried out by ICP-MS. DL: 0.12 ng mL <sup>-1</sup> of caspase-3.	[101]
*AuNPs (30 nm) functionalized with DNA primer containing a photocleavable linker light sensitive spacer, * Oligonucleotides – 1 μm MMPs	A: E. coli O157 16S rRNA S: skim milk	AuNPs are incubated with the target, enabling selective capture. Then, they are incubated with the capture probe to form a sandwich structure. After washing, the system undergoes illumination, causing the AuNPs and MBs to fall apart at the point of light sensitive spacer. Then, the AuNPs are separated from the beads and introduced into SP-ICP-MS. DL: 10 fM.	[102]
*SA – Nanogold®, *Eu <sup>3+</sup> labelled mouse-anti-human IgG Ab	A: albumin & IgG S: whole blood, plasma & dried blood spots	Albumin was analyzed with Nanogold® labelling following a competitive assay. After the samples and the biotinylated albumin were incubated in wells containing immobilized rabbit-anti-human albumin, the wells were washed and treated with the Au probe. For simultaneous determination of IgG, goat-anti-human IgG was immobilized and detected with an Eu probe.	[103]
*SA – 40 nm & 80 nm AgNPs & AuNPs were compared	A: aflatoxin M1 S: milk	Comparison of three competitive formats: (i) Ab binding inhibition assay (ABIA); (ii) capture inhibition assay; and (iii) capture bridge inhibition assay. After dissolution of the Au (or Ag) labelled SA with digestion acid, thiourea solution containing internal standard were added. The best DL was afforded by ABIA strategy: 0.1 ng kg <sup>-1</sup> for aflatoxin M1.	[104]
*Hairpin structured DNA bound to 15.9 nm citrate stabilized AuNPs, *SA - MMPs (1 μm)	A: target DNA S: human serum	Dual amplification: isothermal circular strand-displacement polymerization reaction & AuNPs. The amplification was conducted on the surface of AuNPs. By using a biotin modified primer, AuNPs were connected to biotins after the amplification, and later captured by SA – MMPs. AuNPs were desorbed before detection by ultrapure water under 95 °C. DL: 8.9 fM of target DNA.	[105]
*15 nm citrate-stabilized AuNPs functionalized for DNA detection (signal probe) to hybridize with the ssDNA	A: circulating tumor cells (HepG2) S: human blood	Dual amplification: rolling circle amplification & AuNPs. HepG2 cells were captured by anti-EpCAM on a microplate and were labelled with anti-asialglycoprotein receptor-biotin. After incubation with SA, the immunosystem was labelled with biotin-RCA-primer on the extra sites of the SA grafted on the cell surface. Under the catalysis of phi29 DNA polymerase, a long ssDNA was generated and detected with the AuNPs probe. DL: 3 HepG2 cells (15 cells mL <sup>-1</sup> ).	[106]

influenza A (H9N2) virions [96,97]), and toxins (e.g. aflatoxin M1 [95,104] and ochratoxin A [80]). The most common chemical bioconjugation mechanisms for the labelling process have been schematized in Fig. 2. Also, a critical comparison of bioconjugation reactions is presented in section 2.6.1.

AuNPs collected in Table 1 can be divided in two main groups: (i) commercially available “Nanogold®” consisting on 1.4 nm AuNPs [23–25,103], and (ii) larger AuNPs usually prepared under citrate reduction, with average diameters typically between 10 and 40 nm (the higher the number of Au atoms the higher the amplification expected). For example, Nanogold® contains ca. 70 Au atoms per

NP [23], while about 30000 Au atoms per NP are estimated in 10 nm AuNPs [79]. However, an advantage of the smaller probes is that they reach more targets and penetrate easier into cells and tissues. Nowadays, Nanogold® covalently bound to Fab', or to IgG Ab2, or to SA, is commercially available. Simultaneous detection of more than one target biomolecule has been tackled by combining the use of AuNPs with other metallic labels, such as Eu<sup>3+</sup> [23,98,103] or NPs (e.g. AgNPs [83,87,91,104], PtNPs [87] and CdSe QDs [94]), as labels of antibodies (Table 1).

Table 2 collects examples in which AuNPs are not employed. NPs used as detecting labels include AgNPs [118], PtNCs [37], AgNCs

**Table 2**

Research work published for determination of biomolecules with NPs, where AuNPs were not used as labels of specific-recognition reactions, by liquid nebulization sample introduction and ICP-MS detection.

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the analytical method & analytical performance characteristics	Ref.
*Biotinylated goat anti-human IgG labelled with SA – CdSe@ZnS QDs (ca. 570 Cd atoms and 115 Se atoms per QD)	A: IgG S: human serum	Method based on immunoaffinity monolithic capillary microextraction (Ab1 was immobilized on the capillary). The sandwich immunocomplex of Ab1, antigen and Ab2 labelled with CdSe QDs was formed. IgG was quantified by determination of Cd or Se in QDs. DL: 0.058 $\mu\text{g L}^{-1}$ (based on Cd) & 0.097 $\mu\text{g L}^{-1}$ (based on Se) for IgG.	[107]
*Anti-CEA mAb labelled with thioglycolic acid-modified 40 nm PbS NPs	A: CEA S: human serum	Chip magnetic immunoassay method, based on a sandwich-type immunoreaction with PbS NPs labels in combination with electrothermal vaporization ICP-MS. DL: 0.058 $\mu\text{g L}^{-1}$ for CEA.	[73]
*4.5 nm 3-mercaptopropionic acid (MPA) modified – CdTe QDs	A: total urinary protein S: human urine	Samples were incubated in plates and protein attached on the substrate. After removing the unbound material, the wells were incubated with MPA-stabilized CdTe QDs. Unconjugated QDs were removed and the QDs – protein conjugates were dissolved in diluted nitric acid. DL: 0.008 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for human serum albumin.	[108]
*CdSe@ZnS QDs conjugated to an antigen derivative (progesterone-BSA conjugate)	A: progesterone S: cow whole milk	Competitive QDs-based immunoassay. Detection of $^{14}\text{Cd}$ was carried out after acidic digestion. DL: 0.028 $\text{ng mL}^{-1}$ of progesterone (an order of magnitude better than the achieved with the same immunoassay and fluorescence detection).	[109]
*Core@shell SNPs doped with metal ions and dye together and conjugated with ss-DNA tagged with biotin, *MNPs with avidin	A: monitorization of ss-DNA cleavage	Pb, Cd & Cs were doped into a silica core together with FITC, rhodamine B isothiocyanate (RhBITC) or Cy5. 36.2 nm Pb/FITC, 36.0 nm Cd/RhBITC & 38.2 nm Cs/Cy5 NPs were obtained. DNA cleavage by Fenton-type reaction was monitored with the Cs/Cy5 core@shell SNPs. Unbound DNA was separated with the MNPs.	[110]
*20–22 nm amino-functionalized silica coated MNPs conjugated with Ab to extract the target, *106.5 nm amine-functionalized CeO <sub>2</sub> -SNPs with Ab for detection	A: CEA S: human serum	Sandwich-type immunoassay. Particle loss during washing steps was compensated by a radiometric ICP-MS measurement, i.e. the lost particle was monitored by the reduction of the $^{57}\text{Fe}$ signal and compensated by taking the signal ratio of $^{140}\text{Ce}/^{57}\text{Fe}$ for CEA quantification. DL: 0.36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CEA.	[111]
*Ag <sub>3</sub> cluster – aptamer probe	A: membrane IgM S: Ramos cells (live cells)	Bi-functional probe, for <i>in-situ</i> fluorescent labelling ( $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ ) and ICP-MS quantification of membrane proteins.	[112]
*SA – CdSe@ZnS Qdot® conjugated with a biotinylated Ab2 able to bind to the heavy chain of an Ab	A: transferrin, complement 3, APOA1, APOA4 & transthyretin (sequential detection) S: human serum	The quantitative platform developed can be used for different protein targets just by changing the corresponding Ab1. After the immunoassay, acidic digestion was carried out and Cd was measured. Sandwich and indirect immunoassay formats were evaluated. Best DLs were obtained with the sandwich format. DL: 0.18 $\text{ng mL}^{-1}$ of Tf.	[113]
*Phosphorescent Mn-doped ZnS QDs labelled to an Ab2 through EDC/NHS chemistry	A: PSA S: human serum	The sandwich immunoassay consists in the reaction of the PSA with its capture Ab1 (adsorbed on poly-L-lysine surface coated slides) and then reaction with the labelled Ab2. Au deposition on the surface of the NP tags (acting as catalytic seeds) and final digestion allowed detection of PSA at the low attomol $\text{mL}^{-1}$ .	[114]
*86 nm Cs-doped MMNPs with pAb, *metal/dye-doped SNPs: 47 nm Y/RhBITC rhodamine B isothiocyanate)-doped SNPs, or 37 nm Cd/RhBITC-doped SNPs, or 49 nm Au/X-rhodamine-5-(and-6) isothiocyanate-doped SNPs, with mAb	A: c-reactive protein, neuron specific enolase, $\alpha$ -fetoprotein S: human serum	The SNPs contained doped elements and fluorescence dyes; so, the immunoreaction can be followed by fluorescence. Cs-doped MMNPs with pAb extracted the targets from the sample. Then, they were tagged with the metal/dye-doped SNPs containing mAb, and then purified by magnetic separation. For quantification, the doped metals of SNPs were measured and the signal ratio to Cs of MMNPs was employed.	[115]
*40–55 nm polyacrylic acid (PAA) coated NaYF <sub>4</sub> :Yb,Er@NaYF <sub>4</sub> UCNP bound to Ab2 via EDC chemistry	A: alpha-fetoprotein S: human serum	Sandwich immunoreaction, using mouse anti-human AFP (mAb1) for capture and labelled mouse anti-human AFP (mAb2) for detection (Ab1 & Ab2 bind to the different epitopes of AFP). Diluted formic acid was added for elution. DL: 0.31 $\text{ng mL}^{-1}$ (based on $^{89}\text{Y}$ signal) & 22 $\text{ng mL}^{-1}$ (based on $^{174}\text{Yb}$ signal) for AFP.	[116]
The probe consisted on Ab2, *a fluorescent dye (Cy3) & *30–70 nm PAA-modified NaYF <sub>4</sub> :Yb, Er UCNP: UCNP-Ab2-Cy3	A: EpCAM expressed on cell surface of HepG2 cells	The multifunctional nanoprobe (UCNPs-Ab2-Cy3) enabled, after a sandwich immunoassay, the imaging by fluorescence/upconversion luminescence as well as to count ( <i>via</i> dissolution with diluted formic acid and measurement of $^{89}\text{Y}$ ) cancer cells. DL: 100 HepG2 cells.	[117]
*SA – 10 nm AgNPs & *SA – 40 nm AgNPs containing $3 \times 10^4$ and $2 \times 10^6$ Ag atoms per NP, respectively	A: CD antigens S: peripheral blood leukocytes	SA-AgNPs facilitated distinct and specific detection of antigens, such as CD8, CD25, CD244 and CD294 pre-incubated with respective biotinylated Ab1. Single cell suspensions were injected at concentrations $<5 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$ into a mass cytometer.	[118]
*Cs-doped MMNPs conjugated with anti-EpCAM, *Monoclonal mouse anti-ASGPR Ab – CdSe@ZnS QDs	A: HepG2 cells S: lysed human blood	MMNPs-anti-EpCAM were used as capture probes & anti-ASGPR-QDs as detection probes in a magnetic immunoassay. For quantification, the sandwich-type immunocomplexes were treated with diluted nitric acid and sonicated, and the Cd/Cs	[119]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the analytical method & analytical performance characteristics	Ref.
*9.5 nm Amino-modified MNPs conjugated with CEA Ab1 to extract the target, *1.6–4.0 nm ZnSe QDs conjugated with Ab2 via EDC	A: CEA S: human serum	ratio was measured. DL: 61 HepG2 cells. In addition, fluorescence of QDs allowed visualization of the cells. MNPs-CEA Ab1 bound to the analyte were separated by a magnet and washed. After that, ZnSe QDs – CEA Ab2 were added, followed by incubation. The sandwich-type immunocomplex was separated by a magnetic force and washed. Then, formic acid dilution and sonication was performed. Detection was carried out by SP-ICP-MS. DL: 0.006 ng mL <sup>-1</sup> for CEA ( <sup>64</sup> Zn <sup>+</sup> signal measured).	[120]
*Amino-coated Cs-doped MMNPs functionalized with an Ab1 against salmonella typhi	A: salmonella typhimurium	Reaction of salmonella typhi with MMNPs-Ab1 to form "MMNP-typhi" and separation from unreacted MMNPs in a micropipette tip filled with 25% polyethylene glycol through magnetophoretic separation. Solution from the bottom of the tip was dissolved in a mixture of 1% HF & 2% HNO <sub>3</sub> . DL: 102 cells mL <sup>-1</sup> .	[121]
*8 nm NPs of apoferritin-templated Eu(III) phosphate (AFEP) & *apoferritin-templated Lu(III) phosphate (AFLP), biotinylated & bioconjugated to the corresponding Ab2	A: two phosphorylated p53 proteins at serine 15 & serine 392 sites (p-p53 <sup>15</sup> and p-p53 <sup>392</sup> ) S: SCC-7 cells	The assay has a sandwich format, and p-p53 <sup>15</sup> and p-p53 <sup>392</sup> were first captured and then recognized by AFEP and AFLP NPs labelled Abs, respectively. The Eu and Lu were then released from the immune complexes under acidic condition for simultaneous measurement. DLs: 200 & 20 pg mL <sup>-1</sup> for p-p53 <sup>15</sup> & p-p53 <sup>392</sup> respectively.	[122]
* NaHoF <sub>4</sub> NPs (12 nm, corresponding to ca 12000 Ho atoms per NP) coated with silica and then decorated with PEG5k	A: rare phenotypes S: cells	Silica shell increased the diameter of the NaHoF <sub>4</sub> NPs to 21.3 nm and PEG modification to 100 nm. NPs were conjugated to thiol-modified Ab1 or Ab2 using thiol maleimide chemistry. <sup>165</sup> Ho was detected by mass cytometry.	[62]
*Anti-IgE Ab labelled via carbodiimide with fluorescent 1.5 nm PtNCs (116 Pt atoms per NC on average)	A: IgE S: human serum	Competitive immunoassay comparing bimodal detection (fluorescence with $\lambda_{em} = 620$ nm and ICP-MS with detection of <sup>195</sup> Pt). DLs: 0.6 ng mL <sup>-1</sup> (fluorometry) & 0.08 ng mL <sup>-1</sup> (ICP-MS) of IgE.	[37]

[112], QDs of varied composition (like ZnSe QDs [120], CdSe@ZnS QDs [107,109,113,119], CdTe QDs [108] and Mn-doped ZnS QDs [114]), UCNPs [116,117] and doped SNPs (e.g. with CeO<sub>2</sub> [111], Cs [121], or metal ions and fluorescent dye together [110,115]). Here, two aspects should be highlighted. Expected sensitivity by ICP-MS for a given NP diameter will be higher for those NPs containing just one type of metal (e.g. AuNPs, AgNPs or PtNPs versus QDs, doped-SNPs or UCNPs). Furthermore, many of the NPs collected in Table 2 (used as detecting labels) allow for bimodal detection of the analyte since they have been doped with a fluorescent dye [112,117] or they possess intrinsic fluorescence emission in the VIS-NIR regions (e.g. PtNCs [36], AgNCs [114] and QDs [109–122]), phosphorescence [116], or upconversion luminescence [118,119].

Most common used recognition assays are heterogeneous and require the use of plastic substrates or magnetic beads. At the last step of the analytical process it is necessary to liberate the NPs before their introduction into the ICP-MS. As can be seen in Tables 1 and 2, diluted acids are generally employed for such purposes, like nitric acid [22,58,76,79,92], hydrochloric acid [23], aqua regia [72,75,84], formic acid [85,91,99], citric acid [93] or acetic acid [96]. Also, a high temperature (e.g. 90 or 95 °C) allowed thermal release in some applications [59,77,87,105].

In the subsections below, attention has been paid to worthy of note advances related to innovative aspects and interesting applications arising from intrinsic NPS features.

### 3.1.1. Separation by using functionalized magnetic nanoparticles and microparticles

Functionalized MNPs and MMPs are currently employed in many bioanalytical protocols. MNPs and MMPs can be manipulated by using an external magnetic field. MNPs and MMPs most frequently employed have Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as core because of their availability and superparamagnetism [123,124]. For fast and efficient isolation of the analytes from the complex matrix of biological samples in ICP-MS applications, MNPs or MMPs with an activated surface (like

amino groups, carboxylic groups, or SA) have been used. For such purpose, MNPs or MMPs can be selected either non-specifically or functionalized with capture antibodies [74,93,94,96,97], aptamers (Apt15 [77]), or DNA [72,90]. Another illustration is the use of boronic acid functionalized-MMPs for glycoproteins capture [91].

As an example, Fig. 3 describes the main steps of a general protocol where functionalized magnetic beads with capture antibodies are employed. In the first step, magnetic beads (previously functionalized with the capture antibodies) are able to capture the antigen in the sample. Then, a magnetic field is applied to separate the antigens from the sample matrix. An Ab2 labelled with an inorganic NP is added to recognize the antigen. Final acid digestion and dilution can be carried out before detection in the ICP-MS.

ICP-MS ratiometric signal measurements between an element in the magnetic particle and the element used as reporter (NPs) will improve the precision associated with the quantification of the target. The element measured from the MNP will act as an internal standard to compensate particle loss in the magnetic separation. This element can be either the Fe of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> silica coated-magnetic nucleus [111] or a doping element in MNPs [115,119]. An interesting tactic within this field employs multicore MNPs containing both Cs and a fluorophore inside silica cores and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNPs, all together encapsulated with a silica shell [88].

### 3.1.2. Single-particle ICP-MS detection

SP-ICP-MS has been investigated for the determination of proteins [78,120] and DNA [82,87,102] using NPs labelled recognition probes. In SP-ICP-MS each pulse signal corresponds to a single NP. Furthermore, detectability of the NP will depend on the number of atoms of the detected element per NP. Therefore, it will be affected by the size of the NP, the composition (e.g. monoelemental NPs versus NPs composed by more of one element), and the ionization efficiency of the detected element. An advantage of SP-ICP-MS compared with the integral mode ICP-MS is that signals of ions unwantedly released from the NPs will appear as background, making possible to detect the

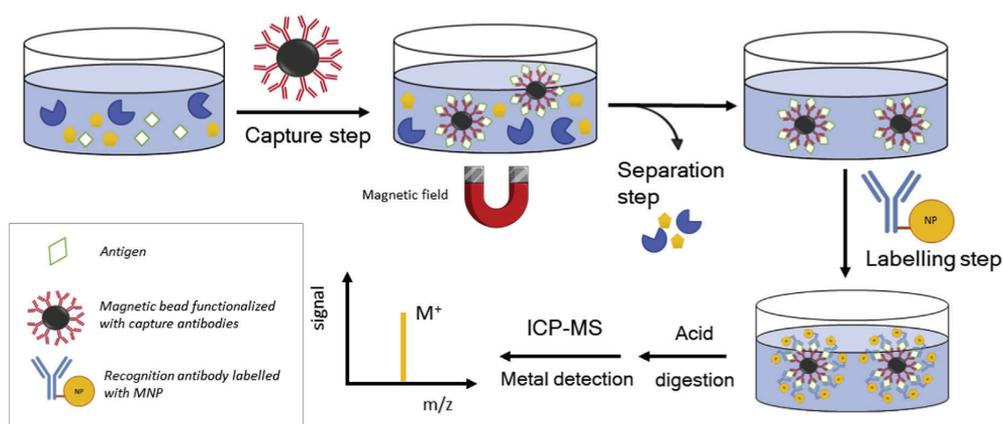


Fig. 3. Example of an immunoassay procedure using magnetic beads for analyte separation purposes (M is the metal reporter in the NP).

signal pulses corresponding to the NPs.

An interesting application, which emphasizes the capabilities of SP-ICP-MS, consists in a rapid and simple one-step homogeneous DNA assay [82]. In the proposed DNA hybridization assay, the first step was to functionalize AuNPs with two sets of single-stranded DNA (probe 1 and probe 2). Then, DNA targets were hybridized with AuNP–probe 1 and AuNP–probe 2 in buffer solution. The formed aggregates lead to decreased concentrations of the AuNPs as well as increased individual sizes. These changes were detected by SP-ICP-MS. The DNA targets were detected at 1 pM, which increases the sensitivity by three orders of magnitude over equivalent colorimetric methods.

### 3.1.3. Combination with additional amplification strategies

The amplification provided by the high number of Au atoms per AuNP can be increased by using tyramide signal amplification (a schematic diagram is presented in Fig. 4). Such an approach has

been employed to detect specific proteins or nucleic acid sequences, as for example the determination of AFP in human serum with a DL as low as 1.85  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of AFP [99]. Additionally, an immunogold-silver enhancement technique, initially developed for sensitive immunohistochemical (IHC) visualization [125,126], was employed at the end of the corresponding recognition process with AuNP labels to achieve higher sensitivity by ICP-MS. In the presence of AuNPs, silver ions are reduced by hydroquinone to yield silver metal on the surface of AuNPs at the end of the immunoassay process [81]. Results reported a 60-fold sensitivity improvement for the detection of CEA in human serum.

In the case of nucleotides, “dual amplification” can be also achieved by resorting to hybridization chain reaction [93,97], isothermal circular strand-displacement polymerization reaction [105], or by rolling circle amplification [86,106]. A “triple amplification” system (nicking–displacement, rolling circle amplification and AuNPs) has been explored as well.

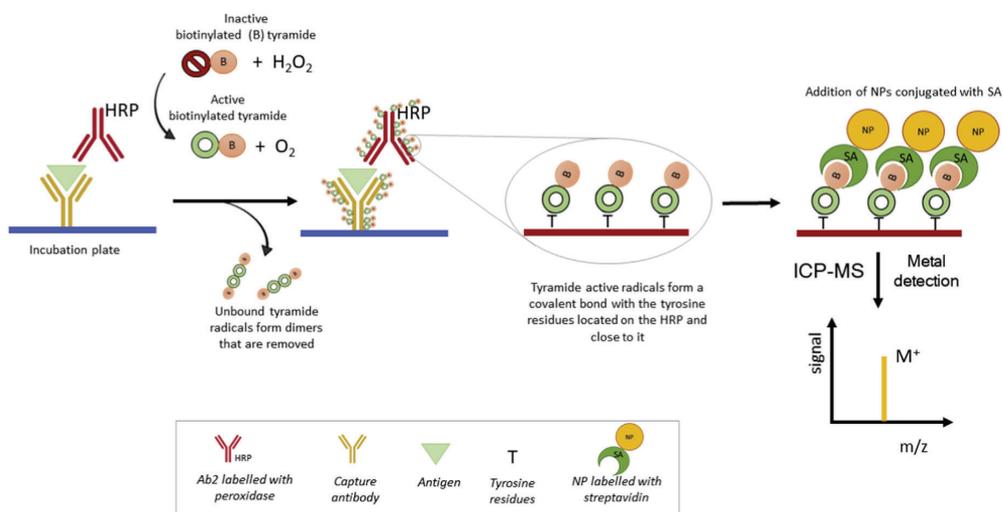


Fig. 4. Schematic diagram of an immunoassay procedure using tyramide signal amplification to increase the amount of NPs for the elemental detection by ICP-MS (M is the metal reporter in the NP). The different components are not depicted to scale.

### 3.1.4. Multimodal detection capabilities

As mentioned above, before introduction into the ICP-MS for quantification, many NPs can be also detected by another means offering complementary information. An example involves the use of popcorn-shaped AuNPs for dual detection of salmonella DT104 [89] (fast identification by SERS and quantification by ICP-MS). The selection of AuNPs with a popcorn-shape is justified because the central spheres of such AuNPs can act as an electron reservoir, whereas the tips are capable of focusing the field at their apexes. Consequently, the sharp tips can provide a huge field enhancement of the SERS scattering signal. Moreover, an approach based on the use of a fluorochrome and 15 nm AuNPs for fluorescence quenching together with ICP-MS detection has been successfully investigated for imaging of MCF-7 cells by FRET before counting by ICP-MS [100].

Several NPs possess intrinsic fluorescence, which can be exploited for qualitative and quantitative purposes. For example, an Ag<sub>3</sub> cluster – aptamer probe has been employed to spatially (fluorescence) and quantitatively (ICP-MS) detect the protein membrane immunoglobulin M in live cells studies [112]. Moreover, CdSe@ZnS QDs were applied to visualize HepG2 cells by fluorescence imaging and subsequently quantify them by ICP-MS [119]. Finally, it is important to point out that in all the research articles collected in Table 2 where comparison studies were tackled, sensitivity achieved by ICP-MS detection was higher than that obtained by fluorescence, phosphorescence, or upconversion luminescence. In any case, it must be kept in mind that luminescent measurements are cheaper than those performed by ICP-MS.

An interesting application is related to tumor-targeted drug delivery and dual mode therapeutic self-monitoring (real-time fluorescence imaging and ICP-MS) using AuNCs [101]. MOFs containing camptothecin anticancer drug were modified with pegylated folate (FA) for specifically recognizing a FA receptor on the cancer cell membrane and were conjugated with AuNCs through a peptide, which is the substrate of caspase-3, acting as an apoptosis indicator (fluorescence of AuNCs was quenched when they were conjugated to the MOFs). Endocytosis of this probe was mediated by the receptor-ligand interactions, and the encapsulated anticancer drug was released from the nanoprobe in HepG2 cells. Subsequently, the released camptothecin initiated programmed death of cells and caspase-3 was activated as a main participant of cell apoptosis. The peptide linking AuNCs to MOFs was enzymatically cleaved by caspase-3 and the quenched fluorescence of AuNCs on MOFs was then recovered, thus allowing to monitor the treatment process. Quantification was carried out by ICP-MS.

### 3.2. Identification and determination of biomolecules by laser ablation-ICP-MS using NPs as labels

LA-ICP-MS allows elemental and isotopic determination of metals and metalloids in solid samples at trace levels without sample dissolution [127,128]. Furthermore, analyses with micrometer spatial resolution (as low as 1 μm) can be obtained, thus producing images/maps of the analyte(s) distribution in the specimen. Something to keep in mind to carry out reliable quantification by LA-ICP-MS is that analytical signals are directly affected by the sample volume ablated per laser shot from the sample. So, for quantitative purposes it is crucial to use some type of internal standardization in order to correct for possible changes in the ablated mass or, at least, to ensure that the removed volume is always the same (e.g. by ablating the whole depth of thin sample slices deposited onto appropriate supports). Many applications show the interest of elemental/isotopic determinations by LA-ICP-MS in the biological field [7], including bioimaging of animal and human tissues (e.g. verification of drug penetration [129], metal intoxication

[130], or basic knowledge about diseases [131,132]) and single-cells (e.g. NPs uptake [133,134] and use of isotopically-enriched tracers to investigate supplementation [135]).

Molecular information can be also extracted by LA-ICP-MS using appropriate approaches. For example, specific proteins in biological tissues and cells can be mapped after an IHC protocol with metal-labelled antibodies [30,136]. Table 3 collects, listed in chronological order, representative applications where NPs have been employed as detecting labels in combination with LA-ICP-MS for identification and determination of biomolecules. To our knowledge, the first application dates from 2005 [137]. After protein separation by gel electrophoresis and transfer to a blotting membrane, the protein was marked by the subsequent use of an Ab1 raised in rabbit and a mouse-anti-rabbit Ab covalently coupled to 10 nm AuNPs. One advantage claimed for the protein specific detection in contrast to a non-specific technique was that a complete separation of the analyte from other proteins is not a prerequisite for identification and quantification, allowing to determine the concentration of specific low abundance proteins in complex mixtures [137].

In research work devoted to the determination of a protein on a dot blot membrane, 10 nm and 60 nm commercial AuNPs-labels (carboxyl coated NPs readily to be covalently attached to proteins) were compared with a commercially available labelling reagent based on metal-coded affinity tags (MeCAT) [148] containing a chelate with Ho [146]. As expected, much higher sensitivity was obtained with the AuNP labels. However, the DL using the 60 nm AuNPs was just ca. 20 times better as compared to the commercial MeCAT, which was attributed to adsorption to the biological tissue. Thus, this is a critical point to consider in the optimization of the analytical procedure. Chemical surface functionality and ligand density play a major role on the adsorption capacity of NPs. Therefore, it is critical to optimize the ligand density as well as to block the highly reactive sites of the NP in the labelled immunoprobe (e.g. the presence of unwanted carboxylate groups may be easily blocked using a small amine-containing molecule [149], such as tris, ethanolamine or hydroxylamine [6,71,143,147]).

Applications of 5 nm and 10 nm AuNPs as labels of Ab2 in IHC protocols for the mapping of biological tissues have been described [138–140,144]. The silver enhancement technique has been also reported in some of such studies for sensitivity improvement [138–140]. AuNCs [6,71,143] and AgNCs [147] with diameters below 3 nm have been also investigated as labels in IHC protocols. In these latter studies, instead of using the traditional IHC combination of Ab1 and Ab2, only the Ab1 was needed (labelled with the AuNCs or AgNCs). Thus, fewer reagents and simpler procedures were required. Furthermore, the simultaneous use of AgNCs of natural isotopic composition and AgNCs of isotopically-enriched silver (<sup>109</sup>Ag) made the simultaneous mapping of the distribution of two proteins possible. In this last case, the potential of an isotope pattern deconvolution mathematical tool was successfully evaluated [147].

Special attention must be paid to two requirements for quantification purposes by LA-ICP-MS to ensure full depth penetration of the labelled-immunoprobes into the biological tissue: the specimen should be thin (typically below 7 μm) and the preferred labelled-immunoprobes should not be large. Furthermore, it is important to know the average number of atoms per NC. For this reason, AuNCs were characterized in terms of average diameter, shape and crystalline structure [150]. Moreover, the ratio AuNCs:labelled Ab should be known. All this allowed absolute quantitative images of MT 1/2 distribution in the ocular retina [71] and ferroportin in the hippocampus CA1 region [6] of human donors through the measured Au signals.

It should be pointed out that AuNCs and AgNCs are fluorescent and, thus, they can be used for bimodal detection (fluorescence and

**Table 3**

Identification and determination of biomolecules in biological tissues and cells by LA-ICP-MS using NPs as detecting labels.

Functionalized NP (size refers to average NP diameter)	Analyte (A) & sample (S)	Brief description of the analytical method & analytical performance characteristics	Ref.
Ab2 (goat-anti-rabbit IgG) labelled with 10 nm AuNPs	A: Mre11 protein S: protein extracts prepared from CHO–K1 cell lines	The protein was marked first with an Ab1 and then with Ab2 labelled-AuNPs. Western-blot was analyzed and Au quantified by a calibration that mimics the enrichment of the analyte on the surface of the membrane and complete ablation of defined amounts of standards was performed. Laser spot: 97 $\mu\text{m}$ , spot overlap: 50%. DL: 88.41 fg of Au.	[137]
Ab2 labelled with 5 nm AuNPs	A: MUC-1 & HER2 proteins S: Normal gastric mucosa, normal breast and breast cancer	4 $\mu\text{m}$ FFPE tissue sections. Sensitivity of the immunogold probe was increased with Ag: sections after IHC were immersed in enhancement solution for at least 5 min and then washed. Improvement factors of 70–130 for Ag relative to Au were obtained.	[138]
Ab2 (goat anti-rabbit IgG) labelled with 10 nm AuNPs	A: tyrosine hydroxylase (TH) & Fe S: substantia nigra pars compacta of mice brain	30 $\mu\text{m}$ thick sections of brain tissue were immunolabelled with anti-TH, followed by an Ab2 conjugated to the AuNP. Ag enhancement improved the image contrast for Au-labelled sections. Spatial resolution: 12 $\mu\text{m}$ .	[139]
Ab2 (goat anti-rabbit IgG) conjugated to 10 nm AuNPs & mouse anti-TH labelled with MaxPar <sup>®</sup> 173Yb.	A: TH & Fe, Cu & Zn S: C57BL/6 mouse brain	30 $\mu\text{m}$ -thick sections of cryopreserved tissue were analyzed with a spatial resolution of 80 $\mu\text{m}$ . Ag enhancement was employed. The entire mouse brain was analyzed. A data reduction protocol was described for the reconstruction and interpretation of three-dimensional LA-ICP-MS images.	[140]
Au <sub>24</sub> Peptide <sub>8</sub> . The peptide has two functional parts: CCY to capture AuNCs & KQAGDV specific for integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$	A: integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ S: human erythroleukemia (HEL) cells	The peptide–AuNC probe emits fluorescence (647 nm) and has accurate molecular composition. The fluorescence allowed cells visualization. The number of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ was counted by quantifying the Au content on each single HE cell. Single-spot mode: 20 $\mu\text{m}$ diameter ablated areas at positions corresponding to cells.	[141]
Two selected peptides labelled either with red-emissive Au <sub>26</sub> NCs or green-emissive Ag <sub>12</sub> NCs	A: membrane type-1 matrix metalloproteinase & integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ S: human cervical cancer SiHa & HeLa cell lines	LA-ICP-MS was employed to count the Au or Ag in single SiHa or HeLa cells, e.g. to differentiate between the expression levels of membrane type-1 matrix metalloproteinase and integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ in single SiHa & HeLa cells. The optical properties of NCs allowed detection by fluorescence. Single-spot mode: 40 $\mu\text{m}$ diameter ablated areas.	[142]
Anti-metallothionein (MT) 1/2 Ab (or anti-MT 3 Ab) – 2.7 nm AuNCs (579 Au atoms per NC)	A: MT1/2 & MT3 S: human neurosensory retina tissue	5 $\mu\text{m}$ thick FFPE tissue sections. Laser spot: 4 $\mu\text{m}$ . The fluorescent properties of AuNCs allowed detection of IHC by fluorescence ( $\lambda_{\text{em}} = 710 \text{ nm}$ ).	[143]
Anti-MT1/2 Ab – 2.7 nm AuNCs	A: MT1/2 S: human neurosensory retina tissue	5 $\mu\text{m}$ thick FFPE tissue sections. LA-ICP-MS calibration was done with laboratory-made gelatin standards. Absolute quantitative protein bioimaging was achieved. DL: 8.3 ng g <sup>-1</sup> for Au.	[71]
Ab2 labelled with 5 nm AuNPs	A: matrix metalloproteinase-11 S: human breast cancer tissues	FFPE tissues. An anti-matrix metalloproteinase-11 Ab1 was incubated on breast cancer tissue and subsequently labelled with a metal-tagged Ab2 to visualize by ICP-MS the analyte distribution. Laser spot: 30 $\mu\text{m}$ .	[144]
Thiolated DNA oligonucleotides labelled with 15 nm AuNPs	A: microRNA-210-targeting sequence S: cultures from an immortalized trophoblast cell line, HTR-8/SVneo	Uptake and intracellular trafficking of DNA-AuNPs due to oligonucleotide sequence-dependent interactions was used to investigate the differences in the fate of the NPs to examine a model biomarker for hypoxia–microRNA-210 with 1 $\mu\text{m}$ image resolution. The LA-ICP-MS instrument used is known as “Imaging mass cytometry”.	[145]
Anti-mouse IgG Ab labelled with 10 nm or 60 nm AuNPs	A: mouse IgG S: dot blot membranes	Laser spot: 110 $\mu\text{m}$ . Results were compared with MeCAT labelling. LDs: 11 pg, 51 pg & 260 pg for 60 nm AuNPs, 10 nm AuNPs & Ho-MeCAT, respectively.	[146]
Anti-human Ferroportin-1 Ab - 2.2 nm AuNCs (314 Au atoms per NC)	A: ferroportin & Fe S: human brain tissue (hippocampus CA1 region)	5 $\mu\text{m}$ thick FFPE tissue sections. Laser spot: 10 $\mu\text{m}$ (overlapping laser spots) and high repetition rates result in a lateral resolution better than the selected laser spot). LA-ICP-MS calibration with laboratory-made gelatin standards. Protein absolute quantitative bioimaging was achieved. DLs: 6.7 ng g <sup>-1</sup> for Au & 13.4 ng g <sup>-1</sup> for Fe.	[6]
Anti-MT1/2 & anti-superoxide dismutase 1 (SOD1) were respectively labelled with 2.9 nm <sup>nat</sup> AgNCs & <sup>109</sup> AgNCs (709 Ag atoms per NC)	A: MT1/2 & SOD1 S: human neurosensory retina tissue	5 $\mu\text{m}$ thick FFPE tissue sections. Laser spot: 10 $\mu\text{m}$ . Simultaneous specific bioimaging of the two proteins was possible using both types of AgNCs as labels and LA-ICP-MS detection by measuring <sup>107</sup> Ag & <sup>109</sup> Ag. For such purpose, the potential of isotope pattern deconvolution in combination with LA-ICP-MS was successfully evaluated. The fluorescent properties of AgNCs allowed detection by fluorescence.	[147]

ICP-MS) [143,147]. Within this context, it is worth highlighting the research work using a probe consisting of Au<sub>24</sub>Peptide<sub>8</sub> [141]. As indicated in Table 3, the selected peptide has two functional parts, one to capture AuNCs and other specific for integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . The Au<sub>24</sub>Peptide<sub>8</sub> emits red fluorescence that allowed visualization of the cells, while the accurate composition of the probe allowed counting of the expression level of integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  protein on the membranes of HEL cells based on the measurement of Au per laser shot (a single cell) [141]. The strategy was later extended to the combined use of red-emissive Au<sub>26</sub>NCs and green-emissive Ag<sub>12</sub>NCs as labels of two selected peptides for the simultaneous

visualization (fluorescence) and counting (LA-ICP-MS) of two proteins in single cells [142].

Finally, LA-ICP-MS is also of interest for investigating sequence-specific interactions of DNA – AuNPs with cellular species, overcoming the limited sensitivity of optical techniques commonly employed to track cellular uptake of DNA – AuNPs. The study of low-abundance biomarkers such as microRNA requires a highly sensitive technique like LA-ICP-MS. As an example, the uptake and intracellular trafficking of DNA – AuNPs was used to investigate a model biomarker for hypoxia–microRNA-210 [145]. Results showed an enhanced accumulation of NPs under hypoxic conditions. Using LA-

ICP-MS, picomoles of NPs were employed in comparison with nanomoles required in conventional fluorescence-based techniques.

#### 4. Conclusions

The examples of applications reported throughout this review demonstrate the enormous interest of ICP-MS for quantification of very low concentration levels of biomolecules by specific-recognition reactions using NPs as labels. NPs offer higher amplification capabilities (and, therefore, higher sensitivity) for ICP-MS detection than other approaches, such as single metal chelates or commercial polymers containing metal complexes. This fact can be mainly attributed to the higher number of atoms of a given metal per label in the case of NPs. Here, it should be stressed again that for a given NP size the amplification will be higher for NPs composed of a single metal versus NPs made of several elements. In addition, many inorganic NPs offer alternative detection possibilities to achieve complementary information before introduction into the sample-destructive ICP-MS for quantification purposes. Further, it is important to point out that many of the applications reported with ICP-MS make use of rather conventional NPs. More studies related to the synthesis and application of fit-for-purpose NPs with a well-controlled homogeneous size and a high density of reporter elements per NP volume are welcome.

Contamination of procedural blanks can be a problem for the determination of very low levels of analyte when NPs are composed of elements commonly present in the ambient laboratory, because integral mode ICP-MS will not distinguish the source of the detected element (*i.e.* NP versus dissolved ions). Such inconvenience can be overcome by SP-ICP-MS measurements. On the other hand, memory effects attributable to NPs adsorption phenomena on the sample introduction system are not usually reported for liquid nebulization ICP-MS, probably because the NP is commonly diluted/digested before its introduction into the ICP (see Fig. 1). However, high backgrounds due to non-specific absorption of NPs in biological tissues have been observed in LA-ICP-MS analyses, both for polymeric labels and some NPs [21,146]. To minimize such effects, it is crucial to optimize the ligand density as well as to block the highly reactive sites remaining on the NP of the labelled probe.

Finally, it should be remarked that since the first application of NPs for biological analysis by ICP-MS, important instrumental advances have been developed. The use of time-of-flight (TOF) mass spectrometers, which provide simultaneous spectral acquisition capabilities, are crucial for multi-analyte (*i.e.* multiplexing) quantification of small sample volumes or even single cells, either by nebulization [18–20,151,152] or by LA sampling [145,153]. For example, TOFMS could be theoretically capable of detecting about 100 parameters per cell using a different nuclide for each parameter. Regarding LA sampling, fast ablation cells [154,155] allow well-resolved images of the analytes in single cells and tissue sections in rather short times [156,157]. Future applications of LA-ICP-MS, exploiting the high signal-magnification provided by NP-labels to simultaneously determine the concentration a wide variety of biomarkers or for studies of cellular-uptake of labelled NPs [145,158] are granted.

#### 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 financially supported through project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. A.

Lores-Padín and B. Fernández respectively acknowledge the FPU Grant (Ref. MEC-D-17-FPU16/01363; Ministry of Education) and the contract RYC-2014-14985 through the “Ramón y Cajal Program” (Ministry of Economy and Competitiveness).

#### References

- [1] F. Calderón-Celis, J. Ruiz Encinar, A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: update and future perspective., *J. Proteomics* 198 (2019) 11–17.
- [2] Z. Liu, X. Li, G. Xiao, B. Chen, M. He, B. Hu, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the quantitative analysis of biomolecules with exogenous tags: a review., *Trends Anal. Chem.* 93 (2017) 78–101.
- [3] C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays, *Spectrochim. Acta B* 76 (2012) 27–39.
- [4] R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou, Y. Lv, Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review, *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2014) 373–393.
- [5] S.C. Bendall, E.F. Simonds, P. Qiu, E.D. Amir, P.O. Krutzik, R. Finck, R.V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O.I. Ornatsky, R.S. Balderas, S.K. Plevritis, K. Sachs, D. Pe'er, S.D. Tanner, G.P. Nolan, Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum, *Science* 332 (2011) 687–696.
- [6] M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereira, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease, *Talanta* 197 (2019) 413–421.
- [7] D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 890–919.
- [8] C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1393–1396.
- [9] 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, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52.
- [10] A. Tholey, D. Schaumlöffel, Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 399–408.
- [11] G. Schwarz, L. Mueller, S. Becka, M.W. Linscheid, DOTA based metal labels for protein quantification: a review, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 221–233.
- [12] N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatchalam, A. von Bohlen, P.H. Roos, A. Manz, Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1497–1507.
- [13] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8177–8183.
- [14] G. Schwarz, S. Beck, M.G. Weller, M.W. Linscheid, MeCAT—new iodoacetamide reagents for metal labeling of proteins and peptides, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1203–1209.
- [15] A.I. Abdelrahman, S. Dai, S.C. Thickett, O. Ornatsky, D. Bandura, V. Baranov, M.A. Winnik, Lanthanide-containing polymer microspheres by multiplexed dispersion polymerization for highly multiplexed bioassays, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 15276–15283.
- [16] X. Lou, G. Zhang, I. Herrera, R. Kinach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 6111–6114.
- [17] D. Majonis, I. Herrera, O. Ornatsky, M. Schulze, X. Lou, M. Soleimani, M. Nitz, M.A. Winnik, Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8961–8969.
- [18] 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.
- [19] D.R. Bandura, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J.E. Dick, S.D. Tanner, Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6813–6822.
- [20] Mass cytometry: methods and protocols, Springer nature 2019, in: H.M. McGuire, T.M. Ashurst (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1989, L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P.H. Roos, M.W. Linscheid, Comparison of different chelates for lanthanide labelling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1311–1320.
- [22] C. Zhang, Z. Zhang, B. Yu, J. Shi, X. Zhang, Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 96–99.

- [23] Z.A. Quinn, V.I. Baranov, S.D. Tanner, J.L. Wrana, Simultaneous determination of proteins using an element-tagged immunoassay coupled with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 892–896.
- [24] V.I. Baranov, Z.A. Quinn, D.R. Bandura, S.D. Tanner, The potential for elemental analysis in biotechnology, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1148–1152.
- [25] V.I. Baranov, Z. Quinn, D.R. Bandura, S.D. Tanner, A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1629–1636.
- [26] Synthesis of inorganic nanomaterials, *Advances and Key Technologies*, in: S.M. Bhagyaraj, O.S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas (Eds.), Woodhead Publishing, 2018.
- [27] *Inorganic nanoparticles: Synthesis, applications, and perspectives*, in: C. Altavilla, E. Ciliberto (Eds.), CRC Press, 2011.
- [28] O.V. Kharisova, H.V. Rasika Dias, B.I. Kharisov, B. Olvera Pérez, V.M. Jiménez Pérez, The greener synthesis of nanoparticles, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 240–248.
- [29] P. Zhao, N. Li, D. Astruc, State of the art in gold nanoparticle synthesis, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 638–665.
- [30] M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558.
- [31] N. Elahi, M. Kamali, M.H. Baghersad, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review, *Talanta* 184 (2018) 537–556.
- [32] L. Anfossi, F. Di Nardo, A. Russo, S. Cavallera, C. Giovannoli, G. Spano, S. Baumgartner, K. Lauter, C. Baggiani, Silver and gold nanoparticles as multichromatic lateral flow assay probes for the detection of food allergens, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 1905–1913.
- [33] S.H. Lee, B.-H. Jun, Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 865.
- [34] J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11 (1951) 55–75.
- [35] M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 1055–1061.
- [36] E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim. Acta* 186 (2019) 429.
- [37] A. Lores-Padín, M. Cruz-Alonso, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as immunoassay labels, *Microchim. Acta* 186 (2019) 705.
- [38] Z. Luo, K. Zheng, J. Xie, Engineering ultrasoft water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications, *Chem. Commun.* 50 (2014) 5143–5155.
- [39] J. Li, J.-J. Zhu, K. Xu, Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications, *Trends Anal. Chem.* 58 (2014) 90–98.
- [40] L. Shang, S. Dong, G.U. Nienhaus, Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications, *Nano Today* 6 (2011) 401–418.
- [41] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 207–218.
- [42] W.C.W. Chan, S. Nie, Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science* 281 (1998) 2016–2018.
- [43] L. Trapiella Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4753–4759.
- [44] P.L. Suárez, M. García-Cortés, M.T. Fernández-Argüelles, J.R. Encinar, M. Valedor, F.J. Ferrero, J.C. Campo, J.M. Costa-Fernández, Functionalized phosphorescent nanoparticles in (bio)chemical sensing and imaging. A review, *Anal. Chim. Acta* 1046 (2019) 16–31.
- [45] M.V. DaCosta, S. Doughan, Y. Han, U.J. Krull, Lanthanide upconversion nanoparticles and applications in bioassays and bioimaging: a review, *Anal. Chim. Acta* 832 (2014) 1–33.
- [46] U. Resch-Genge, H.H. Gorris, Perspectives and challenges of photon-upconversion nanoparticles - Part I: routes to brighter particles and quantitative spectroscopic studies, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 5855–5874.
- [47] L. Pitkänen, A.R.M. Bustos, K.E. Murphy, M.R. Winchester, A.M. Striegel, Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC/ICP-MS and HDC/ICP-MS) and quasi-elastic light scattering (HDC/QELS), *J. Chromatogr. A* 1511 (2017) 59–67.
- [48] E.P. Gray, T.P. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532–1539.
- [49] N. Surugau, P.L. Urban, Electrochromic methods for separation of nanoparticles, *J. Separ. Sci.* 32 (2009) 1889–1906.
- [50] M. Menendez-Miranda, M.T. Fernandez-Arguelles, J.M. Costa-Fernandez, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Elemental ratios for characterization of quantum-dots populations in complex mixtures by asymmetrical flow field-flow fractionation online coupled to fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 839 (2014) 8–13.
- [51] G. Lespes, J. Gigault, Hyphenated analytical techniques for multidimensional characterisation of submicron particles: a review, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 26–41.
- [52] F. Laborda, E. Bolea, G. Cepriá, M.T. Gómez, M.S. Jiménez, J. Pérez-Arategui, J.R. Castillo, Detection, characterization, and quantification of inorganic engineered nanomaterials: a review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples, *Anal. Chim. Acta* 904 (2016) 10–32.
- [53] K.E. Sapsford, K.M. Tyner, B.J. Dair, J.R. Deschamps, I.L. Medintz, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4453–4488.
- [54] 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.* (2020), <https://doi.org/10.1039/C9JA00206E>. Advance Article.
- [55] M.D. Montaña, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5053–5074.
- [56] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2013) 2270–2278.
- [57] K.A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki, S.A. Pergantis, Detection and quantification of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations using asymmetric flow field-flow fractionation online with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4909–4916.
- [58] Q. He, Z. Zhu, L. Jin, L. Peng, W. Guo, S. Hua, Detection of HIV-1 p24 antigen using streptavidin–biotin and gold nanoparticles based immunoassay by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1477–1482.
- [59] J.R. Reimers, M.J. Ford, A. Halder, J. Ulstrup, N.S. Hush, Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)–thiyl species and are destroyed when Au(I)–thiolates form, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 113 (2016) E1424–E1433.
- [60] I.-H. Hsua, W.-H. Chen, T.-K. Wu, Y.-C. Sun, Gold nanoparticle-based inductively coupled plasma mass spectrometry amplification and magnetic separation for the sensitive detection of a virus-specific RNA sequence, *J. Chromatogr.* (2011) 1795–1801. A 1218.
- [61] F. Song, W.C.W. Chan, Principles of conjugating quantum dots to proteins via carbodiimide chemistry, *Nanotechnology* 22 (2011) 494006.
- [62] J. Pichaandi, G. Zhao, A. Bouzekri, E. Lu, O. Ornaty, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Lanthanide nanoparticles for high sensitivity multiparameter single cell analysis, *Chem. Sci.* 10 (2019) 2965–2974.
- [63] N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today* 5 (2010), 213–230.
- [64] A. Wang, Y.R. Perera, M.B. Davidson, N.C. Fitzkee, Electrostatic interactions and protein competition reveal a dynamic surface in gold nanoparticle–protein adsorption, *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 24231–24239.
- [65] M.H. Jazayeri, H. Amani, A.A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, B. Sedighimoghaddam, Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies, *Sens. Bio-Sens. Res.* 9 (2016) 17–22.
- [66] M.K. Greene, D.A. Richards, J.C.F. Nogueira, K. Campbell, P. Smyth, M. Fernández, J.S. Christopher, V. Chudasama, Forming next-generation antibody–nanoparticle conjugates through the oriented installation of non-engineered antibody fragments, *Chem. Sci.* 9 (2018) 79–87.
- [67] S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 314–320.
- [68] Y. He, D. Esteban-Fernández, M.W. Linscheid, Novel approach for labeling of biopolymers with DOTA complexes using in situ click chemistry for quantification, *Talanta* 134 (2015) 468–475.
- [69] S. Kanje, A.J. Herrmann, S. Hober, L. Mueller, Next generation of labeling reagents for quantitative and multiplexing immunoassays by the use of LA-ICP-MS, *Analyst* 141 (2016) 6374–6380.
- [70] D. Bouzas-Ramos, J.J. Garcia-Alonso, J.M. Costa-Fernández, J.R. Encinar, Quantitative assessment of individual populations present in nanoparticle-antibody conjugate mixtures using AF4-ICP-MS/MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 3567–4574.
- [71] M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151.
- [72] L. Wu, L. Qiu, C. Shi, J. Zhu, Nanoparticle-based solution DNA sandwich assay using ICP-AES for readout, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2795–2800.
- [73] B. Chen, B. Hu, P. Jiang, M. He, H. Peng, X. Zhang, Nanoparticle labelling-based magnetic immunoassay on chip combined with electrothermal vaporization - inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of carcinoembryonic antigen in human serum, *Analyst* 136 (2011) 3934–3942.
- [74] J.-M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science* 301 (2003) 1884.
- [75] A. Merkoçi, M. Aldavert, G. Tarrasón, R. Ertija, S. Alegret, Toward an ICPMS-linked DNA assay based on gold nanoparticles immunocoupled through peptide sequences, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6500–6503.
- [76] Y. Lu, W. Wang, Z. Xing, S. Wang, P. Cao, S. Zhang, X. Zhang, Development of

- an ICP-MS immunoassay for the detection of anti-erythropoietin antibodies, *Talanta* 78 (2009) 869–873.
- [77] Q. Zhao, X. Lu, C.G. Yuan, F.F. Li, X.C. Le, Aptamer-linked assay for thrombin using gold nanoparticle amplification and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7484–7489.
- [78] S. Hu, R. Liu, S. Zhang, Z. Huang, Z. Xing, X. Zhang, A new strategy for highly sensitive immunoassay based on single-particle mode detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1096–1103.
- [79] F. Li, Q. Zhao, C. Wang, X. Lu, X.-F. Li, X.C. Le, Detection of escherichia coli O157:H7 using gold nanoparticle labelling and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3399–3403.
- [80] C. Giesen, N. Jakubowski, U. Panne, M.G. Weller, Comparison of ICP-MS and photometric detection of an immunoassay for the determination of ochratoxin A in wine, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1567–1572.
- [81] R. Liu, X. Liu, Y. Tang, L. Wu, X. Hou, Y. Lv, Highly sensitive immunoassay based on immunogold-silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometry detection, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2330–2336.
- [82] G. Han, Z. Xing, Y. Dong, S. Zhang, X. Zhang, One-step homogeneous DNA assay with single-nanoparticle detection, *Angew. Chem. Int.* 50 (2011) 3462–3465.
- [83] 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.
- [84] P. Jarujamrus, R. Chawengkirittikul, J. Shiowatana, A. Siripinyanon, Towards chloramphenicol detection by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) linked immunoassay using gold nanoparticles (AuNPs) as element tags, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 884–890.
- [85] Y. Zhang, B. Chen, M. He, B. Yang, J. Zhang, B. Hu, Immunomagnetic separation combined with inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of tumor cells using gold nanoparticle labelling, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8082–8089.
- [86] Y. He, D. Chen, M. Li, L. Fang, W. Yang, L. Xu, F. Fu, Rolling circle amplification combined with gold nanoparticles-tag for ultrasensitive and specific quantification of DNA by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Biosens. Bioelectron.* 58 (2014) 209–213.
- [87] S. Zhang, G. Han, Z. Xing, S. Zhang, X. Zhang, Multiplex DNA assay based on nanoparticle probes by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3541–3547.
- [88] J. Ko, H.B. Lim, Multicore magnetic nanoparticles (MMNPs) doped with Cs and FITC for the determination of biomarker in serum using ICP-MS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4140–4144.
- [89] Y. Lin, A.T. Hamme II, Gold nanoparticle labeling based ICP-MS detection/ measurement of bacteria, and their quantitative photothermal destruction, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3573–3582.
- [90] X.-M. Li, J. Luo, N.-B. Zhang, Q.-L. Wei, Nucleic acid quantification using nicking–displacement, rolling circle amplification and bio-bar-code mediated triple-amplification, *Anal. Chim. Acta* 881 (2015) 117–123.
- [91] X. Zhang, B. Chen, M. He, Y. Zhang, G. Xiao, B. Hu, Magnetic immunoassay coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous quantification of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum, *Spectrochim. Acta B* 106 (2015) 20–27.
- [92] Z. Liu, B. Chen, M. He, X. Zhang, H. Wang, B. Hu, Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in the study of apoptosis: determination of caspase-3 using a gold nanoparticle tag, *Analyst* 141 (2016) 926–933.
- [93] 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.
- [94] X. Li, B. Chen, M. He, H. Wang, G. Xiao, B. Yang, B. Hu, Simultaneous detection of MCF-7 and HepG2 cells in blood by ICP-MS with gold nanoparticles and quantum dots as elemental tags, *Biosens. Bioelectron.* 90 (2017) 343–348.
- [95] E. Pérez, P. Martínez-Peinado, F. Marco, L. Gras, J.M. Sempere, J. Mora, G. Grindlay, Determination of aflatoxin M1 in milk samples by means of an inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay, *Food Chem.* 230 (2017) 721–727.
- [96] G. Xiao, B. Chen, M. He, K. Shi, X. Zhang, X. Li, Q. Wu, D. Pang, B. Hu, Determination of avian influenza A (H9N2) viruses by inductively coupled plasma mass spectrometry based magnetic immunoassay with gold nanoparticles labelling, *Spectrochim. Acta B* 138 (2017) 90–96.
- [97] X. Zhang, G. Xiao, B. Chen, M. He, B. Hu, Lectin affinity based elemental labelling with hybridization chain reaction for the sensitive determination of avian influenza A (H9N2) viruses, *Talanta* 188 (2018) 442–447.
- [98] Y. Zhang, G. Sun, Y. Zhang, B. Huang, Z. Xing, S. Zhang, X. Zhang, Simultaneous competitive and sandwich formats multiplexed immunoassays based on ICP-MS detection, *Talanta* 185 (2018) 237–242.
- [99] X. Li, B. Chen, M. He, G. Xiao, B. Hu, Gold nanoparticle labelling with tyramide signal amplification for highly sensitive detection of alpha fetoprotein in human serum by ICP-MS, *Talanta* 176 (2018) 40–46.
- [100] B. Yang, B. Chen, M. He, X. Yin, C. Xu, B. Hu, Aptamer-based dual-functional probe for rapid and specific counting and imaging of MCF-7 cells, *Anal. Chem.* 90 (2018) 2355–2361.
- [101] X. Yin, B. Yang, B. Chen, M. He, B. Hu, Multifunctional gold nanocluster decorated metal-organic framework for real-time monitoring of targeted drug delivery and quantitative evaluation of cellular therapeutic response, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10596–10603.
- [102] X. Xu, J. Chen, B. Li, L. Tang, J. Jiang, Single particle ICP-MS-based absolute and relative quantification of *E. coli* O157 16S rRNA using sandwich hybridization capture, *Analyst* 144 (2019) 1725–1730.
- [103] S.M. Hogeling, M.T. Cox, R.M. Bradshaw, D.P. Smith, C.J. Duckett, Quantification of proteins in whole blood, plasma and DBS, with element labelled antibody detection by ICP-MS, *Anal. Biochem.* 575 (2019) 10–16.
- [104] E. Perez, F.M. Marco, P. Martínez-Peinado, J. Mora, G. Grindlay, Evaluation of different competitive immunoassays for aflatoxin M1 determination in milk samples by means of inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 1049 (2019) 10–19.
- [105] G. Xiao, B. Chen, M. He, X. Li, B. Hu, A highly sensitive assay of DNA based on inductively coupled plasma mass spectrometry detection with gold nanoparticle amplification and isothermal circular strand-displacement polymerization reaction, *Talanta* 202 (2019) 207–213.
- [106] X. Li, B. Chen, M. He, B. Hu, Immunodetection and counting of circulating tumor cells (HepG2) by combining gold nanoparticle labelling, rolling circle amplification and ICP-MS detection of gold, *Microchim. Acta* 186 (2019) 344.
- [107] B. Chen, H. Peng, F. Zheng, B. Hu, M. He, W. Zhao, D. Pang, Immunoaffinity monolithic capillary microextraction coupled with ICP-MS for immunoassay with quantum dot labels, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1674–1681.
- [108] Y. Tang, X. Jiao, R. Liu, L. Wu, L. Wu, X. Hou, Y. Lv, Inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of total urinary protein with CdTe quantum dots label, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 2493–2499.
- [109] A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella Alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Elemental and molecular detection for quantum dots based immunoassays: a critical appraisal, *Biosens. Bioelectron.* 33 (2012) 165–171.
- [110] J.A. Ko, H.B. Lim, Metal/dye-doped core-shell silica nanoparticles for potential use in bioassay, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 630–636.
- [111] H.W. Choi, K.H. Lee, N.H. Hur, H.B. Lim, Cerium oxide-deposited mesoporous silica nanoparticles for the determination of carcinoembryonic antigen in serum using inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 847 (2014) 10–15.
- [112] R. Liu, J. Zhai, L. Liu, Y. Wang, Y. Wei, X. Jiang, L. Gao, H. Zhu, Y. Zhao, Z. Chai, X. Gao, Spatially marking and quantitatively counting membrane immunoglobulin M in live cells via Ag cluster–aptamer probes, *Chem. Commun.* 50 (2014) 3560–3563.
- [113] A.R.M. Bustos, M. García-Cortes, H. González-Iglesias, J.R. Encinar, J.M. Costa-Fernández, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Sensitive targeted multiple protein quantification based on elemental detection of quantum dots, *Anal. Chim. Acta* 879 (2015) 77–84.
- [114] M. Garcia-Cortes, J.R. Encinar, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 128–134.
- [115] J.A. Ko, H.B. Lim, Metal-doped inorganic nanoparticles for multiplex detection of biomarkers by a sandwich-type ICP-MS immunoassay, *Anal. Chim. Acta* 938 (2016) 1–6.
- [116] Z. Liu, B. Yang, B. Chen, M. He, B. Hu, Upconversion nanoparticle as elemental tag for the determination of alpha-fetoprotein in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analyst* 142 (2017) 197–205.
- [117] B. Yang, Y. Zhang, B. Chen, M. He, X. Yin, H. Wang, X. Li, B. Hu, A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells, *Biosens. Bioelectron.* 96 (2017) 77–83.
- [118] A.R. Schulz, S. Stanislawski, S. Baumgart, A. Grützkau, H.E. Mei, Silver nanoparticles for the detection of cell surface antigens in mass cytometry, *Cytometry Part A* 91A (2017) 25–33.
- [119] B. Yang, B. Chen, M. He, B. Hu, Quantum dots labelling strategy for “counting and visualization” of HepG2 cells, *Anal. Chem.* 89 (2017) 1879–1886.
- [120] Y. Cao, G. Mo, J. Feng, X. He, L. Tang, C. Yu, B. Deng, Based on ZnSe quantum dots labelling and single particle mode ICP-MS coupled with sandwich magnetic immunoassay for the detection of carcinoembryonic antigen in human serum, *Anal. Chim. Acta* 1028 (2018) 22–31.
- [121] A. Jeong, H.B. Lim, Magnetophoretic separation ICP-MS immunoassay using Cs-doped multicore magnetic nanoparticles for the determination of salmonella typhimurium, *Talanta* 178 (2018) 916–921.
- [122] X. Yin, B. Chen, M. He, B. Hu, Simultaneous determination of two phosphorylated p53 proteins in SCC-7 cells by an ICP-MS immunoassay using apoferritin-templated europium(III) and lutetium(III) phosphate nanoparticles as labels, *Microchim. Acta* 185 (2019) 424.
- [123] D. Xiao, T. Lu, R. Zeng, Y. Bi, Preparation and highlighted applications of magnetic nanoparticles and nanoparticles: a review on recent advances, *Microchim. Acta* 183 (2016) 2655–2675.
- [124] Á.Ríos, M. Zougagh, Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 72–83.
- [125] C.S. Holgate, P. Jackson, P.N. Cowen, C.C. Bird, Immunogold-silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity, *J. Histochem. Cytochem.* 31 (1983) 938–944.
- [126] G. Danscher, J.O.R. Norgaard, Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue, *J. Histochem. Cytochem.* 31 (1983) 1394–1398.
- [127] A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer, F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.*

- 407 (2015) 6593–6617.
- [128] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2113–2125.
- [129] T. Van Acker, S.J.M. Van Malderen, M. Van Heerden, J.E. McDuffie, F. Cuyckens, F. Vanhaecke, High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects, *Anal. Chim. Acta* 945 (2016) 23–30.
- [130] M. Legrand, R. Lam, M. Jensen-Fontaine, E.D. Salin, H.M. Chana, Direct detection of mercury in single human hair strands by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1287–1288.
- [131] S.S. Rao, L. Lago, R. Gonzalez de Vega, L. Bray, D.J. Hare, D. Clases, P.A. Doble, P.A. Adlard, Characterising the spatial and temporal brain metal profile in a mouse model of tauopathy, *Metallomics*, <https://doi.org/10.1039/C9MT00267G>, 2020.
- [132] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, H. González, M. Coca, A. Sanz-Medel, Quantitative bioimaging of trace elements in human crystalline lens by LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2343–2348.
- [133] A.J. Managh, R.W. Hutchinson, P. Riquelme, C. Broichhausen, A.K. Wege, U. Ritter, N. Ahrens, G.E. Koehl, L. Walter, C. Florian, H.J. Schlitt, H.J. Reid, E.K. Geissler, B.L. Sharp, J.A. Hutchinson, Laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry: an emerging technology for detecting rare cells in tissue sections, *J. Immunol.* 193 (2014) 2600–2608.
- [134] D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, N. Jakubowski, Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9684–9688.
- [135] S. Rodríguez-Menéndez, B. Fernández, H. González-Iglesias, M. García, L. Álvarez, J.I. García-Alonso, R. Pereiro, Isotopically-enriched tracers and inductively coupled plasma mass spectrometry methodologies to study zinc supplementation in single-cells of retinal pigment epithelium in vitro, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4488–4495.
- [136] 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.
- [137] S.D. Mueller, R.A. Diaz-Bone, J. Felix, W. Goedecke, Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 907–911.
- [138] J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray, Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers, *Proteomics* 8 (2008) 3775–3784.
- [139] D.J. Hare, P. Lei, S. Ayton, B.R. Roberts, R. Grimm, J.L. George, D.P. Bishop, A.D. Beavis, S.J. Donovan, G. McColl, I. Volitakis, C.L. Masters, P.A. Adlard, R.A. Cherny, A.I. Bush, D.I. Finkelstein, P.A. Doble, An iron–dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2160–2169.
- [140] B. Paul, D.J. Hare, D.P. Bishop, C. Paton, V.T. Nguyen, N. Cole, M.M. Niedwiecki, E. Andreozzi, A. Vais, J.L. Billings, L. Bray, A.I. Bush, G. McColl, B.R. Roberts, P.A. Adlard, D.I. Finkelstein, J. Hellstrom, J.M. Hergt, J.D. Woodhead, P.A. Doble, Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging, *Chem. Sci.* 6 (2015) 5383–5393.
- [141] J. Zhai, Y. Wang, C. Xu, L. Zheng, M. Wang, W. Feng, L. Gao, L. Zhao, R. Liu, F. Gao, Y. Zhao, Z. Chai, X. Gao, Facile approach to observe and quantify the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin on a single-cell, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2546–2549.
- [142] X. Zhang, R. Liu, Q. Shu, Q. Yuan, G. Xing, X. Gao, Quantitative analysis of multiple proteins of different invasive tumor cell lines at the same single-cell level, *Small* 14 (2018) 1703684.
- [143] M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Álvarez, H. González-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Pereiro, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanostructures as specific tags, *Microchim. Acta* 185 (2018) 64.
- [144] R. González de Vega, D. Clases, M.L. Fernández-Sánchez, M. Eiró, L.O. González, F.J. Vizoso, P.A. Doble, A. Sanz-Medel, MMP-11 as a biomarker for metastatic breast cancer by immunohistochemical-assisted imaging mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 639–646.
- [145] B. Malile, J. Brkic, A. Bouzekri, D.J. Wilson, O. Ornatsky, C. Peng, J.L. Chen, DNA-conjugated gold nanoparticles as high-mass probes in imaging mass spectrometry, *ACS Appl. Bio Mater.* 2 (2019) 4316–4323.
- [146] M. Tvrđonova, M. Vlcnovská, L.P. Vanickova, V. Kanicky, V. Adam, L. Ascher, N. Jakubowski, M. Vaculovicova, T. Vaculovic, Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 559–564.
- [147] E. Valencia, B. Fernández, M. Cruz-Alonso, M. García, H. González-Iglesias, M.T. Fernández-Abedul, R. Pereiro, Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically-enriched silver nanostructures, *J. Anal. At. Spectrom.* (2020), <https://doi.org/10.1039/C9JA00365G>, *At. Spectrom.*
- [148] R. Ahrends, S. Pieper, B. Neumann, C. Scheler, M.W. Linscheid, Metal-coded affinity tag labeling: a demonstration of analytical robustness and suitability for biological applications, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2176–2184.
- [149] *Bioconjugate techniques* (Third edition), G.T. Hermanson, Elsevier, 2013.
- [150] M.C. Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M.C. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Functionalized gold nanostructures as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 1055–1061.
- [151] 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.
- [152] S.D. Tanner, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, D.R. Bandura, T.C. George, An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications, *Cancer Immunol. Immunother.* 62 (2013) 955–965.
- [153] Q. Chang, O.I. Ornatsky, I. Siddiqui, A. Loboda, V.I. Baranov, D.W. Hedley, Imaging mass cytometry, *Cytometry Part A* 91A (2017) 160–169.
- [154] H.A.O. Wang, D. Grolimund, C. Giesen, C.N. Borca, J.R.H. Shaw-Stewart, B. Bodenmiller, D. Günther, Fast chemical imaging at high spatial resolution by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 10107–10116.
- [155] S.J.M. Van Malderen, A.J. Managh, B.L. Sharp, F. Vanhaecke, Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bio-imaging applications, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 423–439.
- [156] S.J.M. Van Malderen, E. Vergucht, M. De Rijcke, C.R. Janssen, L. Vincze, F. Vanhaecke, Quantitative determination and subcellular imaging of Cu in single cells via laser ablation-ICP-mass spectrometry using high-density microarray gelatin standards, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5783–5789.
- [157] K. Löhr, O. Borovinskaya, G. Tournaire, U. Panne, N. Jakubowski, Arraying of single cells for quantitative high throughput laser ablation ICP-TOF-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 11520–11528.
- [158] A.-M.A. Willmore, L. Simón-Gracia, K. Toome, P. Paiste, V.R. Kotamraju, T. Mölder, K.N. Sugahara, E. Ruoslahti, G.B. Braun, T. Teesalu, Targeted silver nanoparticles for ratiometric cell phenotyping, *Nanoscale* 8 (2016) 9096–9101.



**Ana Lores-Padín** received her BSc in Chemistry in 2016 from University of Santiago de Compostela (Spain) and her MSc in Analytical and Bioanalytical Sciences in 2017 from University of Oviedo. In 2017 she was awarded the “FPU” Spanish predoctoral fellowship to pursue her PhD in the group “BioNanoAnalytical Spectrometry and Electrochemistry” under the supervision of Prof. Rosario Pereiro and Dr. Beatriz Fernández. Her current research focuses in the development of methodologies based on mass spectrometry and its application to the study of potential therapeutic biomarkers in Age-related Macular Degeneration.



**Paula Menero-Valdés** was born in Gijón, Spain in 1997. She received her BSc in Chemistry in 2019 from the University of Oviedo. In November 2018, she joined the “BioNanoAnalytical Spectrometry and Electrochemistry” research group coordinated by Prof. Rosario Pereiro thanks to a collaboration scholarship by the Spanish Education Ministry. Currently, she is courising the Analytical and Bioanalytical Master’s degree at the University of Oviedo and she is working on her Master’s Thesis under the supervision of Dr. Beatriz Fernández. Her research focuses on the synthesis of new metal nanostructures for targeting proteins in biological samples.



**Dr. Beatriz Fernández** is a Research Scientist under the outstanding “Ramón y Cajal” contract at University of Oviedo (Spain). After obtaining her Ph.D., she spent twenty-nine months at the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS in Pau, France). She has supervised 5 Ph.D., is co-author of more than 70 scientific publications as well as several book chapters and one patent. Her current research interests are focused in the field of quantitative spatially-resolved analysis by mass spectrometry-based techniques, particularly glow discharge sources for depth profiling analysis and laser ablation ICP-MS for the imaging of heteroatoms and proteins in biomedical tissues.



**Rosario Pereiro** is a professor at the Department of Physical and Analytical Chemistry and coordinates the “BioNanoAnalytical Spectrometry and Electrochemistry” research group of Oviedo University (Spain). After obtaining her Ph.D., she was a postdoctoral researcher at the Department of Chemistry, Indiana University (USA). To

date, she has supervised 20 Ph.D. Thesis, is author of over 200 scientific publications as well as 6 patents. Her actual research interests aim at finding new, or improved, analytical strategies to solve health-related challenges as well as the development of nanomaterials for bioanalytical uses (<https://orcid.org/0000-0002-5936-7726>).

