



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

**Departamento de Química Física y Analítica**

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

**Nuevas metodologías basadas en espectrometría  
de masas elemental para el estudio de elementos  
esenciales y (metalo)-proteínas implicados en  
enfermedades oculares neurodegenerativas  
asociadas a la edad**

**TESIS DOCTORAL**

**EVA VALENCIA AGUDO**

**Oviedo, 2022**



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

**Department of Physical and Analytical Chemistry**

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

**New elemental mass spectrometry-based  
methodologies to investigate essential elements  
and (metallo)-proteins involved in age-related  
neurodegenerative eye diseases**

**Ph.D. THESIS**

**EVA VALENCIA AGUDO**

**Oviedo, 2022**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Nuevas metodologías basadas en espectrometría de masas elemental para el estudio de elementos esenciales y (metal)-proteínas implicados en enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad	Inglés: <b>New elemental mass spectrometry-based methodologies to investigate essential elements and (metal)-proteins involved in age-related neurodegenerative eye diseases</b>
2.- Autor	
Nombre: Eva Valencia Agudo	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y el glaucoma constituyen las enfermedades oculares neurodegenerativas más frecuentes relacionadas con el sistema visual, pudiendo acarrear la posibilidad de desarrollar ceguera irreversible con el tiempo. Se requiere, por tanto, la aplicación de enfoques analíticos avanzados tanto para la identificación de biomarcadores (proteínas, metabolitos, elementos esenciales) que permitan una detección temprana de estas patologías. Es importante resaltar que, en el caso del sistema visual, el análisis de muestras con bajos niveles de concentración de metales y metaloproteínas, así como el volumen limitado de las mismas (lágrima, humor acuso, cultivos celulares) o su elevada complejidad (suero), hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas innovadoras que sean rápidas, sensibles, con bajos límites de detección y con capacidad de análisis multiplexado. En este contexto, las técnicas basadas en espectrometría de masas tienen una elevada aplicabilidad durante el desarrollo de metodologías analíticas cuantitativas. Así, el **objetivo de la Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y la aplicación de nuevas metodologías basadas en espectrometría de masas elemental para el estudio de elementos esenciales y (metal)-proteínas implicados en enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad en distintos tipos de muestras biológicas.**

**En el primer capítulo**, y con el fin de estudiar posibles alteraciones, a nivel



elemental y proteico, relacionadas con la dishomeostasis de metales en pacientes con DMAE y sujetos control, se decidió analizar la película lagrimal, fluido ocular fácilmente accesible y cuya toma de muestra es no invasiva. Con menos de 5  $\mu\text{L}$  de muestra se ha llevado a cabo el análisis multielemental de Mg, P, Na, Fe, Cu, Zn y Ca mediante plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS) y se ha realizado la cuantificación de lactoferrina (LF), proteína fijadora de calcio S100 A6 (S100A6), metalotioneína 1A (MT1A), factor H del complemento (CFH), clusterina (CLU) y proteína precursora amiloidea (APP), en una población de 60 sujetos, 31 pacientes diagnosticados con la forma seca de la DMAE y 29 individuos sanos (controles).

**En el segundo capítulo**, se ha desarrollado un método de cuantificación absoluta de la proteína CFH en suero humano. La CFH es un componente constitutivo de las drusas y está codificada por el gen *CFH*, cuyas variantes genéticas han sido identificadas fuertemente asociada con mayor riesgo del desarrollo de la DMAE. Los niveles séricos de CFH podrían ser de interés para evaluar el inicio o progresión de la DMAE. Se requiere de un método altamente sensible para la determinación de CFH en suero humano que permita el análisis cuantitativo como alternativa al ensayo ELISA, para lo que se emplearon nanoclústeres de plata (AgNCs) como marcas para el desarrollo de un fluoroinmunoensayo de CFH.

**En el tercer capítulo**, y para los nanoclústeres de plata (AgNCs) cuya síntesis fue optimizada en el segundo capítulo, se ha desarrollado una metodología altamente sensible para la obtención simultánea de imágenes de proteínas en retina humana mediante ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS. Las proteínas, superóxido dismutasa 1 (SOD1) y metalotioneína 1 y 2 (MT1/2), han sido seleccionadas por su posible relación con el desarrollo de enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad, más aún considerando que los niveles de Cu y MT1A se han observado alterados en la lágrima de pacientes con DMAE (capítulo 1). Así, los nanoclústeres de plata (AgNCs) se han sintetizado utilizando plata con abundancia natural o enriquecida isotópicamente ( $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  y  $^{109}\text{AgNCs}$ ) para posteriormente emplearse como marcas para la obtención de imágenes de proteínas específicas.

Finalmente, **en el cuarto capítulo**, dado el elevado potencial que tiene la medida de relaciones isotópicas de elementos esenciales y con objeto de evaluar posibles



alteraciones en el metabolismo normal del organismo, se ha puesto a punto un método de separación rápido y para pequeños volúmenes de muestra con el objetivo de estudiar posibles alteraciones en la composición isotópica de Ca en relación al glaucoma. Concretamente, la muestra objeto de estudio fue el humor acuoso, un fluido intraocular cuyo volumen de muestra típico está por debajo de los 250  $\mu$ L.

#### RESUMEN (en Inglés)

Age-related macular degeneration (AMD) and glaucoma are the most common neurodegenerative eye diseases affecting the visual system. In this context, the development of advanced analytical approaches based on mass spectrometry techniques for the identification of potential biomarkers (proteins, metabolic, essential elements) allowing for an early diagnosis of these pathologies and/or a better understanding of the biological and biochemical processes underlying the progression of these diseases is mandatory. Moreover, when considering the visual system, the analysis of samples with low levels of metals and metalloproteins, as well as their limited volume available (e.g. tear fluid, aqueous humor, cell cultures) and/or complexity (e.g. serum), makes also necessary to develop fast, sensitive (low limits of detection) and with capability of multiplex analysis. Thus, **the main goal of this PhD Thesis has been the development and application of new methodologies based on elemental mass spectrometry techniques to investigate the role of essential elements and (metallo)-proteins involved in age-related neurodegenerative eye diseases.**

**In the first chapter**, metal dyshomeostasis related to AMD disease was investigated by determining elemental and protein concentration levels. Such aim was pursued by the analysis of a readily accessible and non-invasive biological sample, the tear fluid both in AMD patients (n =31) and control subjects (n =29). In particular, quantitative multielemental analysis of Mg, P, Na, Fe, Cu, Zn and Ca was carried out by means of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Also, determination of the levels of lactoferrin (LF), calcium binding protein S100 A6 (S100A6), metallothionein 1A (MT1A), complement factor H (CFH), clusterin (CLU) and amyloid



precursor protein (APP) was performed by ELISA. It should be highlight that these experiments were performed by using less than 5  $\mu\text{L}$  lacrimal fluid per study subject.

**In the second chapter**, a methodology for the quantification of the CFH protein in human serum has been developed. The CFH protein, commonly present in drusen deposits, is encoded by the *CFH* gene, whose specific genetic variants have been identified as being strongly associated with an increased risk of developing AMD. The concentration levels of CFH measured in serum could help to evaluate the onset and/or progression of AMD. For such purpose, a highly sensitive method using silver nanoclusters (AgNCs) as labels for the development of a quantitative CFH fluoroinmunoassay in human serum was developed as an alternative to overcome shortcomings of commercial ELISA assays.

**In the third chapter**, and using the silver nanoclusters (AgNCs) whose synthesis was optimized in the second chapter, a highly sensitive methodology, aiming at simultaneous imaging of proteins in the human retina measured by laser ablation (LA) coupled to ICP-MS, has been developed. For such aim, superoxide dismutase 1 (SOD1) and metallothionein 1 and 2 (MT1/2) proteins were selected as they are probably related with the onset of age-related neurodegenerative eye diseases and, also, because as it was observed from the results obtained on chapter 1, the levels of Cu and MT1A were statistically significant different when comparing tear fluid from AMD patients and control subjects. Thus, AgNCs were synthesized using both naturally occurring or isotopically enriched silver ( $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  and  $^{109}\text{AgNCs}$ ) and used as labels to obtain bioimages of the selected proteins.

Finally, **in the last chapter** of the Thesis, and taking into account the high potential that isotopic analysis via multi-collector (MC) ICP-MS has demonstrated over the last decade to investigate possible alterations in the normal metabolism of the organism, a rapid and miniaturized Ca separation method was developed for low sample volumes. Here, aqueous humor, an intraocular fluid with typical volumes below 250  $\mu\text{L}$  was used and focus was done in glaucoma disorder. Once the method was optimized, Ca isotopic analysis was carried out and results obtained for glaucoma patients vs control individuals confronted, showing  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  -2.4 to 0.68 and between -1.4 to 0.81 respectively.



Universidad de Oviedo

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN \_\_\_\_\_**



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas</b> .....	<b>2</b>
1.1. Degeneración macular asociada a la edad.....	3
1.2. Glaucoma .....	8
1.3. Importancia del estudio de las enfermedades neurodegenerativas oculares.....	9
1.4. Tipos de muestras de origen biológico para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.....	10
1.4.1. Fluidos biológicos con toma de muestra invasiva .....	11
1.4.2. Fluidos biológicos con toma de muestra no invasiva .....	13
<b>2. Inmunoensayos</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Nanoclústeres metálicos</b> .....	<b>21</b>
3.1. Nanomateriales .....	21
3.2. Concepto de nanoclúster metálico y propiedades.....	22
3.3. Síntesis de nanoclústeres metálicos.....	26
3.4. Caracterización y bioconjugación.....	29
3.5. Aplicaciones (bio)analíticas.....	30
3.5.1. Aplicaciones basadas en medidas de fluorescencia .....	32
<b>4. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)</b> 37	
4.1. Instrumentación para ICP-MS .....	37
4.2. Aplicaciones .....	46
4.2.1. Con nebulización convencional.....	46
4.2.1.1. Análisis elemental.....	46
4.2.1.2. Medida de relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS.....	47
4.2.2. Ablación Láser acoplada a ICP-MS .....	53
4.2.2.1. Bio-imaging elemental.....	55
4.2.2.2. Bio-imaging isotópico .....	57
4.2.2.3. Bio-imaging molecular .....	58
<b>OBJETIVOS OBJECTIVES</b> .....	<b>79</b>
<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>94</b>

**Análisis dirigido en lágrimas para el estudio del estado homeostático de elementos esenciales y metaloproteínas en degeneración macular asociada a la edad.....95**

1.	Introducción .....	95
2.	Objetivos .....	97
3.	Procedimiento Experimental .....	98
3.1.	Materiales y reactivos .....	98
3.2.	Instrumentación .....	98
3.3.	Población de estudio .....	99
3.4.	Toma y preparación de muestras.....	99
3.5.	Análisis molecular.....	100
3.6.	Cuantificación multielemental de Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe y Cu mediante FIA-ICP-MS.....	101
3.7.	Análisis estadístico .....	102
4.	Resultados.....	103
4.1.	Sujetos de estudio .....	103
4.2.	Análisis molecular en lágrima .....	105
4.3.	Análisis multielemental del fluido lagrimal mediante FIA-ICP-MS .....	108
4.4.	Estudio de asociación entre variables.....	110
4.5.	Filtrado de datos y regresión logística .....	112
4.6.	Modelos de aprendizaje automático .....	114
5.	Discusión .....	115
6.	Conclusiones .....	124

**CAPÍTULO 2.....132**

***Nanoclústeres fluorescentes de plata como marcas de anticuerpos en un inmunoensayo competitivo para la proteína factor H del complemento.....133***

1.	Introducción .....	133
2.	Objetivos.....	134
3.	Procedimiento Experimental .....	135
3.1.	Materiales y reactivos .....	135
3.2.	Muestras .....	136
3.3.	Instrumentación .....	137
3.4.	Síntesis de AgNCs y determinación del rendimiento cuántico.....	137
3.5.	Bioconjugación del anticuerpo anti-CFH con AgNCs e investigación de la capacidad de reconocimiento.....	138
3.6.	Fluoroinmunoensayo con AgNCs como marcas.....	139
3.7.	Determinación de CFH en suero.....	140
4.	Resultados y discusión.....	140
4.1.	Optimización de la síntesis de AgNCs y caracterización.....	140
4.2.	Marcaje del anticuerpo anti-CFH con AgNC.....	146
4.3.	Inmunoensayo para la determinación de CFH en suero humano.....	147
5.	Conclusiones .....	150

**CAPÍTULO 3.....155**

***Imágenes multiplexadas de proteínas en tejidos biológicos mediante microscopía de fluorescencia y ablación láser-ICP-MS utilizando nanoclústeres de plata enriquecidos isotópicamente .....***156

1.	Introducción .....	156
----	--------------------	-----

2. Objetivos .....	159
3. Procedimiento Experimental .....	160
3.1. Materiales y reactivos .....	160
3.2. Secciones de tejidos oculares procedentes de donantes post-mortem .....	161
3.3. Instrumentación .....	162
3.4. Síntesis y bioconjugación de AgNCs de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente .....	163
3.5. Protocolo del inmunoensayo para detección por fluorescencia y <i>bioimaging</i> por LA-ICP-MS .....	164
4. Resultados y discusión .....	167
4.1. Síntesis de AgNCs enriquecidos isotópicamente .....	167
4.2. Optimización del protocolo IHC para la detección de proteínas específicas en secciones de tejidos oculares usando AgNCs como marcas .....	169
4.3. <i>Imaging</i> de MT1/2 y SOD1 en retina humana utilizando AgNCs como marcas mediante detección por microscopía de fluorescencia .....	174
4.4. <i>Imaging</i> simultáneo de MT1/2 y SOD1 en la retina humana mediante LA-ICP-MS .....	177
5. Conclusiones .....	181
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>185</b>
<i>Desarrollo de un método de separación cromatográfico de Ca rápido y para pequeños volúmenes de muestra con el fin de estudiar posibles alteraciones en la composición isotópica de este elemento asociadas al glaucoma .....</i>	<b>186</b>
1. Introducción .....	186
2. Objetivos .....	188
3. Procedimiento Experimental .....	189
3.1. Toma de muestras .....	189
3.2. Materiales y reactivos .....	190
3.3. Instrumentación .....	190
3.4. Preparación de las muestras .....	190
3.5. Análisis elemental mediante ICP-MS .....	191
3.6. Medida de relaciones isotópicas de Ca mediante MC-ICP-MS .....	191
4. Resultados y discusión .....	194
4.1. Optimización del proceso de purificación de calcio en suero .....	194
4.2. Análisis elemental y purificación del Ca en humor acuoso .....	196
4.3. Medidas de relaciones isotópicas de Ca por MC-ICP-MS. ....	199
5. Conclusiones .....	200
<b>CONCLUSIONES CONCLUSIONS.....</b>	<b>204</b>
<b>TRABAJOS FUTUROS .....</b>	<b>209</b>
<b>RESUMEN DE PUBLICACIONES.....</b>	<b>211</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

<i>Figura 1. Esquema del ojo y estructura de la retina. Figura adaptada de la referencia .</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. De izquierda a derecha, persona con capacidad visual sin patologías y con DMAE.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. A) paciente con visión normal B) paciente con glaucoma. Imagen adaptada de la referencia 30.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Estudio de muestras de sangre de recién nacidos a partir de muestras de sangre secadas sobre papel. Figura adaptada de la referencia 35.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Recogida de lágrima mediante a) microtubos capilares de vidrio b) tiras Schirmer.</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6. Representación esquemática de una inmunoglobulina G. Figura modificada de la referencia .</i>	<i>17</i>
<i>Figura 7. Tipos de formato de inmunoensayos cuando el anticuerpo se encuentra inmovilizado A) competitivo B) tipo sándwich o no competitivo</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Representación de los límites en los que se encuentra comprendida la nanoescala con respecto al tamaño de otras especies.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 9. Evolución de la banda de energía al reducir las dimensiones del metal macroscópico hasta llegar a su ruptura en niveles discretos de energía por la formación de NCs. Energía frente a densidad de los estados (DOS, "density of states"). Imagen modificada de la referencia</i>	<i>23</i>
<i>Figura 10. Rango de emisión relacionado con el tipo de ligando protector seleccionado para formar parte de la estructura de AuNCs y AgNCs. Figura modificada de la referencia 103.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 11. Representación de los espectros de emisión (líneas coloreadas continuas) y de excitación (líneas coloreadas punteadas) correspondientes a los distintos tamaños de AuNCs sintetizados. Al ir incrementándose el número de átomos presentes en el NCs se produce un desplazamiento hacia una mayor longitud de onda. Figura modificada de la referencia 103.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 12. Esquema basado en el mecanismo de encendido-apagado de la fluorescencia de los AuNCs para la detección de Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. A) Emisión fluorescente inicial de los AuNCs B) Desactivación de la fluorescencia al añadir los tres iones a detectar C) y D) enmascaramiento de Fe<sup>3+</sup> Y Cu<sup>2+</sup> con una recuperación parcial de la emisión E) Cambios producidos en la fluorescencia de los AuNCs debidos a la presencia de Hg<sup>2+</sup>.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 13. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización a nivel subcelular de los CuNCs en tres líneas celulares distintas (MDAMB-231, A549 y HeLa). El marcaje de las células se presenta en color verde para lo cual se utilizó el fluoróforo</i>	

<i>CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína). Imagen modificada de la referencia 130. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 14. Representación esquemática de la antorcha de un ICP. Figura modificada de la referencia .....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 15. Representación de un analizador de masas de tipo cuadrupolo. Figura adaptada de la referencia .....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16. Esquema de las diferentes partes dentro de un analizador de sector magnético de doble enfoque. Figura adaptada de la referencia . ....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 17. Principales componentes dentro de un analizador de masas de tipo tiempo de vuelo (TOF). Figura adaptada de la referencia .....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18. Representación de un detector de copa de Faraday. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 19. Esquema de un detector multiplicador de electrones secundarios. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 20. Escaneo del pico para la medida de los isótopos de Ca con MC-ICP-MS a media resolución. Se indica la posición donde el <sup>42</sup>Ca estaría libre de la interferencia ArH<sub>2</sub><sup>+</sup>.Figura adaptada de la referencia .....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 21. Esquema de un sistema de ablación láser. ....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 22. Determinación de los niveles de Fe, Cu y Zn en secciones de tejido cerebral de ratón junto a la señal de <sup>13</sup>C. A la izquierda representada la imagen para los ratones con AD y a la derecha los controles. Figura adaptada de la referencia 211. ....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 23. A) Imagen elemental obtenida a partir de la señal de <sup>165</sup>Ho mediante LA-ICP-MS B) imagen del tejido de ojo humano al microscopio. Figura adaptada de la referencia 176.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 24. Imágenes cuantitativas de Ab en las secciones de tejido de a) ratón sano b) ratón enfermo con AD. Figura adaptada de la referencia 224. ....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 25. Imágenes obtenidas de la retina neurosensorial tras aplicar el protocolo de inmunohistoquímica con AuNCs unidos al anticuerpo de la MT3. Figura modificada de la referencia 225. ....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 25. Diagrama de funcionamiento de un equipo de microscopía confocal. ....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 26. Diagrama que resume el aparato lagrimal y la estructura del fluido lagrimal .....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 27. Diagramas de puntos de las concentraciones de proteínas determinadas en lágrima de pacientes con DMAE seca e individuos control (A) LF, (B) S100A6, (C) CFH, (D) CLU, (E) APP y (F) MT1A. (G) Correlación entre la concentración de APP y la edad en pacientes con DMAE e individuos control. Valor r, coeficiente de correlación de Pearson. *, valor p&lt;0,05; **, valor p&lt;0,01; ***, valor p&lt;0,001. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 28. Diagramas de puntos de las concentraciones elementales determinadas en lágrima de pacientes con DMAE seca y sujetos control para (A) Ca, (B) Mg, (C) P, (D) Na, (E) Zn, (F) Fe and (G) Cu. *, valor p&lt;0,05; **, valor p &lt;0,01; ***, valor p &lt;0,001. ....</i>	<i>109</i>

<b>Figura 29. Análisis de la correlación entre (A) Na y Mg, (B) Mg y Cu, (C) Mg y P, (D) LF y Cu, (E) Ca y Na y (F) Ca y Mg, respectivamente. r-valor, Coeficiente de correlación de Pearson. *, p-valor&lt;0,05; **, p-valor&lt;0,01; ***, p-valor&lt;0,001.....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 30. Efecto de la concentración de NaBH<sub>4</sub> sobre la intensidad de fluorescencia de los AgNCs sintetizados. Las concentraciones del resto de reactivos precursores se mantuvieron constantes (longitud de onda de excitación: 430 nm). La síntesis se llevó a cabo durante 15 h a 9 °C. ....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 31. Influencia del tiempo de reacción de síntesis en los espectros de emisión de AgNCs (longitud de onda de excitación: 430 nm). Las concentraciones de todos los reactivos precursores se mantuvieron constantes. La síntesis se llevó a cabo a 9 °C. ....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 32. Comparación de la fluorescencia de AgNCs sintetizados a 9 °C (línea gris de discontinua) y 22 °C (línea negra). Las síntesis se llevaron a cabo con NaBH<sub>4</sub> 50 mM y las reacciones se detuvieron después de 15 h. ....</b>	<b>143</b>
<b>Figura 33. Caracterización morfológica de los AgNCs (obtenidas tras 21 h de síntesis a 9 °C, utilizando NaBH<sub>4</sub> 150 mM). a) imagen HR-TEM de AgNCs, y b) patrón SAED de un AgNC. ....</b>	<b>144</b>
<b>Figura 34. Espectros de emisión de AgNCs a diferentes pHs: pH 12 (línea gris discontinua), pH 7,5 (línea negra continua) y pH 4,8 (línea negra a puntos). ....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 35. Estudio de la fotoestabilidad de AgNCs en agua ultrapura expuesta a luz ambiental diurna y temperatura ambiente. ....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 36. Espectros de emisión obtenidos para ratios 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10 de “anti-CFH Ab:AgNCs” añadidos a la solución para la preparación del bioconjugado.....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 37. Gráfico de calibración del fluoroinmunoensayo para estándares de CFH y para una muestra de suero enriquecida con diferentes concentraciones de CFH (dilución de suero 1:200000), usando 430 nm como longitud de onda de excitación y midiendo la emisión a 660 nm.....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 38. Espectros de fluorescencia de los <sup>nat</sup>AgNC sintetizados (línea gris) y <sup>109</sup>AgNC enriquecidos isotópicamente (línea de puntos en el eje secundario). Longitud de onda de excitación: 430 nm. ....</b>	<b>168</b>
<b>Figura 39. Perfil de línea de <sup>107</sup>Ag obtenido por LA-ICP-MS para el análisis de las capas de retina en secciones de tejido ocular humano después del protocolo IHC con bioconjugado anti-MT1/2:<sup>nat</sup>AgNCs y usando diferentes proporciones molares de bioconjugado:hidroxilamina. a) 1:20; b) 1:50; y c) 1:100. El ancho de las líneas de ablación en los tejidos oculares oscila entre 450 μm y 950 μm (los 30 s iniciales y finales de los análisis corresponden al fondo del gas portador He). ....</b>	<b>172</b>
<b>Figura 40. Análisis de la retina neurosensorial en secciones tejidos oculares humanos después del protocolo de IHC con AgNCs por microscopía de fluorescencia. Imágenes obtenidas por microscopía confocal láser (20x). a) Imagen de transmisión de la región seleccionada de la retina humana, incluida la descripción de las distintas capas de la retina: 1. fotorreceptores, 2. capa nuclear externa, 3. capa plexiforme externa, 4. capa nuclear interna, 5. capa plexiforme interna, 6, células ganglionares, y 7. capa de fibras nerviosas; b) detección de MT1/2 con Ab primario anti-MT1/2 marcado con <sup>nat</sup>AgNCs;</b>	

y c) detección de SOD1 con Ab primario anti-SOD1 marcado con  $^{109}\text{AgNC}$ . Las imágenes b y c recogen dos imágenes independientes con la emisión de fluorescencia de los bioconjugados en rojo ( $^{nat}\text{AgNCs}$  o  $^{109}\text{AgNCs}$ , respectivamente) y la emisión de los bioconjugados junto con la emisión de DAPI (esto después en azul). .....176

**Figura 41. Análisis de la retina neurosensorial en tejidos oculares humanos después del protocolo IHC con AgNCs y detección por LA-ICP-MS. a) Imagen elemental de  $^{107}\text{Ag}$  (en cps) obtenida usando el bioconjugado anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  para la detección de MT1/2; y b) imagen elemental de  $^{109}\text{Ag}$  (en cps) obtenida usando el bioconjugado anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$  para la detección de SOD1. ....178**

**Figura 42. Imágenes de la fracción molar de  $^{nat}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  obtenidas por LA-ICP-MS en la retina humana para una sección de tejido sometida al protocolo IHC con el bioconjugado anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  y bioconjugado anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$ . El área incluida dentro de las dos líneas de color marrón claro dibujadas en las imágenes señala la zona de la retina ablacionada con el láser. a) fracción molar de  $^{nat}\text{Ag}$ ; y b) fracción molar de  $^{109}\text{Ag}$ . ....180**

**Figura 43. Perfiles de elución obtenidos para los protocolos 1 (a), y protocolo 2 (b) utilizando 0,5 mL de resina AG50W-X8. ....196**

**Figura 44. Valores de  $\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$  obtenidos para los controles y pacientes con glaucoma después de aplicar la corrección por bracketing. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medida de dos réplicas para las muestras simbolizadas como un círculo blanco. Las barras de error para las muestras en los círculos negros corresponden a la RSD (expresada en %) obtenida durante la medida de  $^{44}/^{42}\text{Ca}$  para cada estándar realizada entre cada muestra. ....199**

# ÍNDICE DE TABLAS

---

<i>Tabla 1. Ejemplo de estrategias para la calibración de la relación <math>^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}</math> en espectrometría de masas. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 2. Parámetros analíticos de cada kit ELISA empleado en la cuantificación de las proteínas seleccionadas. ....</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 3. Características demográficas de pacientes con DMAE y sujetos control ....</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 4. Tratamientos orales comunes en ambos pacientes control y DMAE .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 5. Concentraciones de proteínas y elementos determinados en el fluido lacrimal de pacientes con DMAE y pacientes control. ....</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 6. Concentraciones de proteína y elementos determinados en lágrima de pacientes con DMAE (n=17) y sujetos control (n=27), después de excluir a los pacientes con dislipidemia. ....</i>	<i>113</i>
<i>Tabla 7. Mejores modelos de aprendizaje automático (Machine-learning models) utilizando las variables MT1A, Na y Mg, cuando se comparan pacientes DMAE y sujetos control. ....</i>	<i>115</i>
<i>Tabla 8. Absorbancia medida con el inmunoensayo ELISA para estudiar la influencia de la relación molar Ab:AgNCs en las capacidades de reconocimiento .....</i>	<i>147</i>
<i>Tabla 9. Comparación de los límites de detección y rangos lineales obtenidos usando diferentes concentraciones de CFH para la inmovilización en portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina. ....</i>	<i>148</i>
<i>Tabla 10. Determinación de CFH en sueros humanos mediante el procedimiento de inmunoensayo AgNCs. Los resultados se comparan con los obtenidos con un kit ELISA comercial. En ambos métodos, las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de tres medidas independientes. ....</i>	<i>150</i>
<i>Tabla 11. Condiciones instrumentales de ablación láser e ICP-MS para el análisis de secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS. ....</i>	<i>166</i>
<i>Tabla 12. Absorbancia medida con el inmunoensayo ELISA para el estudio de la influencia de la relación molar Ab:<sup>nat</sup>AgNCs en las capacidades de reconocimiento del anticuerpo (MT1/2) antes y después de la incubación con la amina primaria (relación molar de 1:20 bioconjugado:hidroxilamina). ....</i>	<i>174</i>
<i>Tabla 13. Configuración de la copa y los ajustes instrumentales empleados para la medida de relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS. ....</i>	<i>192</i>
<i>Tabla 15. Condiciones experimentales del protocolo 1 y 2 evaluadas para la purificación de Ca. Para ambos procedimientos se utilizó 0,5 mL de resina AG50W-x8. ....</i>	<i>195</i>
<i>Tabla 14. Concentraciones elementales (incertidumbre estimada de 3%) del Ca medido en muestras de humor acuoso y recuperaciones de Ca obtenidas después del proceso de purificación mediante ICP-MS. Se indica el volumen de muestra de humor acuoso</i>	

*disponible para cada análisis. Los valores de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  obtenidos han sido corregidos. Las Incertidumbres para CT2 y CT4 corresponden a la desviación estándar para la medida de dos réplicas de la misma muestra. Para el resto de las muestras, la incertidumbre corresponde a la RSD (expresada en %) obtenida de la medida de  $^{44/42}\text{Ca}$  para cada estándar realizada entre cada muestra. ....198*

# LISTADO DE ABREVIATURAS

---

<b>Ab</b>	<i>Anticuerpo</i>
<b>AD</b>	<i>Enfermedad de Alzheimer (Alzheimer`s disease)</i>
<b>ADN</b>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<b>AF4</b>	<i>Fraccionamiento por flujo de campo asimétrico</i>
<b>Ag</b>	<i>Antígeno</i>
<b>AgNCs</b>	<i>Nanoclústeres de plata (gold nanoclusters)</i>
<b>ARN</b>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<b>AuNCs</b>	<i>Nanoclústeres de oro (gold nanoclusters)</i>
<b>AuNPs</b>	<i>Nanopartículas de oro</i>
<b>BSA</b>	<i>Albúmina de suero bovino</i>
<b>CA</b>	<i>Corriente alterna</i>
<b>CMFDA</b>	<i>Diacetato de 5-clorometilfluoresceina (5-chloromethylfluorescein diacetate)</i>
<b>CE</b>	<i>Electroforesis capilar (capillary electrophoresis)</i>
<b>CNV</b>	<i>Neovascularización coroidea</i>
<b>CRC</b>	<i>Celdas de colisión/reacción</i>
<b>CSF</b>	<i>Líquido cerebroespinal</i>
<b>CuNCs</b>	<i>Nanoclústeres de cobre (copper nanoclusters)</i>
<b>DC</b>	<i>Corriente continua</i>
<b>DMAE</b>	<i>Degeneración macular asociada a la edad</i>
<b>ELA</b>	<i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>
<b>ELISAs</b>	<i>Enzimoinmunoensayos de adsorción</i>

<b>EPR</b>	<i>Epitelio pigmentario de la retina</i>
<b>ESI</b>	<i>Ionización por electrospray (electrospray ionization)</i>
<b>FFF</b>	<i>fraccionamiento por flujo de campo (FFF)</i>
<b>GSH</b>	<i>Glutación</i>
<b>H2MSA</b>	<i>Ácido mercaptosuccínico</i>
<b>HOMO</b> <i>(highest occupied molecular orbital)</i>	<i>Orbital molecular ocupado de más energía</i>
<b>HR-TEM</b> <i>(transmission electron microscopy)</i>	<i>Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución</i>
<b>ICP-MS</b> <i>plasma)</i>	<i>Plasma de acoplamiento inductivo (inductively coupled plasma)</i>
<b>IDMS</b>	<i>Dilución isotópica con espectrometría de masas</i>
<b>IgA</b>	<i>Inmunoglobulina A</i>
<b>IgE</b>	<i>Inmunoglobulina E</i>
<b>IgG</b>	<i>Inmunoglobulina G</i>
<b>IgD</b>	<i>Inmunoglobulina D</i>
<b>IgM</b>	<i>Inmunoglobulina M</i>
<b>IPD</b>	<i>Deconvolución de perfiles isotópicos</i>
<b>LA</b>	<i>Ablación láser</i>
<b>L-dopa</b>	<i>L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)</i>
<b>LUMO</b>	<i>Orbital molecular no ocupado de más baja energía (lowest unoccupied molecular orbital)</i>
<b>MALDI</b>	<i>Desorción/ionización láser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization)</i>
<b>MC-ICP-MS</b>	<i>Plasma de acoplamiento inductivo de analizador de masas de tipo multicolector</i>
<b>MHz</b>	<i>Megahercios</i>

<b>MNCs</b>	<i>Nanoclústeres metálicos</i>
<b>MNPs</b>	<i>Nanopartículas metálicas</i>
<b>MS</b>	<i>Espectrometría de masas (mass spectrometry)</i>
<b>NIR</b>	<i>Infrarrojo cercano</i>
<b>NPs</b>	<i>Nanopartículas</i>
<b>PAMAM</b>	<i>Dendrímero de poli(aminoamida) (polyamidoamine)</i>
<b>PEI</b>	<i>Polímero de poli(etilenimina) (polyethylenimine)</i>
<b>PEX</b>	<i>Pseudoexfoliación</i>
<b>PEXG</b>	<i>Glaucoma pseudoexfoliativo</i>
<b>PIO</b>	<i>Presión intraocular</i>
<b>POAG</b>	<i>Glaucoma primario de ángulo abierto</i>
<b>QDs</b>	<i>Puntos cuánticos (Quantum dots)</i>
<b>QQQ</b>	<i>Triple cuadrupolo</i>
<b>QY</b>	<i>Rendimiento cuántico (quantum yield)</i>
<b>RIA</b>	<i>Radioinmunoensayos</i>
<b>RF</b>	<i>Corriente de radiofrecuencias</i>
<b>ROS</b>	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
<b>SC</b>	<i>Single cell</i>
<b>SEM</b>	<i>Multiplicador de electrones secundarios</i>
<b>SPR</b>	<i>Resonancia de plasmón superficial (surface plasmon resonance)</i>
<b>TIMS</b>	<i>Espectrometría de masas basada en ionización térmica</i>
<b>TOF</b>	<i>Tiempo de vuelo (time of flight)</i>
<b>Vis-UV</b>	<i>Visible – ultravioleta</i>

**W**

*Vatios*

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas

El conjunto de cambios que se van produciendo progresivamente con la edad y que se relacionan con una mayor sensibilidad a desarrollar enfermedades y que puede desembocar en la muerte de la persona se conoce como **envejecimiento**<sup>1</sup>. El envejecimiento es un proceso irreversible, siendo el factor de riesgo predominante que limita la prolongación de la vida saludable. De acuerdo con los datos provenientes del informe realizado por las Naciones Unidas en 2019 sobre las perspectivas de población mundial<sup>2</sup>, 1 de cada 11 personas en el mundo tiene actualmente una edad por encima de los 65 años (9%) y se estima que dicha tasa aumentará a 1 de cada 6 personas en el año 2050 (16%). En este escenario, un mayor envejecimiento de la población contribuirá por tanto a que ciertas enfermedades consideradas ocasionales pasen a ser más frecuentes, con un impacto particular en las patologías neurodegenerativas asociadas a la edad.

Las **enfermedades neurodegenerativas** son un conjunto de afecciones que se caracterizan por el deterioro progresivo de las actividades neuronales, que comúnmente están relacionadas con alteraciones morfológicas y estructurales. Patologías como la enfermedad de Parkinson<sup>3</sup>, la esclerosis lateral amiotrófica<sup>4</sup>, o la enfermedad de Alzheimer<sup>5</sup>, entre otras, han sufrido un notable incremento en su prevalencia los últimos años. De hecho, las que afectan al sistema nervioso central, como el Parkinson o el Alzheimer, son las más prevalentes en la actualidad<sup>6,7</sup>. Las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad presentan características y patrones moleculares caracterizados por la acumulación anormal de proteínas, degeneración neuronal selectiva y muerte celular<sup>8,9</sup>. Así, por ejemplo, se ha identificado la deposición de proteínas oligomerizadas insolubles dentro del ojo y el cerebro durante el inicio y la progresión de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, incluida el Alzheimer<sup>10</sup>, el Parkinson<sup>11</sup>, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y el glaucoma pseudoexfoliativo (PEXG)<sup>12</sup>.

La DMAE y el glaucoma constituyen las enfermedades oculares neurodegenerativas más frecuentes relacionadas con el sistema visual<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup>, y que han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, pueden derivar en ceguera irreversible con el tiempo. Esta pérdida de visión se produce como consecuencia de la muerte celular selectiva de las células neurosensarles de la retina. La presencia de proteínas mal plegadas en DMAE y PEXG contribuyen a la formación de depósitos sólidos extracelulares (o agregados) con el consiguiente deterioro de las funciones visuales y cognitivas<sup>13</sup>. Estas enfermedades comparten: (i) la presencia de depósitos de agregados proteicos intra o extracelulares<sup>14</sup>, (ii) el aumento del estrés oxidativo que daña los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, (iii) la disfunción de la actividad mitocondrial y activación de los procesos inflamatorios, y (iv) una posible dishomeostasis de metales<sup>15,16</sup>.

### **1.1. Degeneración macular asociada a la edad**

Una de las principales causas de pérdida irreversible de visión central en edades superiores a los 60 años es la DMAE<sup>17</sup>. Alrededor de 196 millones de personas padecen esta enfermedad a escala global. En 2040, se estima que este número podría alcanzarlos 288 millones como consecuencia del aumento de la esperanza de vida. En lo que respecta a la población española, según el Instituto Nacional de Estadística (INE) se estima que el número de casos de DMAE supera los 750.000, y se prevé un incremento exponencial de la prevalencia de DMAE por encima de ese valor. Además de la edad, los principales factores de riesgo que pueden conducir al desarrollo de la DMAE son el tabaquismo, las enfermedades cardiovasculares, la genética y/o la dieta<sup>¡Error! Marcador no definido.</sup>.

La DMAE es una enfermedad degenerativa ocular que afecta a una región concreta de la retina, la mácula. Esta zona, de 6 mm de diámetro, se encuentra en el polo posterior del ojo y es la encargada de la visión central, permitiendo observar objetos con detalle y en color. La región posterior del ojo está constituida por la retina en el interior, y la esclera en el exterior. La retina transforma los estímulos visuales en impulsos nerviosos que son transmitidos al cerebro para generar la visión. Como se

ilustra en la Figura 1, la retina se compone de dos partes: la retina neuronal, formada por múltiples capas de neuronas; y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Este último, se encuentra en contacto con la denominada membrana de Bruch (BrMb), la cual, constituye la capa más interna de una estructura de tejido conectivo altamente vascularizado, la coroides. La coroides incluye también el coriocapilaris (CC), una red de capilares que drena el tercio externo de la retina donde se encuentran los fotorreceptores (FR). La vascularización del resto de la retina (sus dos tercios internos) corre a cargo de un sistema compuesto por la arteria y vena centrales de la retina, que son ramificaciones de la arteria oftálmica<sup>18</sup>.

Anatómicamente, la retina, se compone de nueve capas formadas por diferentes tipos de células neuronales (los fotorreceptores, células horizontales, neuronas bipolares, células amacrinas, células de Müller y células ganglionares) y por los contactos sinápticos que se establecen entre ellas. Las principales capas de la retina incluyen la capa más externa nuclear que contiene a los fotorreceptores (conos y bastones), una capa interna nuclear constituida por interneuronas (células horizontales, bipolares y amacrinas) y finalmente, una capa de células ganglionares que conforman el nervio óptico (Figura 1).

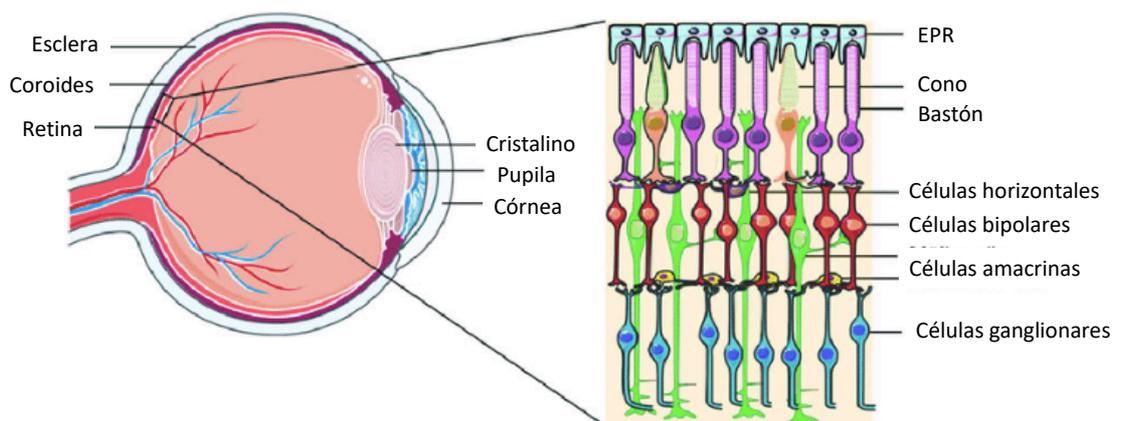


Figura 1. Esquema del ojo y estructura de la retina. Figura adaptada de la referencia 19.

Como ya se mencionó anteriormente, en contacto con la retina neural se encuentra el EPR constituido por una monocapa de células epiteliales hexagonales que

se caracterizan por presentar una gran cantidad de pigmentos en su citoplasma, almacenados en melanosomas y otras vesículas como son los gránulos de lipofuscina. El EPR, además de conformar la barrera hemato-retiniana externa<sup>Error! Marcador no definido.</sup>, realiza funciones fundamentales como son la regulación de los melanosomas en la absorción de la luz, la fagocitosis de segmentos externos, el transporte de nutrientes y metabolitos hacia los fotorreceptores.

La DMAE conlleva una serie de alteraciones de la estructura normal de la retina, específicamente en el EPR, que tienen como consecuencia final la muerte de los fotorreceptores y la pérdida progresiva de la visión (Figura 2). Con el envejecimiento se produce la acumulación de ciertas sustancias en la en la matriz extracelular de la BrMb que proceden tanto del EPR como del CCy dan lugar a depósitos denominados drusas. Como resultado de la aparición de estos depósitos, aumenta la hidrofobicidad de la BrMb y disminuye su elasticidad, haciendo que el transporte de metabolitos a través de ella sea más dificultoso. Las drusas crecen en tamaño y número a medida que la retina va envejeciendo, pudiendo llegar a bloquear el flujo de nutrientes y desechos a través del EPR, lo que provocaría la muerte neuronal en la región macular<sup>20</sup>.



Figura 2. De izquierda a derecha, persona con capacidad visual sin patologías y con DMAE.

Por tanto, la presencia de drusas en la región macular de la retina se considera la principal característica clínica de la DMAE desde sus etapas más tempranas, sin embargo, máculas envejecidas con normalidad también pueden hallarse este tipo de

depósitos en menor cantidad<sup>iError! Marcador no definido.</sup>. La composición y naturaleza de las drusas es compleja y ha sido ampliamente investigada, ya que se considera una posible diana terapéutica para prevenir, disminuir o detener la progresión de esta enfermedad mediante la modulación de su formación. Sin embargo, el conjunto de mecanismos que conducen a la formación de estos depósitos aún no ha sido desvelado<sup>iError! Marcador no definido.</sup>,<sup>21</sup>. Las drusas se caracterizan en base a la morfología que presentan, color, extensión y tamaño. En lo que se refiere a las dimensiones de estos depósitos, en la categoría de drusas pequeñas pueden englobarse aquellas de un tamaño inferior a 63  $\mu\text{m}$ , entre 63 y 125  $\mu\text{m}$  se encontrarían las drusas de tamaño mediano y finalmente, las drusas grandes serían aquellas con tamaño superior a 125  $\mu\text{m}$ . La apariencia de las drusas va desde el amarillo al blanco y en lo que respecta a la morfología cabe distinguir entre duras y blandas. Un tamaño más reducido y el hecho de estar diferenciadas de otras es lo que caracteriza a las drusas duras. En cambio, las formas amorfas son características de las drusas blandas, presentando tamaños superiores a las duras, pudiendo estar apiladas entre ellas.

Aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto que desencadena la aparición de la DMAE, existen múltiples evidencias que la relacionan con procesos tales como inflamación, estrés oxidativo y con defectos estructurales y relacionados con el metabolismo lipídico<sup>22</sup>. Además, se tienen indicios claros de la relación de esta enfermedad con comportamientos anómalos en el EPR, la membrana de Bruch o con la disfunción mitocondrial. Las etapas tempranas de la DMAE se caracterizan por la presencia de múltiples drusas en la región macular, provocando síntomas visuales leves. En estas etapas iniciales también aparecen otro tipo de depósitos por debajo del EPR y en el espacio entre este y los FR (depósitos basales lineales, depósitos basales laminares y pseudodrusas). El engrosamiento de la BrMb debido a las drusas y estos depósitos dificulta cada vez más el transporte de nutrientes y oxígeno entre la coroides y la retina, causando la progresión de la enfermedad hacia una DMAE avanzada. Esta patología tiene mal pronóstico y no tiene tratamiento en su forma más habitual<sup>iError! Marcador no definido.</sup>.

## **Tipos de DMAE**

La degeneración macular asociada a la edad se puede clasificar en DMAE temprana, intermedia y tardía, evolucionado a las formas atrófica o neovascular<sup>23</sup>.

- **DMAE temprana**

Se caracteriza por la presencia de drusas de pequeño tamaño y por la aparición de zonas hiperpigmentadas o hipopigmentadas.

- **DMAE intermedia**

En este estadio de la DMAE se observa al menos una drusa grande y varias drusas de tamaño intermedio. Además, se produce una atrofia geográfica, aunque no llega a extenderse al centro de la mácula.

- **DMAE tardía: Forma seca**

Esta forma es la más frecuente dentro de DMAE (constituyendo el 85-90% de los casos diagnosticados)<sup>24</sup>. También resulta ser la menos severa, debido a que el daño producido en las capacidades visuales tiene lugar de forma lenta en el tiempo. Inicialmente, suelen generarse zonas de adelgazamiento o hipopigmentación del RPE junto con, en ocasiones, formación de depósitos extracelulares (drusas). Este fenómeno conduce a la degeneración lenta y gradual de las células del RPE y su consecuente atrofia. La atrofia geográfica (AG) comprende la última etapa de la DMAE seca, cuyas principales características son la presencia de áreas definidas con pérdida del RPE seguida de la degeneración de los FR adyacentes y el adelgazamiento de la retina<sup>25</sup>. A partir de este tipo de DMAE, puede originarse la forma húmeda de DMAE<sup>26</sup>.

- **DMAE tardía: Forma exudativa o húmeda**

Con el objeto de paliar la carencia de nutrientes y oxígeno como consecuencia de la formación de drusas en la matriz extracelular de la BrMb, se desencadena la aparición de la DMAE húmeda. El desarrollo de esta forma de DMAE viene ligado a la producción de nuevos vasos sanguíneos a partir del CC a través de un proceso denominado neovascularización (CNV). El RPE puede ser responsable de la CNV ya que, en una

situación de hipoxia, produce factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los nuevos vasos sanguíneos atraviesan la BrMb e invaden el espacio subretiniano donde, debido a su fragilidad, se quiebran y liberan su contenido. produciéndose el desplazamiento del RPE (debido a la acumulación de líquido en esa zona) y el consecuente desprendimiento de la coroides. Este último hecho da lugar a la degeneración de los FR, provocando un enorme daño en la visión del paciente. La estabilización de las áreas de CNV se produce en las últimas etapas de la DMAE húmeda, de tal forma se generan cicatrices disciformes que finalmente originan la pérdida final de la visión. Normalmente, la evolución de la forma húmeda es más rápida con un peor pronóstico en comparación con la DMAE seca. No obstante, la forma húmeda afecta a los pacientes con una menor incidencia (entre 10-15 %)<sup>Error! Marcador no definido.</sup>.

## **1.2. Glaucoma**

Cerca de 6 millones de personas en el mundo sufren ceguera irreversible como consecuencia del glaucoma<sup>27</sup>. Es una de las principales causas de ceguera en países industrializados y se estima que el número de personas afectadas en todo el mundo supera los 80 millones, con más de 1 millón de afectados en España<sup>28</sup>. El glaucoma engloba un grupo de neuropatías ópticas de origen multigénico y multifactorial caracterizadas por la degeneración progresiva del nervio óptico, la muerte de las células ganglionares de la retina y la pérdida de campo visual<sup>Error! Marcador no definido.</sup>.

El comienzo de esta patología es, mayoritariamente, asintomático y el diagnóstico se realiza cuando ya se ha producido una importante, e irreversible, pérdida de visión iniciándose esta con la reducción del campo visual en la periferia para continuar progresando hacia el área central, dando lugar a lo que se conoce popularmente como “visión o efecto túnel” (Figura 3). En la mayoría de los casos, la degeneración de la cabeza del nervio óptico precede al daño detectable del campo visual, estimándose que el umbral de diagnóstico del glaucoma conlleva la pérdida entre el 25% y el 35% de células ganglionares de la retina (Figura 1)<sup>29</sup>. En los estadios tempranos de la enfermedad, es posible que se pierda la capacidad de discriminación

del color o sufrir sensibilidad al contraste<sup>30</sup>. El principal factor de riesgo asociado con el glaucoma es la elevación de la presión intraocular (PIO), la cual, está relacionada con una disfunción en el drenaje del humor acuoso debido a una obstrucción de la malla trabecular, aunque existen diferencias importantes en cuanto a la etiología y los mecanismos que desencadenan la aparición de glaucoma<sup>31</sup>.



Figura 3. A) paciente con visión normal B) paciente con glaucoma. Imagen adaptada de la referencia ¡Error! Marcador no definido..

El glaucoma se clasifica principalmente en los subtipos de ángulo abierto o de ángulo cerrado, pudiéndose dividir a su vez ambos tipos en glaucoma primario o secundario<sup>32</sup>. La tipología de glaucoma más frecuente en países desarrollados, son el glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) y el glaucoma pseudoexfoliativo (GPXE)<sup>33</sup>. El GPXE es un glaucoma de tipo secundario relacionado con el crecimiento de agregados fibrilares con material procedente de tejidos del segmento anterior del ojo (es decir, iris, cristalino y cuerpo ciliar) y que se produce en personas con síndrome pseudoexfoliativo (PEX)<sup>34</sup>. En ciertas regiones del mundo, como el noroeste de España -concretamente Asturias- la prevalencia de GPXE entre pacientes con dicho síndrome puede alcanzar hasta el 30%<sup>35</sup>. No obstante, en ambas patologías glaucomatosas, la incidencia en el comienzo y en la velocidad de neurodegeneración óptica se incrementa con la edad, conduciendo en última instancia a la ceguera irreversible.

### **1.3. Importancia del estudio de las enfermedades neurodegenerativas oculares**

El ojo humano se encuentra continuamente expuesto a procesos oxidativos e inflamatorios. La hipótesis de la neurodegeneración basada en la dishomeostasis de metales es altamente plausible según la literatura actual, con el envejecimiento como un factor de riesgo crucial. La dishomeostasis de metales contribuye a la producción de radicales libres, inflamación y apoptosis. Durante el daño oxidativo, la producción endógena de defensas antioxidantes disminuye drásticamente dando lugar a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La degeneración y disfunción de los tejidos oculares ocurre a consecuencia del desequilibrio entre la producción y neutralización de los ROS, lo que da lugar a la oxidación de proteínas, ADN, ARN y/o lípidos, contribuyendo a la inflamación y apoptosis celular<sup>36</sup>. La dishomeostasis de Zn, Fe, Cu y/o Ca también está relacionada con dichos eventos por lo que resulta evidente la existencia de una relación entre la dishomeostasis de metales, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación, el envejecimiento y la muerte celular. Así, el ojo y el sistema visual pueden ser entendidos como una vía directa para el estudio de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad <sup>iError! Marcador no definido.,37</sup>.

En este contexto, y considerando que se requiere una mayor comprensión de los efectos de los cambios de metales en los procesos subyacentes a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, la aplicación de enfoques analíticos y bioquímicos innovadores, incluido el análisis metaloproteómico, puede contribuir a arrojar luz sobre las interacciones metal-proteína y sus efectos patógenos. invasivas y no invasivas para el estudio de enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad, que serán brevemente descritas en las próximas secciones.

#### **1.4. Tipos de muestras de origen biológico para el estudio de enfermedades neurodegenerativas**

Los estudios realizados en muestras procedentes de tejidos biológicos<sup>38,39</sup>, así como en los distintos tipos de fluidos presentes en el cuerpo humano (suero, plasma,

fluido lacrimal o líquido cerebroespinal (LCE) o cefalorraquídeo (LCR))<sup>40,41,42</sup>, permiten la identificación de biomarcadores candidatos, tanto proteínas, metabolitos y elementos esenciales, con potencial aplicabilidad para la detección de patologías en sus etapas iniciales. No obstante, el análisis de algunos tipos de muestras biológicas viene condicionado en ocasiones por un volumen/masa disponible limitado (tejido, líquido cefalorraquídeo, fluido lagrimal, humor acuoso) o por la complejidad de muestra objeto de estudio complejidad (suero, orina). Adicionalmente, es preferible emplear una muestra biológica cuya toma de muestra sea no invasiva. En este sentido, a continuación, se abordan estudios recientes en los que la espectrometría de masas se ha empleado para investigar la dishomeostasis de metales (a nivel de concentraciones elementales) en la evaluación y/o el diagnóstico de enfermedades. A tal fin, se presentan dos apartados diferenciados, el primero de ellos para fluidos biológicos que requieren toma de muestra invasiva y seguidamente fluidos biológicos cuya toma de muestra es de naturaleza no invasiva. Adicionalmente, únicamente se hará referencia a aquellos estudios que persigan el análisis de muestras de las que se disponga de un volumen pequeño (< 100 µL), es decir, aquellos casos cuya determinación suponga un reto en cuanto a la metodología analítica.

#### **1.4.1. Fluidos biológicos con toma de muestra invasiva**

Existen una amplia variedad de fluidos biológicos que requieren de procedimientos invasivos para su posterior análisis: fluido folicular, sangre, orina fetal, fluido amniótico, sinovial, peritoneal, líquidos intraoculares o líquido cerebroespinal. No obstante, esta sección se centrará únicamente en aquellos cuyas aplicaciones en la bibliografía son más numerosas.

La **sangre y suero humano** son de las muestras biológicas más ampliamente estudiadas. Aunque se requiere un protocolo invasivo para su extracción, normalmente es un tipo de fluido fácil de conseguir por la simplicidad y cotidianidad del procedimiento. Aunque en este tipo de muestra el volumen no suele suponer una limitación en adultos, en el caso de recién nacidos o pacientes con enfermedades

crónicas si que puede haber limitación. En este último caso se puede recurrir por ejemplo a depositar la muestra sobre un papel de filtro para posterior determinación elemental (Figura 4). Tras el análisis, se pueden establecer correlaciones entre los niveles de determinados elementos y la presencia de un determinado desorden metabólico<sup>43,44</sup>.

También son habituales los trabajos realizados a partir de suero humano. Así, por ejemplo, Abduljabbar et al.<sup>45</sup>, con solo 30  $\mu$ L de suero llevaron a cabo la determinación de Zn, Cu y Fe en suero de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (n = 43) y DMAE (n = 38) y los compararon con los niveles de Fe, Cu y Zn disponibles en la literatura en individuos sanos del mismo grupo etario. En el caso de Fe, se encontró un mayor rango de concentraciones en comparación con los otros dos elementos, con niveles superiores en los individuos con DMAE.



Figura 4. Estudio de muestras de sangre de recién nacidos a partir de muestras de sangre secadas sobre papel. Figura adaptada de la referencia **¡Error! Marcador no definido..**

Otro ejemplo reciente relacionado con el estudio de DMAE<sup>46</sup> en suero, además de los niveles elementales de Cu, Fe, K, Mg, Na, P y Zn también evalúa la composición isotópica de Cu como potencial indicador de esta patología. Concretamente, establecieron diferencias significativas entre el grupo control (n = 17) y el de individuos con DMAE (n = 20) para P y Zn. Así mismo, se observó un fraccionamiento isotópico de Cu hacia el isótopo más ligero en el grupo DMAE respecto del grupo control.

Con toma de muestra invasiva, pero menos estudiado en comparación con la sangre/suero debido a la necesidad de realizar una punción lumbar su recogida es el **líquido cerebroespinal** (LCE). Si bien el volumen de muestra recogido suele ser 100-150 mL, no se suele disponer de ese volumen para labores de investigación. En la bibliografía se recogen estudios para enfermedades tales como la esclerosis amiotrófica lateral <sup>47</sup> el Alzheimer <sup>48</sup>, entre otras, en en LCE.

En relación directa con la presente Tesis Doctoral, cabe mencionar los fluidos oculares y más concretamente intraoculares como son el **humor acuoso y el humor vítreo**. Ambos fluidos son vitales en la fisiología del ojo. En el caso del humor acuoso, la toma se lleva a cabo mediante punción en la cámara anterior del globo ocular recogándose volúmenes típicamente por debajo de 250 µL. El humor vítreo es accesible a través de vitrectomías y biopsias realizadas durante procedimientos quirúrgicos. En este contexto, se han estudiado distintas enfermedades oculares <sup>49,50</sup> incluyendo el glaucoma, para la cual se han observado diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones elementales de P y Mg entre pacientes control (n = 16) y pacientes con de glaucoma (n = 22) <sup>51</sup>. En humor vítreo la mayor parte de las publicaciones disponibles se centran en análisis forense y toxicológico <sup>52-54</sup>.

Finalmente, como fluidos biológicos con toma de muestra invasiva y sus aplicaciones en el contexto descrito en este apartado, cabe incluir el **líquido sinovial** <sup>55</sup>, **folicular** <sup>56</sup>, **ammniótico** <sup>57</sup>, **peritoneal** <sup>58</sup> y **la orina fetal** <sup>59</sup>.

#### **1.4.2. Fluidos biológicos con toma de muestra no invasiva**

En la actualidad, existe una creciente preferencia por el uso de fluidos biológicos en los que no se precise emplear métodos de toma de muestra invasivos para la búsqueda de biomarcadores. Ejemplos de este tipo de fluidos incluyen el **fluido lagrimal**, el **exudado nasal** <sup>60,61</sup>, el **líquido seminal** <sup>62,63</sup>, la **orina** <sup>64-68</sup>, la **saliva** <sup>69-71</sup>, el **sudor** <sup>72,73</sup> o la **leche materna** <sup>74,76</sup>. Al igual que en el caso de los fluidos con toma de muestra invasivo son útiles para establecer correlaciones que permitan detectar enfermedades

específicas o determinar el estado fisiológico de un organismo con un procedimiento menos agresivo para el donante.

De los fluidos anteriormente, expuestos, en lo que al estudio de patologías oculares se refiere solo hay descritos trabajos en los que se emplea el fluido lagrimal (o lágrima). Este consiste en una película delgada formada por una capa lipídica externa, una capa acuosa intermedia y una capa proteica interna. El **fluido lagrimal** está compuesto mayoritariamente por agua (90%) y en mucha menor proporción por proteínas, lípidos, electrolitos y oligoelementos<sup>77</sup>. La recogida de lágrima se puede llevar a cabo con microcapilares de vidrio de 5 a 10  $\mu\text{L}$  de volumen interno (Figura 5 a), con tiras de Schirmer (Figura 5 b) u otros materiales absorbentes como por ejemplo las miniesponjas, o mediante el enjuague del ojo con una solución salina que posteriormente será recogida<sup>78</sup>. En el primer caso, el microcapilar se coloca en el menisco inferior del ojo (se recomienda parpadear para evitar la inducción de lagrimeo reflejo)<sup>79</sup>. La extracción mediante tiras de Schirmer consiste en colocar tiras de papel dentro del párpado inferior de ambos ojos durante un tiempo fijado para medir la producción de lágrimas. Si es necesario, los analitos se pueden lixiviar de la tira para llevar a cabo análisis (bio)químicos (con el consiguiente riesgo de contaminación o pérdida de los analitos debido a recuperaciones no cuantitativas). Por otro lado, en el caso de utilizar una solución salina para la recogida de la lágrima, se debe tener en cuenta que se producirá una dilución de la muestra.

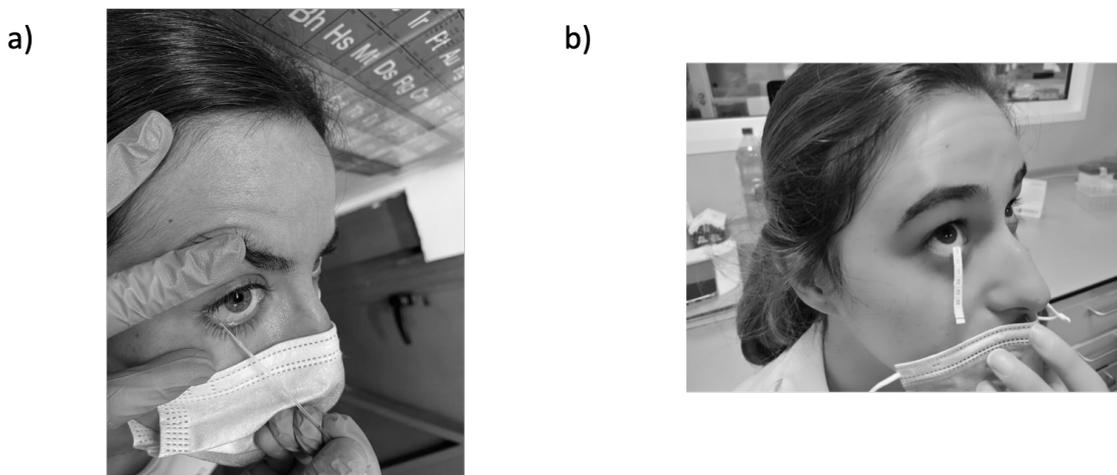


Figura 5. Recogida de lágrima mediante a) microtubos capilares de vidrio b) tiras Schirmer.

Existen estudios en la bibliografía en lo que el líquido lagrimal se ha utilizado para investigar alteraciones de proteínas y lípidos en enfermedades oculares <sup>iError! Marcador no definido.,80</sup>. Sin embargo, son muy pocos artículos de investigación en los que se haya llevado a cabo la determinación de oligoelementos en. En 2017, Cancarini *et al.*<sup>81</sup> llevaron a cabo la determinación elemental de Cu, Zn Se, Rb, Ba, Pb, Mn, Co y Cr en fluido lagrimal y suero de individuos con diabetes tipo II (n = 47) con respecto a un grupo control (n = 50). La cuantificación se realizó a partir de un volumen de 10 µL de película lagrimal recogido en tiras Schirmer. Después del análisis estadístico de los resultados obtenidos, se encontraron niveles más altos de Zn, Cr, Co, Mn, Ba y Pb en el líquido lagrimal del grupo diabético respecto del grupo control.

Por otra parte, el exudado nasal no ha sido muy investigado como muestra. Sin embargo, la reciente descripción del sistema de drenaje linfático cerebral, mostrando como los vasos que drenan hacia las fosas nasales y los ganglios linfáticos cervicales<sup>82</sup>, podría suponer nuevas oportunidades para obtener información del sistema nervioso central.

A continuación, se exponen los distintos tipos de técnicas analíticas y bioanalíticas con potencial aplicabilidad en el estudio de enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad que han sido empleadas durante la realización de la presente Tesis Doctoral.

## **2. Inmunoensayos**

La técnica bioanalítica basada en el uso de un anticuerpo o antígeno para detectar o cuantificar un analito en una muestra, se conoce como inmunoensayo. El fundamento de los inmunoensayos se basa en la transducción de la señal analítica resultante de la interacción que se produce entre un antígeno y un anticuerpo.

Asimismo, durante el desarrollo de un inmunoensayo, se pueden emplear marcas para la obtención de la señal analítica<sup>83</sup>.

Cabe definir un anticuerpo como una inmunoglobulina generada por los linfocitos B en respuesta a la presencia de un antígeno. Esta producción de anticuerpos se desencadena en respuesta a la presencia de un inmunógeno en un organismo vivo. En esta situación, los linfocitos B del organismo se activan dando lugar a anticuerpos con alta especificidad de unión al inmunógeno. Es necesario mencionar aquí que si bien todos los inmunógenos se consideran antígenos (respuesta inmunológica), no todos los antígenos conllevan a la producción de anticuerpos. De este modo, por ejemplo, los haptenos que son moléculas de bajo peso molecular requieren estar enlazados a componentes de mayor peso molecular para adquirir la capacidad de producir anticuerpos<sup>84</sup>.

Existen cinco tipos de inmunoglobulinas atendiendo a su función biológica y estructura: IgG, IgA, IgE, IgM y IgD. Concretamente, la IgG, es la más utilizada en inmunoensayos por ser la más los más comunes y estar presentes en todos los líquidos del cuerpo. Se encuentra estructurada en forma de “Y” (Figura 6) y con dos cadenas polipeptídicas pesadas cuya masa molecular oscila entre 55 - 60 KDa y otras dos cadenas ligeras de menor masa molecular 20 – 24 KDa. Los antígenos pueden unirse al anticuerpo a través de dos extremos denominados Fab de las cadenas ligeras, que actúan como áreas de reconocimiento. En el restante del anticuerpo, conocido como Fc, no se lleva a cabo el reconocimiento inmunológico, de tal forma que sirve como área de adhesión a superficies. Con respecto al antígeno, este puede ser desde una macromolécula hasta ácidos nucleicos o proteínas<sup>85</sup>.

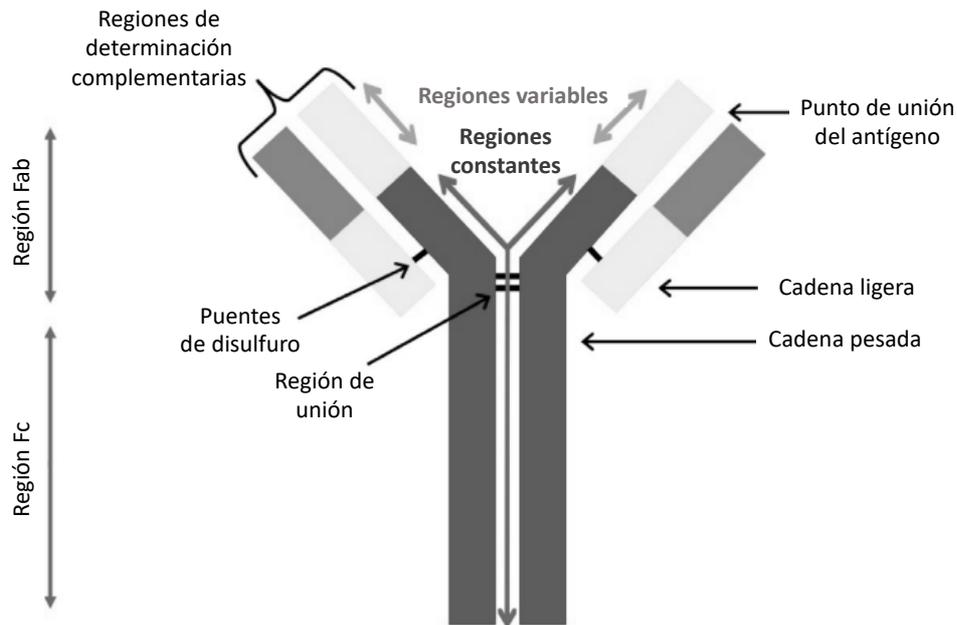


Figura 6. Representación esquemática de una inmunoglobulina G. Figura modificada de la referencia 86.

Una vez establecido el reconocimiento antígeno-anticuerpo y dentro de los distintos tipos de formatos empleados para el seguimiento de la señal producida durante una inmunoreacción, se encuentran aquellos que utilizan moléculas para el marcaje del antígeno o del anticuerpo y a su vez, existen formatos en los que no se precisa del uso de marcas, cuando la propia interacción antígeno-anticuerpo genera una señal observable. Dentro de los inmunoensayos que emplean marcas, se puede distinguir a su vez entre inmunoensayos homogéneos y heterogéneos. Los denominados homogéneos son aquellos donde no se requiere de la separación del inmunocomplejo formado durante el proceso de reconocimiento del resto de reactivos inmunológicos que han quedado sin interaccionar. Se incluyen en este punto la inmunolectroforesis e inmunoensayos de aglutinación, basados en fenómenos de transferencia de energía de resonancia fluorescente o de polarización fluorescente. Por otra parte, en los inmunoensayos heterogéneos, los agentes inmunológicos que no participan en el proceso de reconocimiento y quedan libres en el medio, son separados del inmunocomplejo, el cual se encuentra adherido a una superficie. Este tipo de inmunoensayos es más comúnmente utilizado en comparación con los homogéneos debido a las características que ofrece en cuanto a versatilidad, especificidad y sensibilidad.

Dentro de los inmunoensayos de tipo heterogeneo, es preciso hacer una nueva clasificación, diferenciando entre inmunoensayos no competitivos (no competitivos) o competitivos (Figura 7). Ambas metodologías se caracterizan por el empleo de una marca para cuantificar la reacción de reconocimiento específico antígeno-anticuerpo, con la diferencia fundamental de que en el formato competitivo el antígeno/anticuerpo sin marcar (analito) y marcado (añadido) compiten por los sitios de unión al anticuerpo/antígeno (en función del tipo de biomolécula fijada previamente en un sustrato). En el caso de los ensayos de tipo competitivo, la concentración de analito presente en la muestra será inversamente proporcional a la señal analítica medida. Por el formato tipo sándwich, tomando como ejemplo la inmovilización de un anticuerpo primario (Ab1), en primer lugar, se produce la interacción de Ab1 con el antígeno (analito) y posteriormente, un segundo anticuerpo (Ab2) que se encuentra marcado, es añadido al medio uniéndose al antígeno. Al contrario que para el formato competitivo, en este caso la medida de señal correspondiente a la formación del inmunocomplejo es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra <sup>iError! Marcador no definido.</sup>

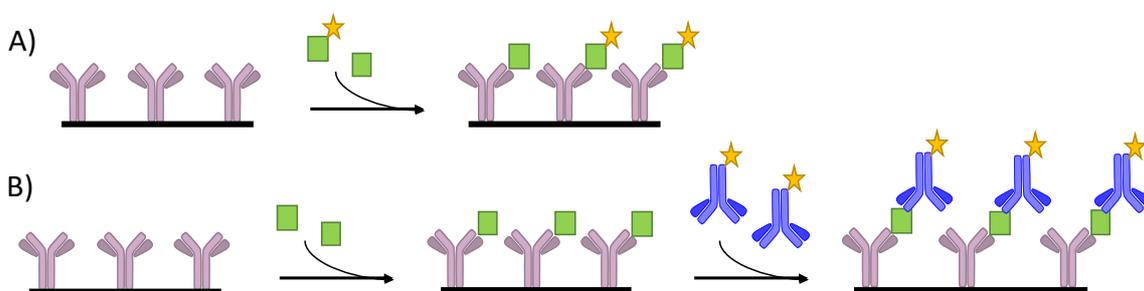


Figura 7. Tipos de formato de inmunoensayos cuando el anticuerpo se encuentra inmovilizado A) competitivo B) tipo sándwich o no competitivo

Pasaremos ahora a describir el tipo de moléculas que pueden utilizarse como marcas, gracias a las cuales es posible establecer una clasificación adicional para cada tipo de inmunoensayo<sup>87</sup>:

- **Radioinmunoensayos (RIA).** Se emplean radioisótopos como marcas. Son numerosos los ejemplos inmunoensayos de este tipo que se han hecho en el pasado, ya que fueron los pioneros en utilizarse en el formato con marcas. Estos

han sido poco a poco sustituidos por otro tipo de marcas para evitar sus elevados costes y peligrosidad.

- **Enzimáticos.** Emplean enzimas y proporcionan una amplificación catalítica con límites de detección similares a los radioinmunoensayos. En el formato heterogéneo, este tipo de inmunoensayos se conocen con el nombre de enzimoimmunoensayos de adsorción (ELISAs); pueden ser competitivos o no y, generalmente, tienen lugar a partir de la inmovilización de un anticuerpo al pocillo de una placa.
- **Elemental-tagged immunoassays** o aquellos que usan marcas elementales. Normalmente, este tipo de marcas son detectadas mediante la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), pudiendo utilizarse isótopos enriquecidos o heteroátomos que se encuentran formando parte de la estructura de polímeros, NPs metálicas o QDs.
- **Fluoroimmunoensayos**, en los que se emplean moléculas fluorescentes como marcas.
- **Medida indirecta del inmunocomplejo**, una vez que se haya tenido lugar el reconocimiento específico entre antígeno y anticuerpo, una molécula con la capacidad de generar señal se unirá al complejo formado.

Finalmente, cabe mencionar los inmunoensayos realizados en tejidos biológicos y que constituyen el área de la inmunohistoquímica (IHC). En este caso, se emplean anticuerpos marcados que reconocen específicamente a un antígeno presente en las secciones de tejido analizado. La IHC ha permitido conocer la distribución espacial de las biomoléculas y componentes presentes en los sistemas biológicos, superando así las prestaciones de la histología e histoquímica tradicionales, a partir de las cuales se obtiene fundamentalmente información cualitativa y de especificidad limitada. De este modo, se puede adquirir información crucial para una mayor comprensión acerca de los mecanismos biológicos y su relación con la aparición de enfermedades<sup>88</sup>.

En los protocolos inmunohistoquímicos existen ciertas etapas críticas. A continuación, se describen las más importantes<sup>89,90</sup> :

- **Fijación del tejido** para su conservación y evitar la degradación de proteínas, ARN y ADN o la activación de enzimas y la autólisis. Generalmente, los tejidos son fijados en una disolución al 10 % de formaldehído. A continuación, los tejidos son embebidos en parafina para preservar su estructura y poder ser almacenados. Es importante mencionar que se requiere de un protocolo de deparafinación previo al análisis del tejido para facilitar el reconocimiento de ADN, ARN y proteínas.
- **Corte y almacenamiento.** Se recomienda que las secciones de tejidos tengan en torno a 4 – 5  $\mu\text{m}$  de espesor, no obstante, este espesor puede ser variable dependiendo del objetivo del estudio. Respecto a su almacenamiento, este resulta crítico para preservar las proteínas presentes y demás biomoléculas.
- **Recuperación antigénica (o epítipo),** ya que los sitios de unión al antígeno podrían quedar enmascarados y no ser reconocidos por el anticuerpo. Este enmascaramiento se puede producir por ejemplo durante la etapa de fijación como consecuencia del entrecruzamiento entre grupos amino de moléculas adyacentes y de la formación de puente de metileno. Este proceso no es necesario para secciones de tejido que hayan sido almacenadas a baja temperatura.
- **Bloqueo de proteínas,** para evitar obtener señal de fondo por tinción. Estas señales no deseadas provienen de uniones inespecíficas al anticuerpo. Un agente bloqueante ideal puede ser suero de la especie de la que procede el anticuerpo secundario o albúmina de suero bovino, entre otras.
- **Permeabilizar membranas celulares,** para favorecer la entrada de los anticuerpos hacia el interior de células y orgánulos. Se pueden emplear surfactantes no iónicos como el Tritón X-100.

### 3. Nanoclústeres metálicos

#### 3.1. Nanomateriales

La nanociencia y nanotecnología constituyen un área relativamente nueva de investigación de los materiales. Esta área se basa en el estudio y aplicación de los fenómenos que tienen lugar a nivel atómico y molecular. Fue Richard Feynman, un físico teórico estadounidense, quien, en 1959, impartió la conferencia *“There’s a plenty room at the bottom”* en la Universidad de Caltech (California) acerca de esta nueva área de investigación. Según Feynman, a nivel atómico existía una ciencia aún por explorar y que supondría el inicio de un amplio campo de investigación científico<sup>91</sup>. Su interés y potencial radica en que a escala nanométrica (comprendida aproximadamente entre 1 a 100 nm) se obedecen leyes físicas distintas a las del nivel macroscópico, por tanto, posee nuevas fuerzas y nuevos efectos. La Figura 8 representa los límites entre los que se encuentra comprendida la nanoescala con respecto al tamaño de otras especies.

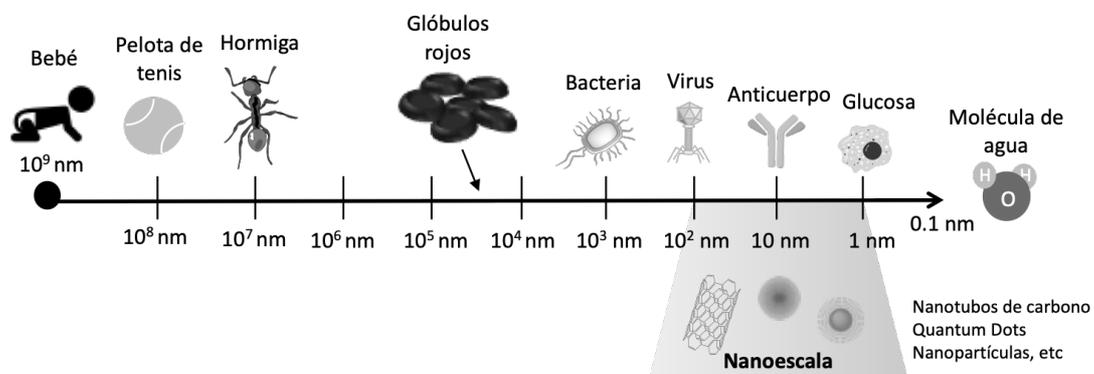


Figura 8. Representación de los límites en los que se encuentra comprendida la nanoescala con respecto al tamaño de otras especies.

Un **nanomaterial** puede definirse como *“aquella material con cualquier dimensión externa dentro de la nanoescala o con estructura interna o estructura superficial en la nanoescala”*<sup>92</sup>. Esta definición utiliza únicamente el criterio del tamaño de los materiales y, desde el punto de vista de otros parámetros (solubilidad, distribución del tamaño, toxicidad) que pueden variar entre distintos nanomateriales, puede resultar incompleta.

Existen una gran variedad de definiciones de nanomaterial reguladas o recomendadas más detalladas<sup>93</sup>. Una de las más completas es la establecida por la Comisión Europea en 2011: *“Nanomaterial se refiere a un material natural, accidental o fabricado que contiene partículas, sueltas o como un agregado o un aglomerado y dónde el 50 % o más de las partículas en la distribución de tamaño, presenta una o más dimensiones externas en el rango de tamaño entre 1 nm a 100 nm. Los fullerenos, las escamas de grafeno y los nanotubos de carbono de pared simple con una o más dimensiones externas inferiores a 1 nm deben ser considerados nanomateriales”*<sup>94</sup>.

### **3.2. Concepto de nanoclúster metálico y propiedades**

Con el objeto de desarrollar metodologías analíticas rápidas, sensibles y específicas en las distintas áreas de investigación científica, cabe destacar el interés alcanzado por los nanoclústeres metálicos (MNCs). Los MNCs están constituidos desde unos pocos a cientos de átomos metálicos y se originan cuando una partícula metálica sufre la reducción de sus dimensiones de tal forma que sus propiedades se ven modificadas debido al confinamiento cuántico.

A nivel macroscópico, los metales están estructurados en dos bandas, la banda de conducción y la banda de valencia, entre las que no existen espacios y por tanto se da un movimiento libre de electrones entre ambas (Figura 9). Este hecho hace que los materiales metálicos sean buenos reflectores ópticos, además de presentar gran conductividad eléctrica<sup>95,96,97</sup>. En lo que respecta a las nanopartículas (NPs) metálicas, su tamaño está comprendido entre 0,1 y 100 nm y presentan una estructura de bandas semicontinua; por lo que, los electrones comienzan a tener limitado el movimiento y al oscilar interaccionan con la luz dando lugar a fenómenos mayoritariamente superficiales (Resonancia de Plasmón Superficial, SPR). Por esta razón, las NPs presentan una fuerte banda de absorción en la región visible y no emiten fluorescencia. Al continuar disminuyendo las dimensiones de las nanopartículas (< 3 nm) se obtienen las NPs metálicas de carácter molecular o comúnmente denominados NCs metálicos. En este caso, la banda de conducción se rompe dando lugar a niveles discretos de energía,

pudiendo producirse entonces transiciones electrónicas entre ellos y fenómenos como la absorción y emisión de luz<sup>98,99</sup>.

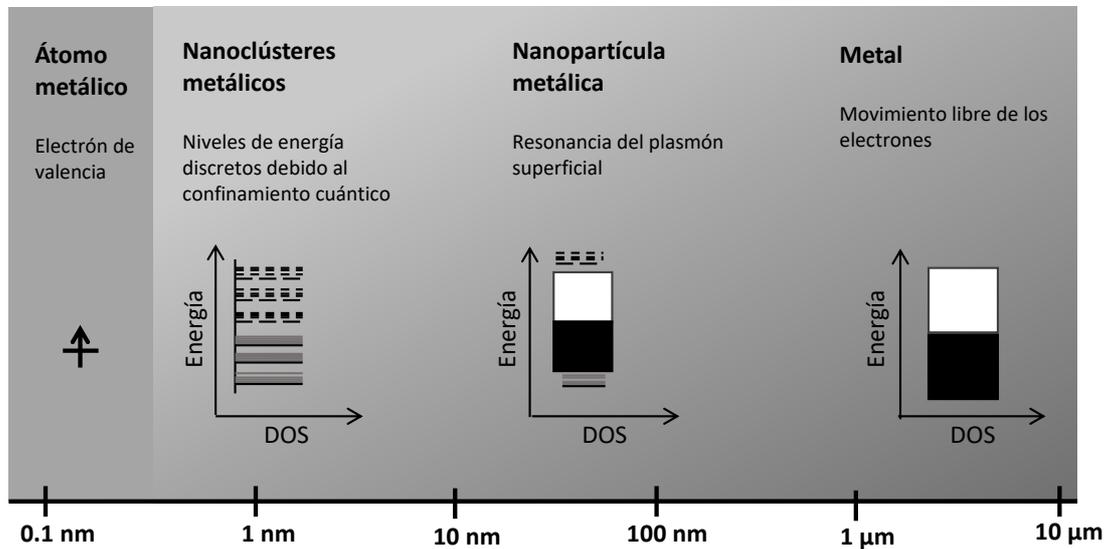


Figura 9. Evolución de la banda de energía al reducir las dimensiones del metal macroscópico hasta llegar a su ruptura en niveles discretos de energía por la formación de NCs. Energía frente a densidad de los estados (DOS, "density of states"). Imagen modificada de la referencia 100.

Los MNCs presentan propiedades ópticas y electrónicas tales como fluorescencia modulable, magnetismo, largos desplazamientos de Stokes o quiralidad molecular. Además, generalmente presentan estabilidad de emisión de fluorescencia (aunque algunos, como los AgNCs, pueden ver limitada esa estabilidad al ser expuestos a la luz), son biocompatibles y su síntesis suele ser sencilla. Por todo ello, los MNCs han supuesto una gran contribución en la detección de biomoléculas e iones metálicos, *imaging* en células y tejidos o actividades catalíticas<sup>101,102</sup>.

Por el contrario, una de las desventajas que presentan los MNCs viene dada por los generalmente bajos porcentajes de rendimiento cuántico (*quantum yield*, QY) que presentan en comparación con los puntos cuánticos (*quantum dots*, QDs) o los fluoróforos orgánicos. No se conoce con certeza el origen de las propiedades fotoluminiscentes de los MNCs, por lo que un mayor conocimiento de ello podría ayudar a mejorar este parámetro, así como su estabilidad.

La fluorescencia exhibida por los NCs tiene su origen según dos aspectos principales: (1) los efectos de confinamiento cuántico dentro del núcleo metálico y (2) la transferencia de carga entre el núcleo metálico y el ligando que forma parte de la estructura del NC o por la interacción metal-metal. Esto supone hablar de fluorescencia procedente del núcleo metálico, por el efecto intrínseco cuántico o bien de fluorescencia debida a la superficie de la partícula, en cuyo caso las propiedades están gobernadas por la interacción metal-ligando<sup>103,104</sup>. Sin embargo, a día de hoy, no hay un mecanismo específico que justifique las propiedades fluorescentes de los NCs. No obstante, sí que se ha podido establecer la clara influencia de determinados factores como el tipo de ligando utilizado, el tamaño de la estructura o la metodología de síntesis utilizada en la emisión de los NCs. Así, los ligandos que recubren el núcleo metálico desempeñan un papel fundamental en su protección. Estos les proporcionan la estabilidad necesaria para evitar interacciones que podrían derivar en la formación de agregados y/o pérdida de sus propiedades fotoluminiscentes. La influencia del ligando en las propiedades ópticas del nanoclúster ha sido investigado en profundidad. A modo de ejemplo, sintetizando NCs de oro (AuNCs) o de plata (AgNCs) con distintos tipos los ligandos se puede tener emisiones de luz a distintas longitudes de onda (Figura 10).

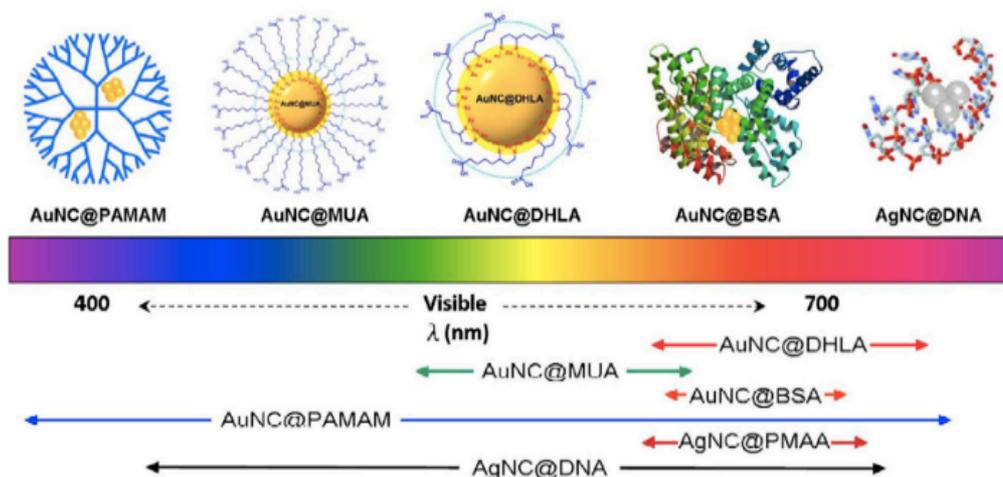


Figura 10. Rango de emisión relacionado con el tipo de ligando protector seleccionado para formar parte de la estructura de AuNCs y AgNCs. Figura modificada de la referencia *¡Error! Marcador no definido.*

Adicionalmente y dado que el núcleo metálico del NC está considerado como otra fuente de origen de la fluorescencia, resulta bastante evidente la relación que cabe

esperar entre el tamaño de los NCs y sus propiedades ópticas. Así, por ejemplo, variando el tamaño de los NCs de oro sintetizados (número de átomos de oro presentes en el núcleo) utilizando un mismo ligando de peso molecular conocido, como el dendrímero poli(aminoamida) (PAMAM), se pudo observar como al ir aumentando el tamaño del nanoclúster se producía un desplazamiento mayor de la longitud de onda de emisión desde la región UV hasta el infrarrojo cercano, es decir, desde 385 a 866 nm (Figura 11).

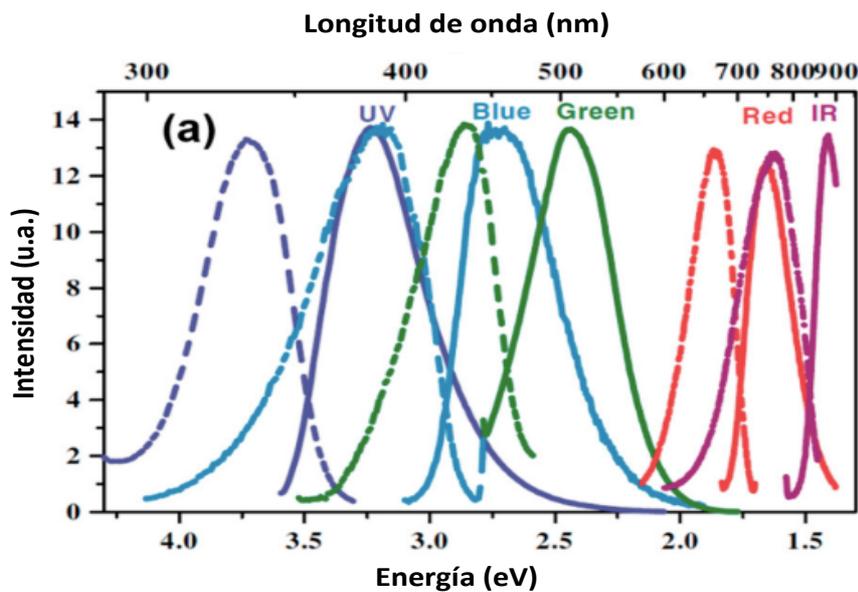


Figura 11. Representación de los espectros de emisión (líneas coloreadas continuas) y de excitación (líneas coloreadas punteadas) correspondientes a los distintos tamaños de AuNCs sintetizados. Al ir incrementándose el número de átomos presentes en el NCs se produce un desplazamiento hacia una mayor longitud de onda. Figura modificada de la referencia *¡Error! Marcador no definido.*

Las conclusiones que se pueden extraer en base a los resultados de este experimento (Figura 11) pueden no ser aplicables a todo tipo de NCs metálicos. Por ejemplo, al sintetizar dos tipos de AgNCs con un único átomo de diferencia entre ambos y con el mismo ligando, ácido mercaptosuccínico ( $H_2MSA$ ), las longitudes de onda de emisión de ambos distaban considerablemente. Aunque en ambos ejemplos (AgNCs y AuNCs) se observa un desplazamiento de la longitud de onda con el tamaño, en el caso de los AuNCs el desplazamiento de unas longitudes de onda a otras se producía con una diferencia más notable en el tamaño<sup>105</sup>.

Respecto a la influencia de otros factores que pueden condicionar las propiedades de los NCs se han realizado estudios para evaluar los cambios observados en la intensidad de fluorescencia con el pH de trabajo. Por un parte, el trabajo realizado por Cao *et al.*<sup>106</sup> mostró que los cambios en el pH no variaban la posición del máximo de emisión de AuNCs ligados a BSA para una longitud de onda de excitación dada, siempre que se trabajase a pH por debajo de 9. Por encima de este valor de pH sí observaban un desplazamiento de ese máximo. Un estudio posterior<sup>107</sup>, que empleó AgNCs con hebras de ADN en su estructura, reveló la tendencia una tendencia creciente en la intensidad de emisión con el pH del medio. A valores muy ácidos de pH (3-5) se producía una pérdida total de fluorescencia y esta aumentaba con el pH hasta alcanzar valores de 11-13, momento a partir del cual la intensidad de emisión comenzaba a verse deteriorada. En ambos ejemplos, las variaciones de las propiedades ópticas observadas pueden ser justificadas atendiendo a los cambios conformacionales que experimentan los ligandos que componen la estructura de los NCs. Al modificarse la conformación de los ligandos, puede perderse la protección del núcleo metálico y por tanto lugar a la agregación de los NCs con la consecuente pérdida de emisión.

Hay que tener en consideración también el medio en el que se encuentran los NCs como consecuencia del efecto solvatocrómico del disolvente. Para las nanopartículas metálicas se tiene un amplio conocimiento de este efecto. Con respecto a los NCs se cree que podrían presentar variaciones en sus propiedades ópticas debido a la alteración en el entorno químico en el que se encuentren suspendidos, lo que daría lugar a una redistribución de electrones en su superficie<sup>108</sup>. Por último, factores como el estado de oxidación o la composición metálica también pueden condicionar las propiedades de los MNCs. En el caso de los AuNCs, el incremento de la electropositividad de su núcleo puede contribuir favorablemente a la emisión fluorescente.

### **3.3. Síntesis de nanoclústeres metálicos**

Se puede distinguir entre dos tipos de métodos de síntesis de nanoclústeres metálicos. Aquellos basados en el método "*bottom-up*", que consiste en la reducción de iones metálicos en presencia de un ligando o molde y el método de "*chemical*

*etching*”, basado en la estrategia “*top-down*”, donde se utiliza un exceso de ligando y se van eliminando átomos de la superficie de una nanopartícula metálica hasta reducir sus dimensiones al tamaño de un nanoclúster<sup>Error! Marcador no definido.,109</sup>.

Existen diversas vías en lo que respecta a la reducción de los iones metálicos como i) el método de fotoreducción donde la formación de los NCs se produce por irradiación con luz UV en ausencia de agentes reductores<sup>110</sup>; ii) la síntesis asistida por microondas, lo que da lugar a la formación de núcleos de forma rápida y homogénea<sup>111</sup>; iii) la síntesis sonoquímica, donde la nucleación se produce por irradiación de un líquido<sup>112</sup> o iv) el método de reducción química, el más común de todos los mencionados. En este caso es necesario la utilización de un agente<sup>113,114</sup>. En todos estos casos, control de la cinética de reacciones clave en el proceso de síntesis de los NCs. El control de parámetros tales como la temperatura, la fuerza del agente reductor empleado, los disolventes utilizados o el pH del medio contribuyen a la generación de MNCs de tamaño definido y con menor polidispersidad<sup>115</sup>.

El método de síntesis basados en “*chemical etching*”, también denominado *fresado químico* de NPs, es menos utilizado que las estrategias “*bottom-up*”, ya que generalmente se obtienen menores rendimientos de la síntesis y pueden llegar a requerir tiempos más prolongados. No obstante, mediante la optimización de las condiciones de la síntesis (temperatura, tiempo y ratio entre precursor metálico y agente de *etching*) es posible mejorar la eficiencia y acortar el tiempo. Por último, este procedimiento puede ser aplicado como complemento de síntesis de tipo “*bottom-up*”, lo que permite obtener NCs con buena monodispersidad a partir de NPs de mayor tamaño<sup>Error! Marcador no definido.</sup>. Independientemente del método de síntesis seleccionado, el objetivo común es obtener NCs metálicos de gran calidad, estabilidad, con altos rendimientos cuánticos, y que sean uniformes en tamaño y forma.

Por otra parte, resulta crucial el papel que desempeñan los ligandos utilizados en la obtención de NCs metálicos. Así, polímeros como poli(etilenaamina) (PEI)<sup>116</sup>, oligonucleótidos de ADN<sup>Error! Marcador no definido.,117,118</sup>, proteínas<sup>Error! Marcador no definido.,119,120</sup> o estructuras de dendrímeros como PAMAM<sup>121</sup> que actúan a modo de molde, confieren a los NCs metálicos un tamaño controlado y uniforme y una morfología definida.

Además de la biocompatibilidad que estos ligandos aportan a los NCs, también les dota de un mayor diámetro hidrodinámico lo que limita su aplicación para el marcaje de pequeñas moléculas y biomoléculas. Como alternativa, se pueden emplear pequeñas moléculas con grupos tioles como ligandos (por ejemplo, glutatión<sup>122</sup>, ácido dihidrolipoico<sup>123</sup>, ácido lipoico<sup>124</sup>). Comparativamente, las estructuras de este tipo presentan diámetros hidrodinámicos de menor tamaño, además de ser estructuras de gran estabilidad debido a la fuerte unión metal-ligando que se establece, como por ejemplo en los AuNCs con los enlaces Au-S<sup>125,126</sup>. Otro factor que es importante tener en cuenta durante la síntesis de los NCs es la proporción de ligando/precursor del metal. Si la cantidad del ligando es mayor con respecto a la del metal se obtienen preferentemente NCs, si al contrario hay una mayor proporción del metal, se producen nanopartículas de mayor tamaño<sup>127</sup>.

Ya sea durante el proceso de síntesis o post-síntesis, es posible funcionalizar los nanoclústeres, permitiendo en este último caso la generación de MNCs con mayor precisión atómica, es decir, se conocería con alta precisión el número de átomos de los que están constituidos. Estos MNCs podrían utilizarse, por ejemplo, para estudios básicos como por ejemplo adquirir un mayor conocimiento de los mecanismos que puedan tener lugar a nivel celular con mayor exactitud, mediante su aplicación en *bioimaging*. Dentro de estas estrategias *post-sintéticas*, se encuentra la denominada metodología de intercambio de ligando, en la que un nanoclúster previamente sintetizado y caracterizado se utiliza como molde en la generación de otro nanoclúster nuevo. Ese nuevo NCs tiene lugar cuando se añade otro tipo de ligando al medio y que se va a unir al modelo. Similar al método anterior, está la vía de intercambio de metal donde también se parte de un NC ya caracterizado y en este caso, la sal del otro metal que se quiera incluir en el molde. Esta metodología es bastante común en la preparación de NC con aleaciones en su núcleo<sup>127</sup>.

Hasta la fecha han sido sintetizados nanoclústeres de metales como Au<sup>128,129</sup>, Cu<sup>130,131</sup>, Ag<sup>132</sup>, Pd<sup>133</sup> o Pt<sup>134</sup>. El hecho de que los más popularmente sintetizados sean los de Au y Ag, se debe al conocimiento más profundo que se tiene de

sus métodos de síntesis, además de la alta estabilidad exhibida por los AuNCs y la elevada intensidad fluorescente emitida por los AgNCs, aspectos que le ha hecho muy atractivos con objetivos y aplicaciones muy variadas.

### **3.4. Caracterización y bioconjugación**

Una vez que los nanoclústeres han sido sintetizados, normalmente se eliminan los posibles restos de reactivos del medio donde se encuentran mediante protocolos de purificación tales como diálisis, centrifugación o ultracentrifugación. Asimismo, también pueden utilizarse técnicas de separación (cromatografía o fraccionamiento de campo de flujo, FFF) para aislar los NCs monodispersos de los polidispersos.

Finalmente, los MNCs pueden ser caracterizados con el objetivo de adquirir información acerca de la forma, promedio o distribución de tamaños, estructura cristalina, composición química, solubilidad, valorar la presencia de agregados, número de átomos por NC, entre otros aspectos. Para ello, se puede hacer uso de técnicas como la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), técnicas espectroscópicas, difracción de rayos X, dispersión dinámica de luz (DLS), espectrometría de masas (ICP-MS o electrospray-MS), así como la novedosa técnica de *single particle* (SP)-ICP-MS la cual va a proporcionar información acerca del tamaño y la concentración de las nanopartículas<sup>135</sup>.

Adicionalmente, los NCs pueden ser funcionalizados con biomoléculas para posteriormente ser utilizados como marcas de reconocimiento. Existen diversas formas de llevar a cabo dicha funcionalización, siendo una de las más simples a través de enlaces no covalentes; estableciéndose una interacción electrostática a través de interacciones hidrofóbicas o por afinidad específica, como son las interacciones de tipo avidina – biotina o estreptavidina – biotina. Las principales estrategias para la bioconjugación incluyen la unión directa de una biomolécula tiolada a la superficie del NC o a través de la formación de un enlace covalente amida entre un grupo amino o carboxílico presente en la superficie del NC, y una molécula. Frecuentemente se usa como reactivo de unión el 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclicorada (EDC). El intermedio de o-

acilisourea formado durante el transcurso de la reacción puede ser estabilizado a través de la generación de un éster de succinimida, el cual se obtiene tras añadir NHS (N-hydroxysuccinimida)<sup>136</sup>. Otra alternativa se basa en la química de maleimida en las que se forma un enlace covalente por conjugación de aminas primarias a grupos tiol. También, es posible llevar a cabo la encapsulación de NCs o hacer *Click Chemistry*, que se caracteriza por unir pequeñas estructuras entre sí para la síntesis de sustancias de manera rápida y fiable.

Es importante que la estrategia elegida para bioconjugar una molécula con el NC sea adecuada. En el caso de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, la unión se produce de forma espontánea. No obstante, esta vía de bioconjugación presenta algunas limitaciones relacionados con la orientación aleatoria con la que se produce la unión, la fuerza de enlace dependiente del pH o la posibilidad de que otras moléculas reemplacen a la marca por presentar mayor fuerza de interacción, entre otras. Estos inconvenientes no aplican en el caso de la interacción avidina-biotina y las estrategias basadas en la unión covalente. Sin embargo, presentan otras limitaciones como una pobre eficiencia en la síntesis del bioconjugado o una distribución heterogénea de la marca, para lo que podría recurrirse a los métodos *Click Chemistry* y así garantizar el control de la orientación<sup>Error! Marcador no definido.</sup>.

### 3.5. Aplicaciones (bio)analíticas

Cuando comenzaron a desarrollarse sensores basados en el uso de marcas fluorescentes para la detección de moléculas o iones metálicos, los fluoróforos orgánicos fueron los primeros en ser utilizados para su detección espectroscópica. Estos eran fácilmente bioconjugables a través de sus grupos funcionales a péptidos o ácidos nucleicos. No obstante, presentaban ciertos inconvenientes como una escasa estabilidad de emisión (*photobleaching*) limitando, por ejemplo, la sensibilidad de los análisis realizados a tiempos prolongados en células<sup>Error! Marcador no definido.</sup>.

Posteriormente, el desarrollo de nanomateriales, como los QDs, fue desplazando a estas moléculas orgánicas para su utilización en la detección óptica. Estos presentaban

un tamaño pequeño (2 a 10 nm), eran más estables en su emisión y exhibían un alto rendimiento cuántico. Frente a estas ventajas debe destacarse el hecho de que en la composición del núcleo de los QDs puede haber metales pesados tóxicos (como Cd), lo que limita biocompatibilidad y, por tanto, su uso. Es en este punto, donde los MNCs comenzaron a atraer la atención de diversas áreas de investigación debido a que comparten la característica de presentarse como nanomateriales de tamaño reducido (al igual que los QDs) pero además presentar toda una serie de propiedades ópticas únicas y moldeables ya descritas en esta memoria. Por ello, son múltiples las aplicaciones en las que se han utilizado a lo largo de los años, muchas de ellas englobadas dentro de la biomedicina y la química analítica<sup>iError! Marcador no definido.</sup>.

En lo que respecta a los MNCs, su uso como marcas con posterior detección mediante ICP-MS, ha dado como resultado el análisis y cuantificación de biomoléculas con una mayor sensibilidad que la normalmente alcanzada mediante métodos fluorimétricos. Esto se debe a que, con el aumento del número de átomos metálicos presentes en la marca, la señal en el ICP-MS se ve aumentada (por ejemplo, el promedio de átomos de oro dentro de un AuNC puede estar entorno a  $579^{137}$ ), alcándose con los MNCs valores de sensibilidad excelentes ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>138</sup>.

### 3.5.1. Aplicaciones basadas en medidas de fluorescencia

- **Sensores de iones metálicos y de moléculas pequeñas**

Son numerosos los trabajos de investigación en los que se emplean que NCs de metales como Cu, Ag, Au para la detección de iones metálicos, por ejemplo,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ <sup>139,140,141</sup>. Las metodologías analíticas desarrolladas en estos casos suelen basarse en la medida de la desactivación de emisión fluorescente ("*quenching*"), la cual depende de la interacción entre el ion metálico a detectar y el nanoclúster. A modo de ejemplo, Zhang *et al.*<sup>142</sup> llevó a cabo la determinación de de cromo, en concreto Cr (VI) en muestras medioambientales por los efectos cancerígenos que presenta en el ser humano. Mediante el uso de AgNCs-PEI, se pudo correlacionar y determinar la concentración de Cr (VI) en función de la desactivación fluorescente que este provoca en los NCs, proporcionando una respuesta rápida y con buena sensibilidad (límite de detección de 0.04 nM). Concretamente, la señal fluorescente de los nanoclústeres decaía proporcionalmente con la cantidad de cromo presente en las muestras hasta llegar a concentraciones de 80 mM, momento a partir del cual prácticamente había ausencia de emisión. El origen del mecanismo de esta desactivación se atribuyó a la unión producida entre el cromo y las aminas nitrogenadas de polietilenimina presentes en los extremos que conformaban el AgNC.

Menos frecuentes han sido las investigaciones relativas al *quenching* fluorescente. No obstante, Zhao *et al.*<sup>142</sup> hace referencia a una vía para inhibir esa desactivación fluorescente utilizada como modelo de respuesta mediante el empleo de reacciones paralelas para enmascarar iones. De este modo, se ha descrito un método para determinar  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en disolución basado en la activación y desactivación de emisión de los AuNCs. Cuando los tres iones están presentes en el medio, se observaba la desactivación rápida de la capacidad de emisión de los NCs. Si los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  son enmascarados con un agente complejante, EDTA y  $\text{NH}_4\text{F}$ , se consiguió restaurar parcialmente la emisión. En cambio, se comprobó que al  $\text{Hg}^{2+}$  no le afectaba la presencia de estos quelatos en el medio, lo que permitía la adquisición de una

respuesta selectiva para este elemento, ya que en las condiciones mencionadas sería el único que sufriría la desactivación fluorescente (Figura 12).

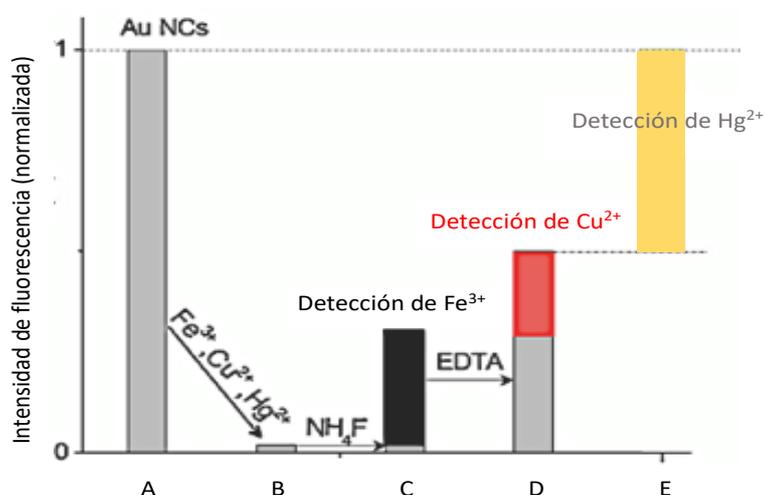


Figura 12. Esquema basado en el mecanismo de encendido-apagado de la fluorescencia de los AuNCs para la detección de Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>. A) Emisión fluorescente inicial de los AuNCs B) Desactivación de la fluorescencia al añadir los tres iones a detectar C) y D) enmascaramiento de Fe<sup>3+</sup> Y Cu<sup>2+</sup> con una recuperación parcial de la emisión E) Cambios producidos en la fluorescencia de los AuNCs debidos a la presencia de Hg<sup>2+</sup>. Figura modificada de la referencia *¡Error! Marcador no definido.*

Mediante el uso de los MNCs, también se ha llevado a cabo la detección de aniones inorgánicos como el sulfuro, subproducto industrial que debido a su naturaleza tóxica puede ser utilizado como indicador de la calidad del agua. Otros aniones que por sus efectos nocivos han sido comúnmente objeto de estudio son el cianuro, el cual, puede conducir a la muerte en cuestión de minutos, incluso a concentraciones bajas debido al afecto depresor que provoca en el sistema nervioso central, y el nitrito, que al interactuar con aminas y proteínas da lugar a N-nitrosaminas que pueden favorecer la aparición de cáncer<sup>143-145</sup>.

Sumando a todas las aplicaciones de los NCs metálicos ya mencionadas, cabe añadir además el poder de detección de biomoléculas pequeñas, las cuales tienen un papel crucial en la regulación del metabolismo celular y en los procesos bioquímicos. Por ejemplo, los nanoclústeres con ADN como ligandos en su estructura han sido comúnmente utilizados para la determinación moléculas pequeñas tales como cisteína (Cys), dopamina o ácido ascórbico, debido a la biocompatibilidad y estabilidad que normalmente presentan. Como ejemplo, mencionar un ensayo llevado a cabo por Wen *et. al.* *¡Error! Marcador no definido.*, en el que se utilizaron dos tipos de hebras diferentes de ADN

para la síntesis de AgNCs y posteriormente desarrollar un método analítico basado en la medida de desactivación de la señal emitida por los AgNCs para detectar específicamente ácido ascórbico, cisteína y dopamina.

- **Sensores para proteínas y ácidos nucleicos**

Los NCs metálicos también han sido empleados como fluoróforos para desarrollar bioensayos en el reconocimiento específico de proteínas<sup>iError! Marcador no definido.</sup> y ácidos nucleicos<sup>146,147</sup>. Por ejemplo, se ha llevado a cabo la determinación la proteína IgG empleando AuNCs a partir de la activación de su emisión fluorescente, con un límite de detección de  $1,5 \text{ pg.mL}^{-1}$ <sup>148</sup>. También se han utilizado este tipo de NCs para la detección altamente sensible de hemoglobina: Yang *et al.*<sup>149</sup> han desarrollado un sensor para la detección de hemoglobina basado en un mecanismo de desactivación de la fluorescencia de la nanopartícula, es decir, la disminución de señal emitida por parte de la marca metálica es proporcional a la cantidad de hemoglobina presente en la muestra, alcanzándose un límite de detección de 0.36 nM.

- **Bio-imaging fluorescente**

Con el objeto de alcanzar una mayor comprensión de los complejos procesos que ocurren tanto a nivel celular como subcelular, los NCs metálicos también han sido utilizados en el *imaging* de sistemas biológicos (cultivos celulares). Frente a las prestaciones que ofrecen otras técnicas, el *imaging* fluorescente además de permitir llevar a cabo una detección múltiple, destaca por su gran sensibilidad y el bajo coste que supone. Esta técnica está condicionada por las propiedades que presenten las sondas fluorescentes utilizadas para el marcaje celular en cuanto a su biocompatibilidad, especificidad y estabilidad<sup>iError! Marcador no definido.</sup>. La aplicación de los NCs metálicos a sistemas biológicos permite obtener información útil acerca de su eficacia de penetración a través de las membranas celulares y permite observar con claridad su distribución y localización una vez que los MNCs han sido internalizados por las células. Los ensayos basados en la permeabilidad celular resultan necesarios debido a que,

idealmente, las membranas están diseñadas para hacer de barreras protectoras y restringir el paso de moléculas extrañas. En este contexto, Das y colaboradores<sup>*Error! Marcador no definido.*</sup>, emplearon CuNCs-GSH para investigar su localización en tres líneas celulares tumorales. Mediante microscopía confocal fue posible su localización en las membranas nucleares. La posición que adoptaron los nanoclústeres no era aleatoria, sino que se atribuyó al reconocimiento del glutatión (en el MNCs) por parte de proteínas específicas presentes en las membranas del núcleo (Figura 13).

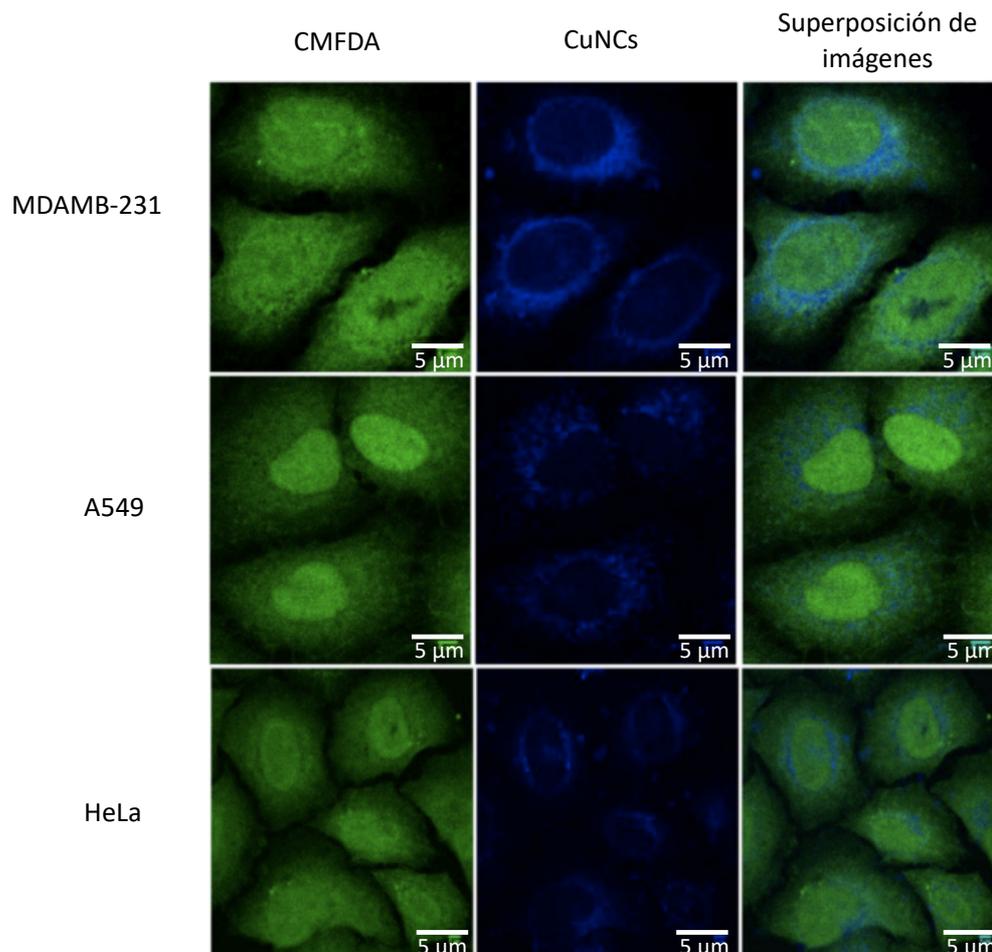


Figura 13. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de la localización a nivel subcelular de los CuNCs en tres líneas celulares distintas (MDAMB-231, A549 y HeLa). El marcaje de las células se presenta en color verde para lo cual se utilizó el fluoróforo CMFDA (diacetato de 5-clorometilfluoresceína). Imagen modificada de la referencia *Error! Marcador no definido.*

Dentro de los estudios llevados a cabo en cultivos celulares, es habitual el uso de nanoclústeres de emisión fluorescente en la región del infrarrojo cercano (NIR). Esto es debido a que este tipo de NCs muestran interferencias mínimas con la autofluorescencia exhibida por las moléculas biológicas presentes en las células. Por ejemplo, en un

estudio realizado en ratones y basado en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) a fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se utilizaron AuNCs-GSH de emisión fluorescente a 740 nm como biomarcas. Para agilizar la entrada al cerebro de los AuNCs, se bioconjugaron a L-dopa, una molécula para la que existen receptores específicos en el cerebro. Los AuNCs fueron inyectados en los ratones vivos para observar a tiempo real la eficacia de penetración de la marca fluorescente en el cerebro, lo que se conoce como *imaging in vivo*. Finalmente, se comprobó como la señal de emisión se encontraba focalizada concretamente en la parte cerebral del animal. Este hecho fue atribuido a la presencia de receptores específicos para L-dopa a ambos lados de las membranas cerebrales del animal. En base a toda la información suministrada por este estudio, se muestra claramente el potencial que poseen los de los NCs con grupos funcionales como marcas fluorescentes, así como su potencial para el diagnóstico temprano de enfermedades<sup>150</sup>.

Por último, otro aspecto a reseñar es la posible toxicidad que pueden presentar los NCs metálicos de cara a su viabilidad a nivel celular y subcelular, de hecho, es habitual el uso de las nanopartículas de plata como eficaces agentes antibacterianos<sup>151,152</sup>. Esto, unido al hecho del menor tamaño que poseen se cree que los AgNCs podrían llegar a tener incluso mayor capacidad antibacteriana que las nanopartículas. En este sentido, Shitomi *et al.*<sup>153</sup> evaluaron el comportamiento de los AgNCs en células de fibroblastos, observando niveles mínimos de toxicidad. No obstante, en una investigación llevada a cabo a nivel subcelular se puso de manifiesto cómo los AgNCs contribuyen a la disfunción mitocondrial, lo que podría estar relacionada con la aparición de enfermedades como Alzheimer o Parkinson<sup>154</sup>.

Además de las aplicaciones de los NCs mencionadas hasta ahora también han comenzado a ser utilizados en el estudio de biomoléculas y elementos empleando técnicas basadas en espectrometría de masas. Estas técnicas y sus aplicaciones correspondientes se abordan a continuación.

## 4. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica altamente sensible, precisa y versátil que ha sido utilizada en infinidad de áreas científicas, tales como geología, medicina, farmacia, química o física. Permite obtener información acerca de las masas de átomos y moléculas presentes en una muestra a partir de la conversión de estos en iones cargados. De este modo, el análisis mediante espectrometría de masas comienza con una etapa de ionización de los analitos contenidos en la muestra (moléculas o átomos). Posteriormente, los iones generados son separados en función de la relación masa-carga y detectados, obteniéndose un espectro de masas característico<sup>155</sup>.

Los equipos de MS generalmente están compuestos por un sistema de introducción, una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. En función del tipo de iones (moleculares o atómicos) que se generen en la fuente de ionización, así como el tipo de información obtenida, se puede distinguir entre MS elemental o molecular.

### 4.1. Instrumentación para ICP-MS

- **Fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo**

Una de las fuentes de ionización empleadas en MS elemental es el plasma de acoplamiento inductivo (ICP). Es un tipo de fuente de ionización fuerte, ya que tiene la energía suficiente como para atomizar e ionizar. Se compone de una antorcha, que es una pieza de cuarzo con tres tubos concéntricos a través de los que circulan distintos flujos de Ar a presión atmosférica. Entre los tubos exterior e intermedio circula una corriente de Ar de  $\sim 15 \text{ L min}^{-1}$  (gas plasmógeno), que da lugar a la generación del plasma y se encarga de refrigerar la antorcha. Por el tubo intermedio pasa un gas auxiliar (flujo de  $\sim 1 \text{ L min}^{-1}$ ) y permite modificar la posición del plasma en torno a los conos de

muestreo. Finalmente, la muestra es transportada en forma de aerosol mediante un tercer flujo de gas (gas nebulizador/portador) de  $\sim 1 \text{ L min}^{-1}$ . Una bobina de inducción de Cu rodea la cabeza de la antorcha y se encuentra conectada a un generador de radiofrecuencias que aplica una corriente oscilante entre 750-1500 W/27-40 MHz, creando campos eléctricos y magnéticos<sup>156</sup>.

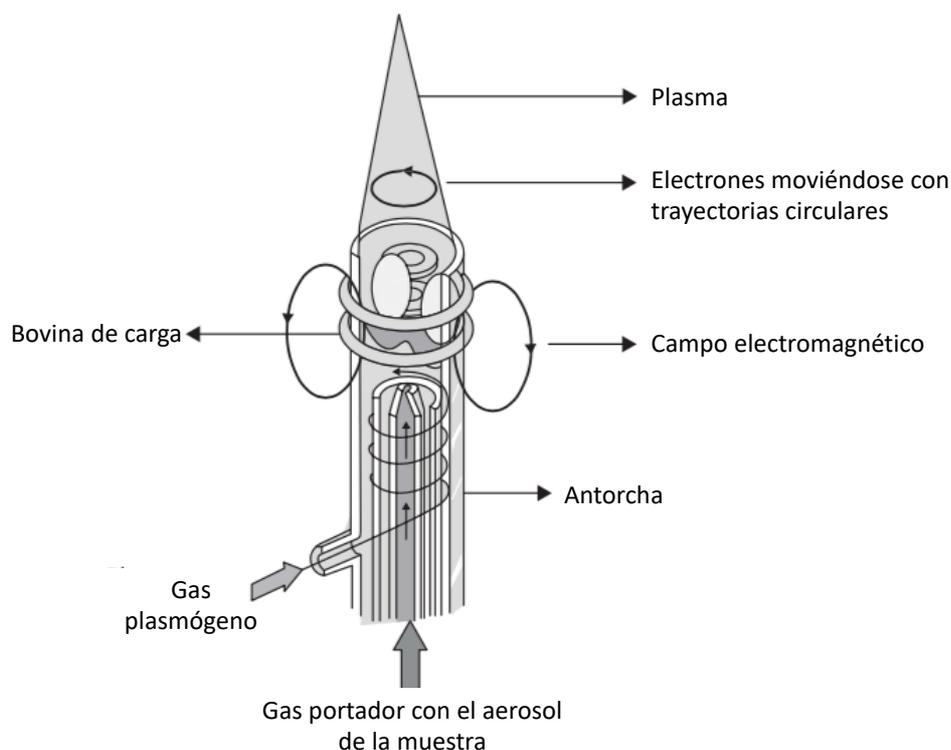


Figura 14. Representación esquemática de la antorcha de un ICP. Figura modificada de la referencia 157

#### ▪ Sistema de introducción

Para el análisis de muestras líquidas mediante ICP-MS, la muestra o parte de ella es introducida en forma de aerosol para ser posteriormente ionizado en el plasma. Para la generación de dicho aerosol se emplea un nebulizador, encargado de producir un aerosol fino de la muestra y una cámara de nebulización, cuya función es limitar la entrada de gotas pesadas hacia el plasma. Los nebulizadores convencionales operan a flujos entre  $0,5 - 2 \text{ mL min}^{-1}$ . Por lo tanto, para el análisis de muestras de pequeño volumen, otras vías de introducción de la muestra pueden ser consideradas, como el uso de micronebulizadores de flujo por debajo de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , que permiten una mayor eficiencia en el transporte del analito con respecto a los convencionales o los sistemas

de consumo total de muestra, que permiten alcanzar un porcentaje cercano al 100 % en la eficiencia de transporte de muestra<sup>158,159</sup>. Por otra parte, la ablación láser-ICP-MS, que se desarrollará en profundidad en apartados posteriores, también se presenta como una técnica alternativa a la nebulización convencional en la que se parte de la muestra en estado sólido.

- **Interfase**

La función de la interfase es el transporte eficiente de los iones generados en el plasma, que se encuentran a presión atmosférica, hasta el analizador de masas, que está en condiciones de alto vacío. La interfase, constituida por los conos de extracción y muestreo (1-2 torr), se encarga de extraer una porción representativa del haz de iones. Tras la generación de los iones en el plasma, estos atraviesan el primer cono, denominado de muestreo o *sampler*, con un orificio de diámetro interno entre 0,8 -1,2 mm. Tras el *sampler*, la presión disminuye hasta 1 mbar por la acción de una bomba rotatoria de alta capacidad, con la consecuente expansión adiabática que conserva la composición iónica del plasma y enfría el gas. Posteriormente, el haz de iones se transmite a través de un segundo cono, denominado separador o *skimmer*, que presenta un orificio más reducido (diámetro interno 0,4-0,8 mm). El *skimmer* da paso a la zona de alto vacío del MS, donde las condiciones de alto vacío se mantienen por la acción de bombas turbomoleculares. El material de estos conos es normalmente Ni, pero también pueden presentar en su composición Pt.<sup>160</sup>

- **Lentes ópticas**

Entre el *skimmer* y el analizador de masas se sitúan las lentes ópticas, cuya función es extraer y enfocar los iones, así como desechar las partículas indeseadas producidas en el plasma (especies neutras y fotones).

- **Analizador de masas**

En el analizador de masas tiene lugar la separación de los iones en base a su la relación masa-carga ( $m/z$ ). Los distintos analizadores de masas disponibles se diferencian en función de una serie de factores como son la exactitud, la precisión, la sensibilidad, la velocidad de barrido, el rango de masa o la resolución de masas (habilidad para separar dos iones que disponen de  $m/z$  próximas):

- **Cuadrupolos**, instalados en el 90 % de los ICP-MS comerciales. Constan de cuatro barras metálicas cilíndricas o hiperbólicas de la misma longitud y diámetro (ver Figura 15). Estas barras son de acero inoxidable o molibdeno y en ocasiones pueden tener un recubrimiento de cerámica anticorrosión. La disposición que mantienen entre ellas es paralela y se encuentran colocadas de forma equidistante a un eje central imaginario. Cada pareja de barras opuestas constituye dos pares de electrodos estando conectadas entre sí. Un campo de corriente continua (DC) y otro de corriente alterna (CA) de radiofrecuencia (RF) se aplican sobre cada par de barras. Así, para una combinación dada de CA/CC solo los iones con una  $m/z$  específica tendrán una trayectoria estable a través de las barras del cuadrupolo, actuando por tanto como un filtro de masas. El resto de los iones se desvían, colisionando con la superficie del cuadrupolo al perder su trayectoria. El poder de resolución de estos equipos es limitado (300 – 400), siendo un analizador de tipo secuencial<sup>161</sup>.

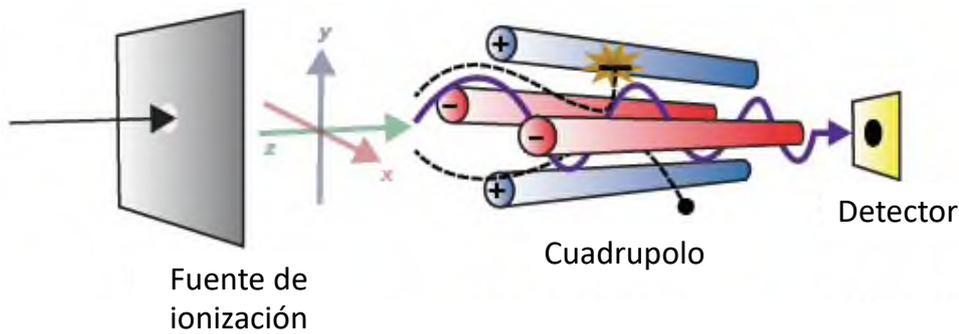


Figura 15. Representación de un analizador de masas de tipo cuadrupolo. Figura adaptada de la referencia 162

- **Sector magnético de doble enfoque**, alcanza un poder de resolución de hasta 10000. Esta variedad de analizadores de masas puede presentar dos clases de configuraciones según sean de geometría de Nier-Johnson estándar o invertida. En ambos casos, se compone de un campo electromagnético (sector magnético) y otro electrostático (sector electrostático). Así, el sector electrostático se posiciona antes del magnético cuando la configuración es estándar. En cambio, para la configuración invertida, este sector se localizaría después del magnético (Figura 16). Asimismo, a la entrada y salida del analizador de masas se encuentran colocadas unas rendijas que determinan el poder de resolución en función de la modificación de su anchura. De este modo, se pueden distinguir entre tres rangos de resolución baja ( $\sim 300$ ), media ( $\sim 4000$ ) o alta ( $\sim 10000$ )<sup>Error! Marcador no definido.</sup>

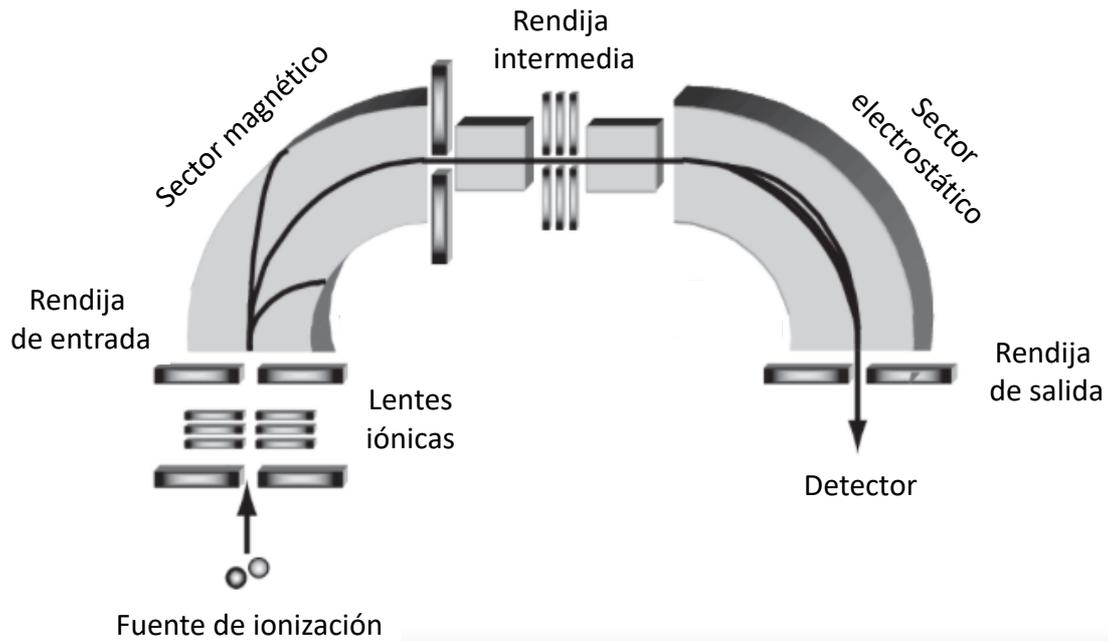


Figura 16. Esquema de las diferentes partes dentro de un analizador de sector magnético de doble enfoque. Figura adaptada de la referencia 163.

Debido al campo magnético, se produce la focalización de los iones en la rendija de entrada, mientras que el campo electrostático focaliza los iones hacia la rendija de salida, donde se encuentra situado el detector. En base a la resolución escogida, los iones con una determinada  $m/z$  atravesarán la rendija de salida.

Cabe mencionar que la configuración de tipo invertida es principalmente aquella que se utiliza para detecciones simples. De esta forma, es posible analizar elementos traza con buena resolución y sensibilidad. En cambio, cuando se pretende llevar a cabo la medida de relaciones isotópicas con alta precisión, la configuración más adecuada en ese caso es la directa. Este tipo de configuración está presente en los instrumentos ICP-MS de tipo multicolector (MC-ICP-MS), instrumentos en los que se emplean copas de Faraday para la detección simultánea de los isótopos seleccionados.

- *Analizador de masa tipo tiempo de vuelo (TOF)*. Los iones en este tipo de analizador se separan por su relación  $m/z$  a lo largo del tiempo, de tal forma que los iones llegan al detector a diferentes tiempos. Aunque, en cuanto a sensibilidad, no ofrecen características al mismo nivel que los analizadores

de tipo cuadrupolo o sector magnético, estos están dotados de un intervalo de masas ilimitado y rapidez de adquisición (cuasi-simultáneos). De este modo, suelen ser empleados para una misma muestra en la determinación de un gran número de analitos<sup>164</sup>.

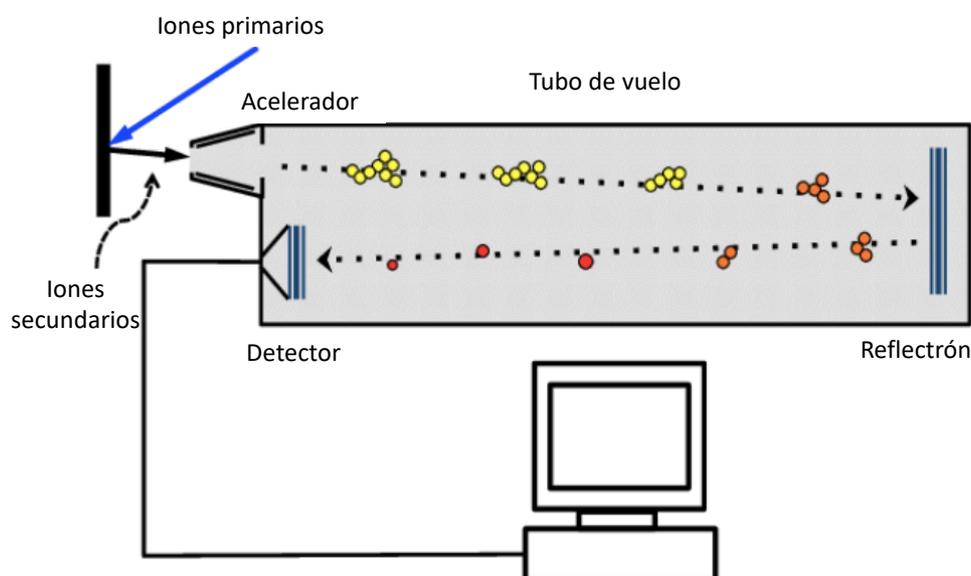


Figura 17. Principales componentes dentro de un analizador de masas de tipo tiempo de vuelo (TOF).  
Figura adaptada de la referencia 165

A pesar de todas las ventajas que presenta como técnica analítica, una de las limitaciones que condicionan el análisis por ICP-MS está vinculada a las interferencias espectrales (isobáricas, iones doblemente cargados o iones poliatómicos) que no pueden ser resueltas a bajas resoluciones. De hecho, para la resolución de interferencias isobáricas (cuando dos isótopos de distintos elementos comparten masa nominal) se requiere de resoluciones muy altas que ningún instrumento puede alcanzar. No obstante, existen ciertas estrategias para minimizar estos efectos, como el uso de un plasma frío, consistente en reducir la potencia de radiofrecuencia aplicada a la vez que se aumenta el flujo de gas para ayudar a disminuir los solapamientos poliatómicos en elementos con baja energía de ionización, como Mg, Fe, Ca o K<sup>Error! Marcador no definido.</sup>

Así mismo, la contribución de especies interferentes puede reducirse mediante el uso de analizadores de masa de sector magnético de alta resolución. No obstante, los

analizadores de masas de tipo cuadrupolo pueden llevar las denominadas celdas de colisión/reacción, siendo posible la reducción de interferencias mediante el uso de un gas adicional que colisiona con las especies interferentes o reacciona con ellas (He, H<sub>2</sub> o O<sub>2</sub>, por ejemplo). Un diseño innovador respecto a mejoras en este último tipo de analizadores es el uso de analizadores de triple cuadrupolo (QQQ), donde se sitúa una celda de colisión entre dos cuadrupolos. De este modo, se filtra la relación m/z de interés (primer cuadrupolo) y los iones pasan a la celda de colisión/reacción donde tiene lugar la reacción del elemento de interés para dar una especie diferente. Finalmente, se selecciona la m/z de interés correspondiente al analito (si lo que reaccionó en la celda es el interferente) o un producto de la reacción del analito (segundo cuadrupolo). Aunque menos frecuente, cabe mencionar que en algunos ICP-MS de tipo multicolector se han incorporado celdas de colisión/reacción para la reducción de interferencias.<sup>166</sup>

- **Detectores**

**Copas de Faraday.** Son como su propio nombre indica copas o cilindros de metal que, a través de una resistencia, se conectan a una toma de tierra. Los iones, una vez en el interior de las copas, aceptan o donan electrones al colisionar con las paredes, de tal forma que quedan neutralizados. Este proceso se manifiesta como una corriente a través de la resistencia, que posteriormente es amplificada y detectada, pudiendo determinarse la abundancia de los iones. Estos detectores se caracterizan por una alta precisión en la respuesta al ser independientes de la velocidad, la masa y la energía de los iones. No obstante, a pesar de que estas características hacen que resulten ideales para llevar a cabo medidas de relaciones isotópicas, también es necesario tener en cuenta que disponen de tiempos de respuesta lentos y baja sensibilidad. Este tipo de detectores son los en los equipos MC-ICP-MS.

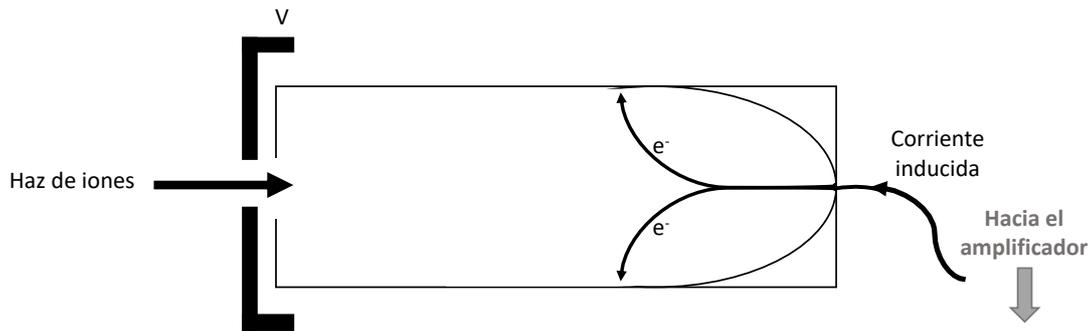


Figura 18. Representación de un detector de copa de Faraday.

**Multiplicador de electrones secundarios (SEM).** Es uno de los detectores de iones más comunes en equipos con analizadores de tipo cuadrupolo y sector magnético de doble enfoque. La detección tiene lugar mediante el uso de una serie de dínodos, que se encuentran a potenciales más altos que aquellos que los preceden. Tal y como puede verse en la Figura 19, al colisionar un catión procedente del plasma contra estos dínodos, los iones desencadenan la emisión en cadena de electrones. Este proceso continúa, creándose una cascada amplificada de electrones a lo largo de los sucesivos dínodos. La amplificación de corriente puede ser de hasta  $10^7$  electrones por cada ion incidente, para aquellos multiplicadores que cuenta con al menos 20 dínodos<sup>167</sup>.

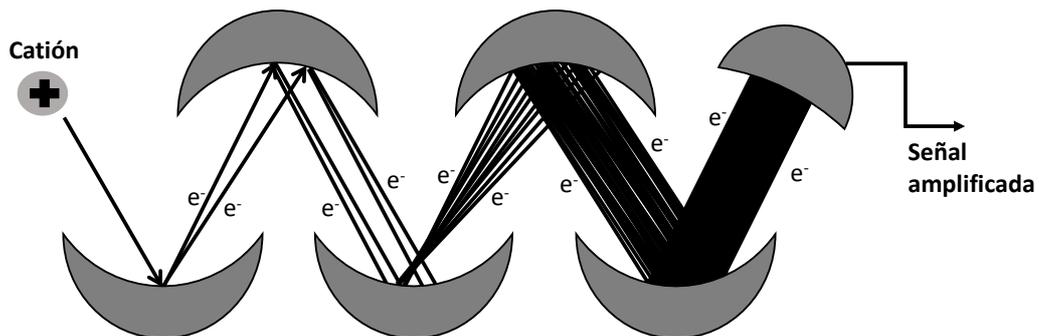


Figura 19. Esquema de un detector multiplicador de electrones secundarios.

## 4.2. Aplicaciones

### 4.2.1. Con nebulización convencional

#### 4.2.1.1. Análisis elemental

Los bajos límites de detección (de ng. g<sup>-1</sup> a pg. g<sup>-1</sup>) que pueden alcanzarse con el análisis por ICP-MS junto con la capacidad de desarrollar análisis multielemental e isotópico y el amplio rango dinámico lineal que presenta, hacen que esta técnica haya sido ampliamente utilizada en multitud de aplicaciones de distintas áreas científicas. A continuación, se mencionan algunas aplicaciones recientes en lo que se refiere al área de la bioanalítica:

- **Caracterización de nanopartículas**

Al acoplar técnicas de separación como fraccionamiento por flujo de campo (FFF) o otra modalidad denominada de campo asimétrico (AF4) a ICP-MS, es posible caracterizar nanoestructuras de distintos tamaños en matrices complejas<sup>168</sup> o también, evaluar poblaciones con diferentes ratios entre una nanopartícula o *quantum dots* (QDs) frente a un anticuerpo tras el proceso de bioconjugación<sup>169</sup>.

- **Cuantificación absoluta de proteínas**

La determinación de concentraciones exactas resulta crítica para el descubrimiento de biomarcadores y su aplicación al seguimiento de patologías. A modo de ejemplo, estudios recientes recogen la capacidad del ICP-MS para la cuantificación absoluta de proteínas a partir de la medida de S<sup>170,171</sup>.

- **Determinación y cuantificación de moléculas en células individuales**

La técnica de análisis por *single-cell* (SC) es una de las estrategias que ha comenzado a recibir gran interés es el estudio de la célula a nivel individual. Acoplada al

ICP-MS, se presenta como una herramienta útil y versátil para analizar el contenido metálico o evaluar la incorporación de fármacos y nanopartículas a nivel celular<sup>172</sup>. En este contexto, Corte et al.<sup>173</sup>, ha llevado a cabo la cuantificación de un receptor de la transferrina (TfR1) que es determinante en la homeostasis de Fe, empleando anticuerpos marcados con un polímero de complejos (MAXPAR) y posterior análisis por sc-ICP-MS. Más recientemente, mediante sc-ICP-MS se ha determinado de forma secuencial dos proteínas citosólicas, MT2A Y apolipoproteína E (APOE), en células individuales de EPR mediante el uso de NCs de oro como biomarcadores. De este modo, se pudo evaluar una posible sobreexpresión de ambas proteínas al someter las células a un tratamiento inflamatorio con interleucina-1 $\alpha$ <sup>174</sup>.

- **Análisis elemental e isotópico en muestras biológicas**

El análisis de fluidos biológicos mediante ICP-MS permite determinar niveles traza y ultratrazas de una gran variedad de elementos con resultados altamente fiables<sup>175</sup>. En el cuerpo humano existe un control homeostático que ha de ser mantenido para el correcto funcionamiento de este. Elementos tales como metales como Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Cu, Zn y Mo son esenciales para el ser humano y sus niveles han de ser adecuados en el organismo<sup>176</sup>. Por tanto, la alteración del equilibrio de estos metales suele asociarse a un metabolismo anormal del organismo, es decir, la aparición y progresión de patologías<sup>177</sup>. En este sentido, y tal y como ya se ha mencionado anteriormente, suero y sangre son fluidos ampliamente utilizados como objeto de estudio<sup>178-180</sup>. Así mismo, y aunque aún en escasa medida, se están empezando a emplear fluidos biológicos menos comunes tales como el fluido lagrimal<sup>Error! Marcador no definido.</sup> o humor acuoso<sup>Error! Marcador no definido.</sup> siendo particularmente interesantes aquellos que pueden ser muestreados sin involucrar instrumentos que rompen la piel o que penetran físicamente en el cuerpo.

#### **4.2.1.2. Medida de relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS**

Dentro de un elemento, su núcleo se encuentra constituido por protones y neutrones. El número de protones, que además coincide con el número de electrones a

su alrededor, condiciona las propiedades de dicho elemento. Los átomos que presentan distinto número de neutrones y que pertenecen al mismo elemento se conocen como isótopos. Las pequeñas diferencias en masa existentes para los isótopos de un mismo elemento hacen que estos pueden dar lugar a diferencias en cuanto a su reactividad lo que se reflejará en pequeñas variaciones de la composición isotópica (‰ o ‰) respecto de la abundancia natural. Estas diferencias pueden ser medidas mediante Espectrometría de masas de ionización térmica (TIMS) y MC-ICP-MS.

Los isótopos pueden ser clasificados como estables o inestables, es decir, radiactivos. De forma general, se considera que en la naturaleza la composición isotópica de los elementos permanece inalterada. De hecho, cuando tuvo lugar la creación del universo, los isótopos formados en ese momento pasaron posteriormente a sufrir un proceso de decaimiento hacia la forma de isótopos estables. A pesar de este hecho, en la naturaleza aún es posible encontrar isótopos radioactivos que no han sufrido este decaimiento en su totalidad. Es así por ejemplo el caso de U o Th, que, tras una serie de desintegraciones de tipo alfa y beta, tiene lugar su decaimiento en isótopos estables de Pb (concretamente  $^{235}\text{U}$ ,  $^{238}\text{U}$  y  $^{232}\text{Th}$  pasan respectivamente a  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  y  $^{208}\text{Pb}$ ). Esto se traduce en que el plomo en la naturaleza no presenta una composición isotópica constante y está condicionado por el origen del material del que procede, lo que resulta muy útil para estudios arqueológicos y medioambientales<sup>181</sup>.

Si bien los cambios de masa entre isótopos de un mismo elemento no implicarían un comportamiento químico diferente, sí que existe una ligera diferencia en la eficacia con la que los isótopos participan en los procesos físicos y bioquímicos. Así, desde el punto de vista cinético, los isótopos de un mismo elemento pueden exhibir distintas velocidades a la hora de participar en procesos o reacciones y, también, pueden apreciarse pequeñas diferencias en el equilibrio alcanzado por cada molécula isotópica en términos termodinámicos. Todos estos fenómenos conllevan a un fraccionamiento isotópico. En concreto, entre dos isótopos de un mismo elemento, aquel que sea más ligero en masa, reaccionará más rápido (efecto cinético) y en cambio, el más pesado mostrará tendencia a permanecer estable (efecto termodinámico). Así, para elementos ligeros como H, C, N, O y S, los fenómenos de fraccionamiento isotópico han sido

ampliamente estudiados ya que los efectos son más notables. En cambio, el fraccionamiento isotópico es menor en el caso de los elementos más pesados y por tanto más difícilmente medible. No obstante, los avances actuales alcanzados en los espectrómetros de masas en términos de precisión han permitido llevar a cabo la medida del fraccionamiento isotópico, incluso para elementos tan pesados como el U<sup>182</sup>.

Si bien originalmente la mayor parte de las aplicaciones para MC-ICP-MS incluyen el campo geológico<sup>183,184</sup>, arqueológico<sup>185</sup> y medioambiental<sup>186</sup>, en la última década son muchos los estudios que se han venido realizando dentro de un contexto clínico o biomédico. Al igual que para el análisis elemental, la mayor parte de ellos se han centrado en el análisis de suero/sangre focalizándose además en la medida de la composición isotópica de tres elementos esenciales fundamentalmente, Fe, Cu y Zn<sup>187-189</sup>. Debido a la baja sensibilidad caracteriza a las copas de Faraday, su extensión a otras muestras biológicas ya sea muestras de las que se dispone de pequeño volumen y/o contiene bajas concentraciones de analito ha sido limitada en sus inicios. Sin embargo, El uso de sistemas de desolvatación de aerosoles, interfases de alta eficiencia, amplificadores para las copas de Faraday con una mayor ganancia ( $10^{13} \Omega$  con respecto a los  $10^{11} \Omega$  convencionales) ha demostrado mejorar la sensibilidad de este instrumento<sup>190, 191</sup> y favorecer la aplicabilidad de esta técnica más allá del suero sanguíneo. No obstante, a pesar del reciente interés por aplicación de esta técnica al análisis de muestras biológicas, cabe mencionar que la técnica de MC-ICP-MS ha sido en su mayoría aplicada en otras áreas como la geología, la arqueología o en ciencias medioambientales.

Adicionalmente, a la medida de las relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS, se ha mencionado ya que el TIMS ha sido ampliamente utilizada, ya que, a pesar de requiere procedimientos preparación de muestra extensos y largos tiempos de medida, ofrece una elevada precisión y exactitud. El MC-ICP-MS es posterior al TIMS, y surgió como una alternativa para elementos con un potencial de ionización por encima de 7,5 eV que no pueden ser analizados mediante TIMS. Además, el MC-ICP-MS destacapor la posibilidad de trabajar en media y alta resolución de masa, la simplicidad y robustez para la introducción de muestra, la obtención de picos con forma de meseta plana que

favorecen la obtención de medidas con alta precisión. Como contrapartida, la precisión es limitada (0,2-0,5 %) debido a efectos de discriminación de masas y que serán tratados a continuación. Por último, cabe mencionar que la ablación láser (ver sección siguiente) ha sido acoplada al MC-ICP-MS para el análisis directo de sólidos<sup>192</sup>.

- **Efectos de discriminación de masas**

Al llevar a cabo el análisis de isótopos por MC-ICP-MS, las relaciones isotópicas medidas pueden desviarse de sus valores teóricos en hasta un 25 % (para Li). La explicación de este fenómeno se desconoce aún, aunque se cree que está relacionada con la expansión supersónica de los iones que atraviesan el cono de muestreo (*sampler cone*) y, también, aquellos efectos espacio-carga que se dan en el cono de extracción (*skimmer cone*) como por ejemplo la repulsión existente entre iones cargados positivamente y moviéndose a la misma velocidad. En ambos casos, estos dos factores favorecen la transmisión de los iones más pesados y, por tanto, las relaciones isotópicas medidas tendrán asociadas una desviación que habrá de ser corregida para la obtención de medidas precisas.

Otro factor crítico es la necesidad de separar el analito de la matriz de la muestra, para evitar interferencias y además reducir efectos de discriminación de masas. Así, para llevar a cabo la extracción del analito de la matriz de la muestra se suele recurrir a la cromatografía en columnas abiertas, empleándose resinas de intercambio iónico. Es importante, que el grado de recuperación del analito tras la extracción sea cuantitativo, si no fuese el caso habría que evaluar si hay fraccionamiento isotópico en la columna de separación.

Asimismo, se pueden emplear sistemas de desolvatación o la medida en media o alta resolución (con la consiguiente reducción de sensibilidad). No obstante, no se consigue la resolución total del pico correspondiente al analito respecto a la interferencia, pero si hay una región espectral donde se observa una especie de meseta (*plateau*) donde solo la señal procedente del analito tiene contribución (Figura 20). Este tipo de resolución se conoce bajo el nombre de *pseudo*-alta resolución. En ese punto, la

desviación de masa (*mass bias*) entre el valor real y el experimental, es reproducible y es posible aplicar métodos de corrección.

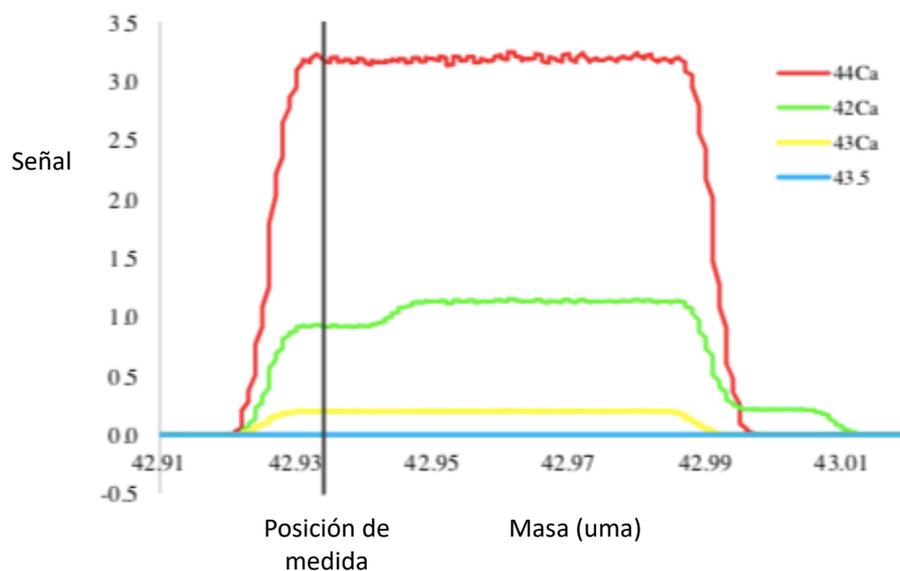


Figura 20. Escaneo del pico para la medida de los isótopos de Ca con MC-ICP-MS a media resolución. Se indica la posición donde el  $^{42}\text{Ca}$  estaría libre de la interferencia  $\text{ArH}_2^+$ . Figura adaptada de la referencia 193.

#### ▪ Métodos de corrección de la discriminación de masas

Los métodos utilizados para corregir la discriminación de masas se pueden clasificar en aquellos en los que: (i) la medida y la especie utilizada para calibrar isótopos de un mismo elemento o (ii) si la medida para muestra y patrón empleado en la corrección se hacen conjuntamente (corrección interna) o de manera independiente empleada para la corrección (corrección externa). La Tabla 1 recoge a modo de ejemplo estrategias para la corrección del efecto de discriminación de masas del estroncio.

Tabla 1. Ejemplo de estrategias para la calibración de la relación  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  en espectrometría de masas.

	Intra-elemental	Inter-elemental
<b>Corrección interna</b>	Corrección interna Sr-Sr	Zr-Sr, modelo exponencial
	Doble spike ( $^{88}\text{Sr}/^{84}\text{Sr}$ )	Zr-Sr, modelo de regresión
<b>Corrección externa</b>	Calibración gravimétrica	Bracketing Zr/Sr

- **Calibración externa gravimétrica.** Se emplean mezclas de isótopos de alta pureza para la calibración del espectrómetro de masas. Al ser medidos secuencialmente la muestra y el patrón de calibración, es crucial la estabilidad del instrumento y la coincidencia de matrices (*matrix matching*).
- **Corrección externa por *bracketing* (inter-elemento).** Es una vía de corrección muy comúnmente utilizada en MC-ICP-MS por su simplicidad. Únicamente se utiliza un patrón de analito del mismo elemento que se mide en una secuencia tipo patrón-muestra-patrón. Es fundamental que el efecto de discriminación de masas sea el mismo para el patrón y para la muestra y que la señal medida para el analito y el patrón en el instrumento sea igual (misma concentración)<sup>194</sup>.

Así, para una muestra dada, la relación isotópica se calcularía como la diferencia entre la relación isotópica absoluta de la muestra y la de un estándar, medido este antes y después de la muestra. Esta relación isotópica es nombrada mediante el símbolo de delta,  $\delta$ , y estaría expresada en tanto por mil (‰) (Ecuación 1).

$$\delta^{44/X}Ca = \left[ \frac{(Ca^{44/X})_{muestra} - (Ca^{44/X})_{estándar}}{(Ca^{44/X})_{estándar}} \right] \times 1000 \text{ (Ecuación 1)}$$

- **Corrección interna mediante *doble spike*.** Se añaden y mezclan cantidades conocidas de un elemento enriquecido en dos isótopos (*doble spike*) a una muestra que contiene dicho elemento a analizar. Resulta necesario conocer la composición isotópica del doble spike utilizado y que al menos cuatro o más isótopos se encuentren libres de interferencias<sup>195</sup>.
- **Corrección interna (inter-elemento).** Consiste en añadir un elemento distinto al analito. La corrección en este caso se puede hacer siguiendo tres rutas distintas: 1) asumiendo que tanto la especie medida como la utilizada para calibrar se rigen por la misma discriminación de masas, aplicándose entonces un modelo de corrección exponencial. El modelo matemático más frecuente para corregir la discriminación de masas en esta situación es la ley exponencial de Russell<sup>196</sup>; 2)

mediante la aplicación de un modelo de regresión, en el que no se asume la misma discriminación de masas para analito y elemento añadido y se hace uso de la deriva obtenida en la medida de la relación isotópica de analito y patrón en el tiempo; y 3) se puede hacer uso de la relación isotópica de un patrón de analito para corregir la relación isotópica en la muestra <sup>197</sup>.

#### **4.2.2. Ablación Láser acoplada a ICP-MS**

Actualmente, existe un gran interés por conocer la distribución elemental y molecular en los tejidos biológicos. Las técnicas de imaging por espectrometría de masas combinan la determinación de la distribución molecular y/o el análisis elemental. A tal fin, una de las técnicas más relevantes empleada en combinación con el ICP-MS, es la técnica de ablación láser (LA). LA-ICP-MS es una técnica sensible que como el ICP-MS permite analizar medidas de relaciones isotópicas y determinaciones multielementales en muestras sólidas incluyendo muestras biológicas. Concretamente, permite proporcionar información acerca de la distribución espacial de los elementos en las distintas capas de una estructura y su distribución elemental en secciones delgadas de tejidos. Además, es posible emplear anticuerpos marcados con marcas metálicas para detectar y cuantificar proteínas y que pueden medirse directamente en el tejido. La resolución espacial está entorno a las  $\mu\text{m}$ , pudiéndose alcanzar 1  $\mu\text{m}$  o menos de resolución lateral. Además, el modo de introducción de la muestra es simple y no requiere de procedimientos complejos, por lo que factores como la pérdida de muestra o la aparición de contaminación, son mínimos<sup>198</sup>.

En LA-ICP-MS, se emplea un haz láser focalizado (Nd:YAG, excímero) a partir del cual una muestra sólida es escaneada línea a línea. El procedimiento de ablación de la muestra se produce a partir de la incidencia de ese haz láser en un sólido que se encuentra en una cámara de ablación, de tal manera que una fina parte de la muestra queda ablacionada como partículas. Estas partículas como constituyentes de un aerosol son dirigidas al ICP mediante un gas inerte (Ar o mezcla de Ar y He). En el ICP, serán vaporizadas, atomizadas e ionizadas, para finalmente ser detectadas y analizadas en el espectrómetro de masas. Las intensidades de iones analito se registran frente al tiempo

a lo largo del escaneo láser y a partir de los datos obtenidos se obtienen imágenes bidimensionales. En función del espectrómetro de masas utilizado, para esta técnica se podría establecer unos límites de detección de  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  –  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  <sup>199</sup>.

Algunos aspectos críticos que resulta necesario optimizar para asegurar una correcta ablación y, en consecuencia, sensibilidad de la medida son, el diámetro del haz del láser, la frecuencia de repetición y la velocidad de barrido. Adicionalmente, la estequiometría o la cantidad del aerosol generado, el nivel de vaporización, atomización e ionización y la transmisión de los iones hacia el espectrómetro de masas, condicionan las características ofrecidas por LA-ICP-MS. Algunas fuentes de error claves en las medidas realizadas por LA-ICP-MS pueden achacarse a distintos procesos: el propio proceso de ablación láser, la generación del aerosol, el transporte del aerosol y la atomización e ionización del aerosol en el ICP.

Cabe mencionar que la técnica de LA-ICP-MS presenta como desventajas las limitaciones impuestas por los efectos de matriz, fraccionamiento elementales e isotópicos o la escasez de materiales de referencia certificados para una gran cantidad de muestras. No obstante, es sabido que, mediante el uso de láseres de duración de pulso más corto (desde nanosegundos hasta femtosegundos) y longitudes de onda cortas (de IR a UV), podrían disminuirse notoriamente los efectos relacionados con el fraccionamiento. Asimismo, también es necesaria la utilización de patrones con matrices similares a la de la muestra para paliar los efectos de matriz.

De forma general, un sistema de ablación láser consta de las siguientes partes (Figura 21) <sup>200</sup>:

- Un láser que produzca un haz unidireccional de fotones con alta energía.
- Un sistema de liberación del haz láser mediante el cual se puede alterar el diámetro, forma y energía del haz y que focaliza hacia la superficie de la muestra.
- Una celda de ablación donde se produce la interacción entre la muestra y el haz.
- Un sistema de transporte hacia el ICP-MS del aerosol generado.

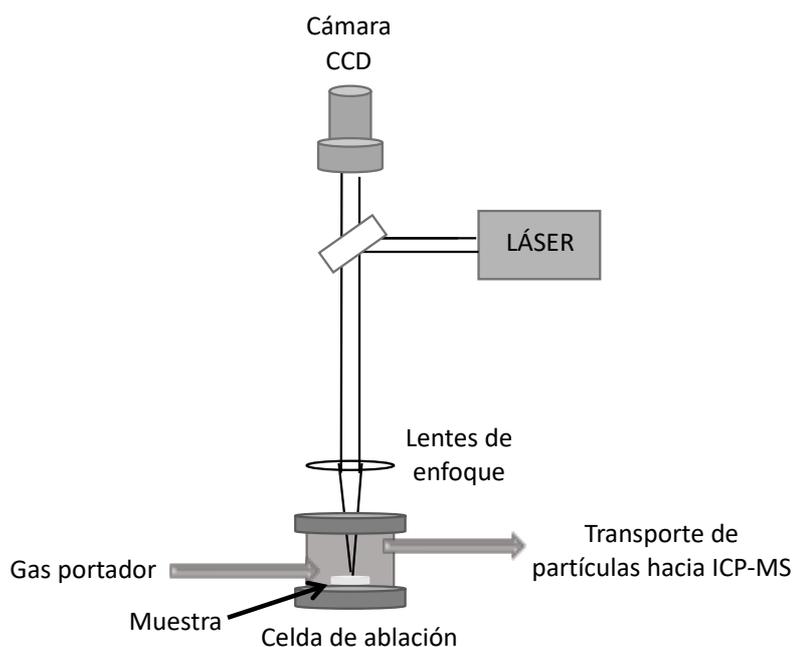


Figura 21. Esquema de un sistema de ablación láser.

Como ya se ha expuesto anteriormente, para la determinación y especiación de elementos esenciales y/o ultratraza en todo tipo de muestras, la técnica de ICP-MS ha sido empleada con frecuencia. En el área biológica y biomédica, LA-ICP-MS se ha aplicado en la medida de elementos (isótopos) en todo tipo de tejidos biológicos, como, por ejemplo, cerebro<sup>201, 202</sup>, hígado<sup>203</sup>, dientes<sup>204</sup> o huesos<sup>205</sup>. Esto se debe a sus excelentes características en cuanto a sensibilidad ( $\mu\text{g. g}^{-1}$ ), resolución espacial en el rango de  $\mu\text{m}$ , amplio rango dinámico y capacidad de llevar a cabo análisis multielemental y cuantitativos, entre otras.

#### 4.2.2.1. Bio-imaging elemental

Además de las aplicaciones en distintos campos de la biología, medicina, dentro de estas el *bioimaging* de tejidos ha sido también aplicado al estudio de enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que elementos esenciales tales como por ejemplo Zn, Fe, Mn o Cu están implicados en la regulación de procesos metabólicos, regulación de expresión génica o la protección ante especies reactivas de oxígeno<sup>206</sup>. Determinar la distribución de estos elementos (y otros elementos) así como su concentración a lo largo de secciones de tejido puede aportar una valiosa información

en cuanto al desarrollo y progresión de patologías neurodegenerativas: Alzheimer (AD), la enfermedad de Wilson, Parkinson, DMAE o glaucoma tal y como se comentó en la sección 4.2.1.1 (Análisis elemental)<sup>207</sup>.

Así, se ha observado que patologías neurodegenerativas, como el Alzheimer, estarían condicionadas por la interacción entre la proteína  $\beta$ -amiloide y la precursora amiloide con Fe, Cu y Zn. *Liu et. al.*<sup>208</sup>, evaluaron la distribución y los niveles de estos tres elementos en cerebros de ratones con Alzheimer y ratones control mediante LA-ICP-MS. Como método de calibración para la obtención de valores cuantitativos exactos de los analitos, se emplearon patrones de gelatina dopados con los elementos de interés. Tal y como se puede ver en la Figura 22, donde se representa la señal obtenida mediante LA-ICP-MS para  $^{13}\text{C}$ , que debido a que C es el elemento más abundante en los patrones de gelatina, fue seleccionado como patrón interno, Fe, Cu y Zn en un ratón con Alzheimer y otro control, en la corteza cerebral de los ratones que presentaban Alzheimer se obtuvieron niveles superiores para los tres metales, siendo evidentes las diferencias con respecto al grupo control.

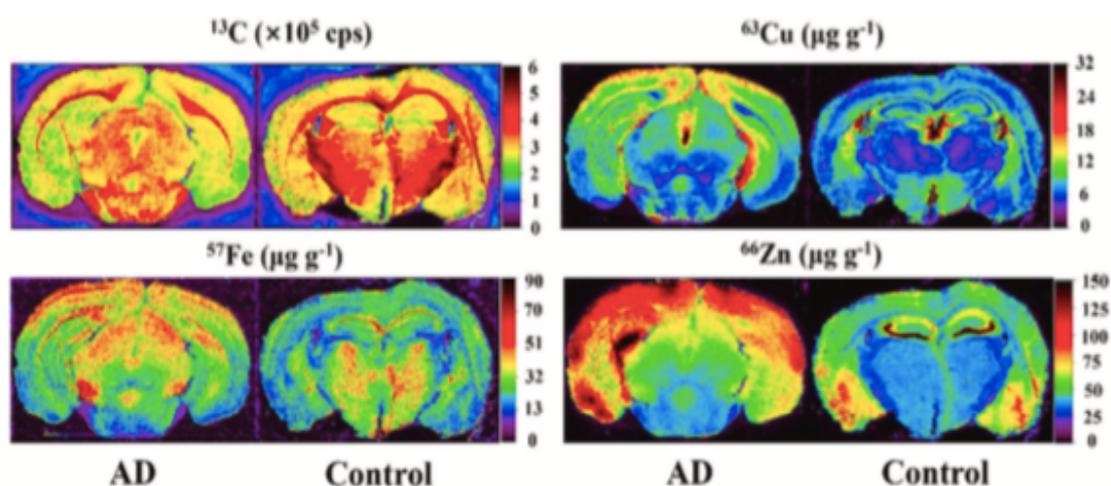


Figura 22. Determinación de los niveles de Fe, Cu y Zn en secciones de tejido cerebral de ratón junto a la señal de  $^{13}\text{C}$ . A la izquierda representada la imagen para los ratones con AD y a la derecha los controles. Figura adaptada de la referencia **¡Error! Marcador no definido..**

En otro estudio realizado en cortes de tejido ocular humano<sup>209</sup>, en el que se obtuvieron imágenes cuantitativas de la distribución de Zn a lo largo de la retina y del epitelio pigmentario retiniano (EPR), se observó una mayor acumulación de Zn en la región del EPR en comparación con la retina o la zona de la esclera. Asimismo, también

se determinó la distribución de Fe y Cu en estas regiones. En el caso del Cu, se encontró una distribución más homogénea a lo largo del tejido ocular, mientras que, en el caso del Fe, existieron resultados variables en función del donante analizado. Este estudio proporcionó información relevante en cuanto a la comprensión de los mecanismos que pueden condicionar enfermedades neurodegenerativas oculares como la DMAE.

Así mismo, la metodología basada en dilución isotópica (IDA) con detección por espectrometría de masas permite realizar determinaciones de alta precisión y exactitud. Al añadir isótopos estables de forma artificial para producir un cambio en la abundancia isotópica de un elemento concreto, se facilita la vía para el seguimiento y mayor comprensión de los sistemas biológicos y las enfermedades. Así, el empleo de estas especies enriquecidas junto con el análisis mediante LA-ICP-MS, ha permitido cuantificar elementos en muestras biológicas homogéneas mediante el uso de especies enriquecidas isotópicamente <sup>210</sup>.

#### **4.2.2.2. Bio-imaging isotópico**

El acoplamiento de LA con MC-ICP-MS tiene el potencial de convertirse en una importante herramienta en la determinación de relaciones isotópicas en muestras sólidas con resolución espacial. En comparación con la nebulización de convencional, con LA-MC-ICP-MS se puede obtener la composición elemental/isotópica *in situ* de una muestra sólida, con alta resolución espacial ( $\mu\text{m}$ ) y mínimo consumo de muestra. Además, de esta forma se puede evitar los problemas derivados de la preparación de la muestra, como una digestión incompleta de algunos minerales o poca estabilidad/efecto memoria de algunos elementos en soluciones ácidas diluidas, así como la presencia interferencias derivadas de óxidos o hidruros<sup>211</sup>. Por contrario, los trabajos en los que se hace uso de esta combinación instrumental es muy limitada, probablemente porque la sensibilidad intrínseca del MC-ICP-MS es inferior al ICP-MS y porque es necesario conseguir una mejor precisión de los resultados analíticos. <sup>1</sup>

Dentro del área biomédica, cabe destacar una aplicación en la que se llevó a cabo un estudio basado en la medida de relaciones isotópicas de Cu, elemento cuyo metabolismo se encuentra directamente relacionado con la enfermedad de Wilson. En

este caso, se empleó un láser de femtosegundos acoplado a MC-ICP-MS para la medida de  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  en orina (300  $\mu\text{L}$ ) depositada en un papel de filtro. Los resultados obtenidos mostraron que variaciones significativas en la composición isotópica de Cu para pacientes con la enfermedad pero que aún no habían sido sometidos a tratamiento con respecto a aquellos individuos a los que si se les había aplicado ya tratamiento. De hecho, la composición isotópica de cobre en los pacientes tratados y controles resultó ser similar<sup>212</sup>. Recientemente esta metodología se ha aplicado también al análisis de pequeñas gotas de suero depositadas sobre silicio<sup>213</sup>.

#### **4.2.2.3. Bio-imaging molecular**

Además del interés biológico que suscita la cuantificación y determinación de elementos esenciales, se requieren técnicas analíticas que permitan llevar a cabo la localización y determinación cuantitativa de moléculas, específicamente proteínas que también están directamente relacionadas con un metabolismo anormal del organismo<sup>214</sup>.

La cuantificación absoluta de proteínas supone aún un importante reto en el área de la proteómica. Algunas de sus limitaciones están relacionadas con las matrices complejas en las que las proteínas suelen encontrarse, los niveles bajos de concentraciones en los que se pueden encontrar algunas biomoléculas. Por estos motivos, disponer de técnicas de análisis con alta especificidad, sensibilidad y con un amplio rango lineal, resulta esencial. Técnicas basadas en espectrometría de masas molecular, que emplean fuentes de ionización débiles como la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) o la ionización por electrospray (ESI) son utilizadas con este objetivo, pero requieren el uso de estándares específicos para la determinación de cada molécula absoluta<sup>215</sup>.

Como alternativa al MALDI o ESI, el ICP-MS permite el seguimiento de biomoléculas que contienen heteroátomos como S, Se, P o que ligan metales, como selenoproteínas, fosfoproteínas y metaloproteínas. Estas marcas elementales (o

isotópicas) pueden ser añadidas de forma intencionada, bioconjugándolas a una molécula específica. Así, por ejemplo, I<sup>216</sup> o lantánidos<sup>217</sup> han sido utilizados como marcas para determinaciones cuantitativas. No obstante, estas estrategias presentan el inconveniente de la necesidad de utilizar métodos de separación (como cromatografía o electroforesis en gel) para aislar la proteína de la matriz en la que se encuentra antes de ser detectada por ICP-MS.

Es en este punto donde el empleo de anticuerpos marcados con marcas metálicas, por ejemplo, nanopartículas metálicas, quelatos coordinados a un metal o polímeros constituidos por varios quelatos, abren la puerta a la detección múltiple de proteínas y a su cuantificación. Así, estas marcas podrían ser utilizadas en protocolos de inmunohistoquímica y permitirían la detección de las biomoléculas proteicas en tejidos biológicos mediante LA-ICP-MS. Esta combinación superaría en cuanto a sensibilidad a los protocolos de inmunohistoquímica convencionales<sup>218</sup> y por tanto representa una alternativa a la detección de proteínas por fluorescencia. Se evitarían de esta forma, los fenómenos de solapamiento espectral entre fluoróforos, los cuales suponen un impedimento para la detección multielemental de analitos. Además, otra limitación que puede destacarse, en lo que a la detección fluorescente se refiere, está relacionada con el análisis de células y tejidos biológicos para los que suelen darse fenómenos de autofluorescencia o *scattering* de la señal.

Como ejemplos representativos de esta temática, cabe mencionar varios trabajos en los que utilizó MeCAT (*metal-coded affinity tags*) como agente quelato con Ho en su núcleo, para estudiar los efectos de la abundancia anómala de un glicosaminoglicano, el queratán sulfato (KS), en tejido de origen humano y de ratón. Los resultados de este trabajo (Figura 23), mostraron que las modificaciones en la abundancia de KS pueden estar directamente relacionadas con la aparición de enfermedades como esclerosis lateral amiotrófica, distrofia corneal macular o generación de tumores relacionados con el cáncer de páncreas, encontrándose este glicosaminoglicano en el estroma de la córnea<sup>219</sup>.

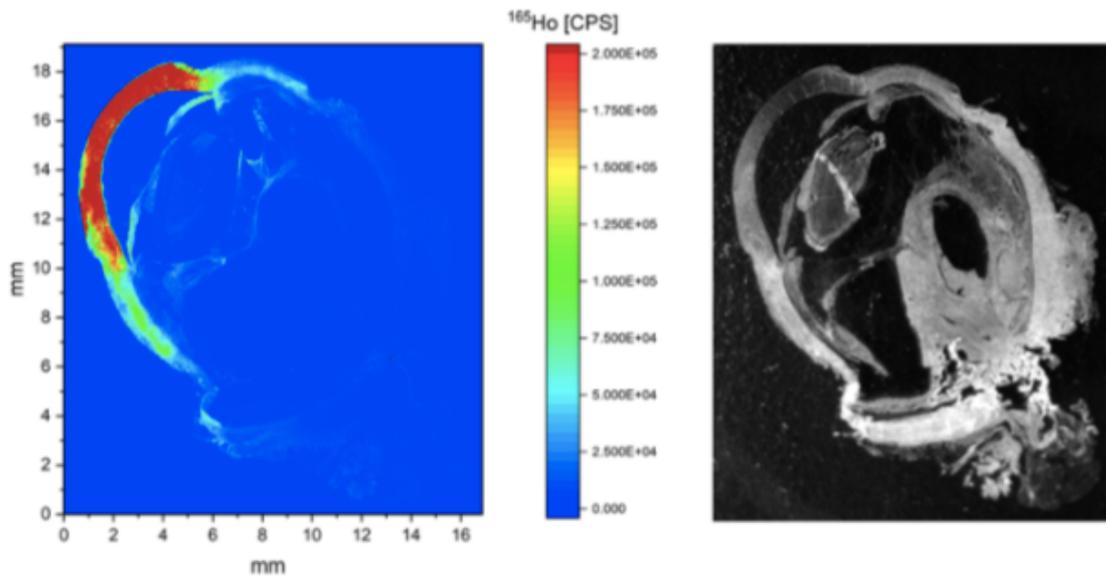


Figura 23. A) Imagen elemental obtenida a partir de la señal de  $^{165}\text{Ho}$  mediante LA-ICP-MS B) imagen del tejido de ojo humano al microscopio. Figura adaptada de la referencia **¡Error! Marcador no definido...**

Por último, cabe destacar que el uso combinado de LA-ICP-MS con técnicas inmunohistoquímicas no solo permite la cuantificación de biomoléculas, sino también su detección simultánea dentro de una misma sección de tejido. Por ejemplo, un estudio basado en el empleo de un quelato metálico, el ácido 1,4,7,10- tetraaza-ciclododecano-tetraacético (DOTA) recoge la detección en un mismo tejido y al mismo tiempo, distintos marcadores tumorales de cáncer de mama<sup>220</sup>.

En otro ejemplo<sup>221</sup>, hacen uso de nanopartículas de oro (AuNPs) para cuantificar la proteína  $\beta$ -amiloide ( $\text{A}\beta$ ) en tejido cerebral de ratón relacionada con AD. Respecto al tejido de un ratón sano, se observó una acumulación preferente de  $\text{A}\beta$  en la corteza cerebral (zona rodeada por una elipse en la Figura 24) del tejido del ratón enfermo, además de una mayor concentración.

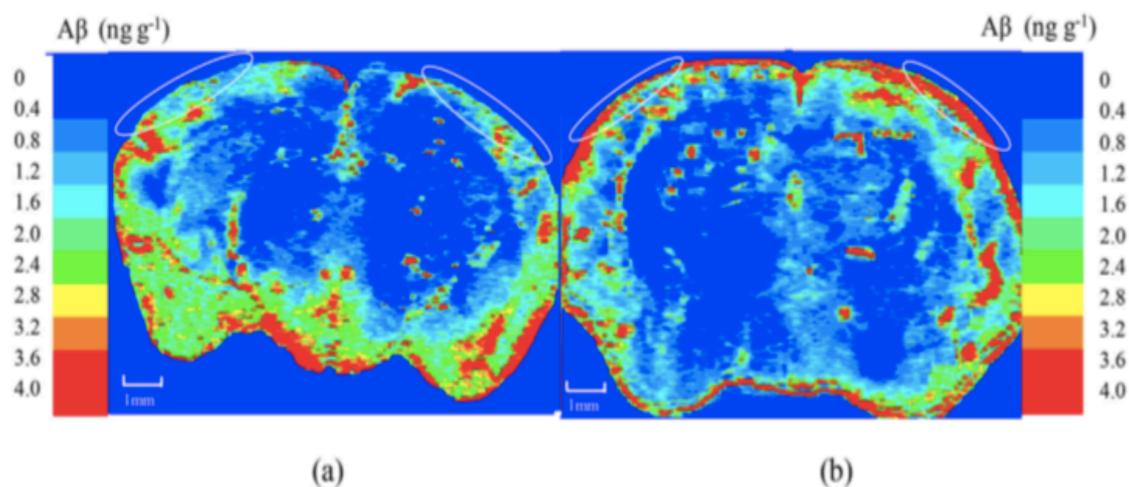


Figura 24. Imágenes cuantitativas de A $\beta$  en las secciones de tejido de a) ratón sano b) ratón enfermo con AD. Figura adaptada de la referencia *¡Error! Marcador no definido.*

Aunque el número de publicaciones basadas en el empleo de NPs como marcas metálicas para su posterior medida por ICP-MS ha sido notablemente mayor en comparación con el uso de NCs metálicos, existen varios ejemplos de sus prometedoras capacidades como marcas. Además, los MNCs permitirían llevar a cabo determinaciones bimodales al exhibir también emisión fluorescente. Así, por ejemplo, *Lores-Padín et al.* *¡Error! Marcador no definido.* realizaron la determinación de los niveles de proteína IgE en suero humano a partir de detección bimodal, por ICP-MS y fluorescencia, de PtNCs. La amplificación de señal mediante ICP-MS proporcionó límites de detección inferiores ( $0,08 \text{ ng mL}^{-1}$ ) en comparación con la medida de fluorescencia ( $0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ ).

Otro estudio basado en la técnica LA-ICP-MS y microscopía confocal, utilizó anticuerpos unidos a AuNCs para la detección inmunohistoquímica de proteínas diana. De esta forma, se pudo estudiar la distribución específica de dos proteínas MT1/2 y MT3 en las distintas capas celulares que componen la retina, observándose una similitud en la distribución de las proteínas en las imágenes obtenidas mediante ambos modos de detección tal y como puede observarse en la Figura 25<sup>222</sup>. Recientemente también se han aplicado estos NCs metálicos para desarrollar un método de cuantificación de la proteína MT1/2 en secciones de retina humana combinando IHC con *imaging* por LA-ICP-MS<sup>223</sup>.

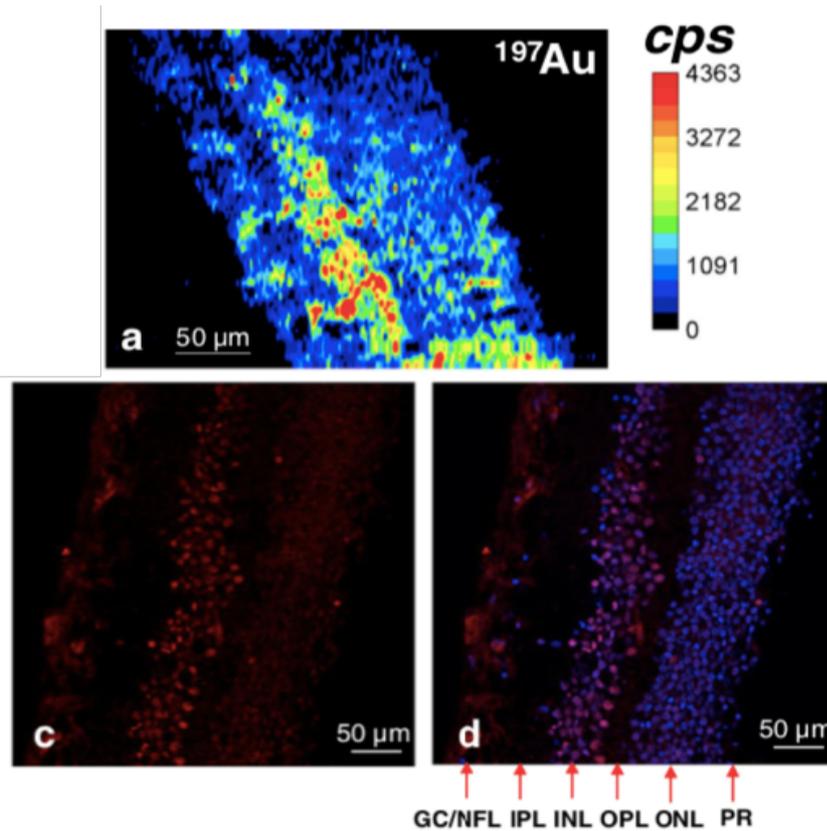


Figura 25. Imágenes obtenidas de la retina neurosensorial tras aplicar el protocolo de inmunohistoquímica con AuNCs unidos al anticuerpo de la MT3. Figura modificada de la referencia **¡Error! Marcador no definido..**

---

## Referencias bibliográficas

---

- <sup>1</sup> Bonnel, S., Mohand-Said, S., Sahel, J. A. (2003). The aging of the retina. *Experimental gerontology*, 38(8), 825–831.
- <sup>2</sup> Nations U. (2019). World population prospects 2019: highlights. *Dep Econ Soc Aff Popul Div*. Publicado online
- <sup>3</sup> Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders*, 29(13), 1583-1590.
- <sup>4</sup> Pandya, V. A., & Patani, R. (2020). Decoding the relationship between ageing and amyotrophic lateral sclerosis: a cellular perspective. *Brain*, 143(4), 1057-1072.
- <sup>5</sup> Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurología (English Edition)*, 32(8), 523-532.
- <sup>6</sup> Roda, M., Ciavarella, C., Giannaccare, G., Versura, P. (2019). Biomarkers in Tears and Ocular Surface: A Window for Neurodegenerative Diseases. *Eye & Contact Lens*, 46 Suppl 2, S129–S134.
- <sup>7</sup> Fratiglioni, L., & Qiu, C. (2009). Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental gerontology*, 44(1-2), 46-50.
- <sup>8</sup> Maniati, M. S., Maniati, M., Yousefi, T., Ahmadi-Ahangar, A., & Tehrani, S. S. (2019). New insights into the role of microRNAs and long noncoding RNAs in most common neurodegenerative diseases. *Journal of cellular biochemistry*, 120(6), 8908-8918.
- <sup>9</sup> Subramaniam S. (2019). Selective Neuronal Death in Neurodegenerative Diseases: The Ongoing Mystery. *The Yale journal of biology and medicine*, 92(4), 695–705.
- <sup>10</sup> Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Bécot, A., & Checler, F. (2019). Does intraneuronal accumulation of carboxyl-terminal fragments of the amyloid precursor protein trigger early neurotoxicity in Alzheimer's disease?. *Current Alzheimer Research*, 16(5), 453-457.
- <sup>11</sup> Zucca, F. A., Vanna, R., Cupaioli, F. A., Bellei, C., De Palma, A., Di Silvestre, D., ... & Zecca, L. (2018). Neuromelanin organelles are specialized autolysosomes that accumulate undegraded proteins and lipids in aging human brain and are likely involved in Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*, 4(1), 1-23.
- <sup>12</sup> Jucker, M., & Walker, L. C. (2018). Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 21(10), 1341-1349.
- <sup>13</sup> Flinn, J. M., Kakalec, P., Tappero, R., Jones, B., & Lengyel, I. (2014). Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(7), 1223–1228.
- <sup>14</sup> Thompson, R. B., Reffatto, V., Bundy, J. G., Kortvely, E., Flinn, J. M., Lanzirotti, A., Jones, E. A., McPhail, D. S., Fearn, S., Boldt, K., Ueffing, M., Ratu, S. G. S., Pauleikhoff, L., Bird, A. C., Lengyel, I. (2015). Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), 1565-1570.
- <sup>15</sup> Cicero, C. E., Mostile, G., Vasta, R., Rapisarda, V., Signorelli, S. S., Ferrante, M., Zappia, M., & Nicoletti, A. (2017). Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environmental research*, 159, 82–94.

- <sup>16</sup> Gilbert, R., Peto, T., Lengyel, I., & Emri, E. (2019). Zinc Nutrition and Inflammation in the Aging Retina. *Molecular nutrition & food research*, 63(15), e1801049.
- <sup>17</sup> Ho, A. C., Regillo, C. D. (2011). Age-related Macular Degeneration Diagnosis and Treatment. Springer Science & Business Media.
- <sup>18</sup> Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenemy, P. G., Roberts, F., & Pearlman, E. (2020). *The eye e-book: basic sciences in practice*. Elsevier Health Sciences.
- <sup>19</sup> Fu, X., Huu, V. A. N., Duan, Y., Kermany, D. S., Valentim, C. C., Zhang, R., Zhu, J., Zhang, C. L., Sun, X., Zhang, K. (2018). Clinical applications of retinal gene therapies. *Precision Clinical Medicine*, 1(1), 5-20
- <sup>20</sup> Williams, B. M., Burgess, P.I., Zheng, Y. (2019). Capítulo 13: Drusen and macular degeneration, *Computational Retinal Image Analysis*, 245-272, Elsevier and MICCAI Society Book Series.
- <sup>21</sup> Ponzini, E., Santambrogio, C., De Palma, A., Mauri, P., Tavazzi, S., Grandori, R. (2021). Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. *Mass spectrometry reviews*.
- <sup>22</sup> Jun, S., Datta, S., Wang, L., Pegany, R., Cano, M., & Handa, J. T. (2019). The impact of lipids, lipid oxidation, and inflammation on AMD, and the potential role of miRNAs on lipid metabolism in the RPE. *Experimental eye research*, 181, 346-355.
- <sup>23</sup> Jager, R. D., Mieler, W. F., Miller, J. W. (2008). Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 358(24), 2606-2617.
- <sup>24</sup> Taylor, A. (2012). Introduction to the issue regarding research regarding age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*, 33(4), 291.
- <sup>25</sup> Gheorghe, A., Mahdi, L., Musat, O. (2015). Age-related macular degeneration. *Romanian journal of ophthalmology*, 59(2), 74.
- <sup>26</sup> Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S., Adamis, A. P. (2003). Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology*, 48(3), 257-293.
- <sup>27</sup> Sood, D., Sood, S., Sood, I., Kumar, D., Sood, R., Sood, N. N. (2018). Glaucoma awareness amongst glaucoma patients seeking a second opinion. *International Ophthalmology*, 38(4), 1441-1449.
- <sup>28</sup> Tham, Y. C., Li, X., Wong, T. Y., Quigley, H. A., Aung, T., & Cheng, C. Y. (2014). Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 121(11), 2081-2090.
- <sup>29</sup> Kerrigan-Baumrind, L. A., Quigley, H. A., Pease, M. E., Kerrigan, D. F., & Mitchell, R. S. (2000). Number of ganglion cells in glaucoma eyes compared with threshold visual field tests in the same persons. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(3), 741-748.
- <sup>30</sup> Hu, C. X., Zangalli, C., Hsieh, M., Gupta, L., Williams, A. L., Richman, J., Spaeth, G. L. (2014). What do patients with glaucoma see? Visual symptoms reported by patients with glaucoma. *The American journal of the medical sciences*, 348(5), 403-409.
- <sup>31</sup> Wolf, C., Gramer, E., Müller-Myhsok, B., Pasutto, F., Gramer, G., Wissinger, B., Weisschuh, N. (2010). Lysyl oxidase-like 1 gene polymorphisms in German patients with normal tension glaucoma, pigmentary glaucoma and exfoliation glaucoma. *Journal of glaucoma*, 19(2), 136-141.
- <sup>32</sup> Bravetti, G. E., Gillmann, K., Mansouri, K., Mermoud, A. (2019). Congenital Refractory Glaucoma: A New Ophthalmic Association of Kabuki Syndrome and its Management With Glaucoma Drainage Devices. *Journal of glaucoma*, 28(6), e96-e98.

- <sup>33</sup> Mansouri, K., Gillmann, K., Rao, H. L., Guidotti, J., Mermoud, A. (2018). Prospective Evaluation of XEN Gel Implant in Eyes With Pseudoexfoliative Glaucoma. *Journal of glaucoma*, 27(10), 869–873.
- <sup>34</sup> Schlötzer-Schrehardt, U., & Naumann, G. O. (1995). Trabecular meshwork in pseudoexfoliation syndrome with and without open-angle glaucoma. A morphometric, ultrastructural study. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(9), 1750-1764.
- <sup>35</sup> Viso, E., Rodríguez-Ares, M. T., & Gude, F. (2010). Prevalence of pseudoexfoliation syndrome among adult Spanish in the Salnés eye Study. *Ophthalmic epidemiology*, 17(2), 118-124.
- <sup>36</sup> Mitra, R. N., Conley, S. M., Naash, M. I. (2016). *Retinal Degenerative Diseases*, Springer, Switzerland
- <sup>37</sup> Ramasamy, K., Ramasamy, K., Kuppamuthu, D., Jayapal, J. M. (2019). *Advances in Vision Research, Volume II, 2019*, Springer, Singapore
- <sup>38</sup> Bulk, M., Abdelmoula, W. M., Geut, H., Wiarda, W., Ronen, I., Dijkstra, J., & van der Weerd, L. (2020). Quantitative MRI and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of iron in the frontal cortex of healthy controls and Alzheimer's disease patients. *Neuroimage*, 215, 116808.
- <sup>39</sup> Fang, T., Chen, W., Cheng, Y., Zhang, Y., Luo, Q., Wu, K., ... & Zhao, Y. (2022). LA-ICP-MS bioimaging demonstrated disturbance of metal ions in the brain of Parkinson's disease model mouse undergoing manganese-enhanced MRI. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-11.
- <sup>40</sup> Stanescu, I., Bulboaca, A., Dogaru, G., Nicula, C. (2020). Tear biomarkers in neurodegenerative diseases. *Balneo Research Journal*, 11(3), 191-195
- <sup>41</sup> Barro, C., & Zetterberg, H. (2021). The blood biomarkers puzzle-A review of protein biomarkers in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 361, 109281.
- <sup>42</sup> Ashton, N.J., Hye, A., Rajkumar, A. P., Leuzy, A., Snowden, S., Suárez-Calvet, M., Karikari, T. K., Schöll, M., La Joie, R., Rabinovici, G., Höglund, K., Ballard, C., Hortobágyi, T., Svenningsson, P., Blennow, K., Zetterberg, H., Aarsland, D. (2020). An update on blood-based biomarkers for non-Alzheimer neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(5), 265-284.
- <sup>43</sup> Moreda-Piñeiro, J., Cantarero-Roldán, A., Moreda-Piñeiro, A., Cocho, J. Á., Bermejo-Barrera, P. (2017). Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multi-elemental determination in dried blood spots. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(8), 1500-1507.
- <sup>44</sup> Moreda-Piñeiro, J., Cocho, J. A., Couce, M. L., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P. (2021). Trace elements in dried blood spots as potential discriminating features for metabolic disorder diagnosis in newborns. *Metallomics: integrated biometal science*, 13(5), mfab020.
- <sup>45</sup> Abduljabbar, T. N., Sharp, B. L., Reid, H. J., Barzegar-Befroeid, N., Peto, T., Lengyel, I. (2019). Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro-sampling ICP-MS and sample dilution. *Talanta*, 204, 663–669.
- <sup>46</sup> Aranaz, M., Costas-Rodríguez, M., Lobo, L., González-Iglesias, H., Vanhaecke, F., Pereiro, R. (2020). 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. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 177, 112857.

- <sup>47</sup> Vinceti, M., Filippini, T., Mandrioli, J., Violi, F., Bargellini, A., Weuve, J., Fini, N., Grill, P., Michalke, B. (2017). Lead, cadmium and mercury in cerebrospinal fluid and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A case-control study. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, *43*, 121–125.
- <sup>48</sup> Cardoso, B. R., Hare, D. J., Bush, A. I., Li, Q. X., Fowler, C. J., Masters, C. L., Martins, R. N., Ganio, K., Lothian, A., Mukherjee, S., Kapp, E. A., Roberts, B. R., The AIBL Research Group (2017). Selenium levels in serum, red blood cells, and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: a report from the Australian Imaging, Biomarker Lifestyle Flagship Study of Ageing (AIBL). *Journal of Alzheimer's Disease*, *57*(1), 183-193.
- <sup>49</sup> Jünemann, A. G., Stopa, P., Michalke, B., Chaudhri, A., Reulbach, U., Huchzermeyer, C., Schlötzer-Schrehardt, U., Kruse, F.E., Zrenner, E., Rejdak, R. (2013). Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exsudative age-related macular degeneration: a case-control study. *PLoS one*, *8*(2), e56734.
- <sup>50</sup> Zhou, Y., Hong, F., Wang, X., Feng, J., Zhu, D., Xu, Y., & Tao, Y. (2019). Abnormal levels of aqueous humor trace elements in patients with cytomegalovirus retinitis. *Eye*, *33*(10), 1606-1612.
- <sup>51</sup> Aranaz, M., Costas-Rodríguez, M., Lobo, L., García, M., González-Iglesias, H., Pereiro, R., Vanhaecke, F. (2022). Homeostatic alterations related to total antioxidant capacity, elemental concentrations and isotopic compositions in aqueous humor of glaucoma patients. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *414*(1), 515-524.
- <sup>52</sup> González de Vega, R., Fernández-Sánchez, M. L., González Iglesias, H., Coca Prados, M., Sanz-Medel, A. (2015). Quantitative selenium speciation by HPLC-ICP-MS (IDA) and simultaneous activity measurements in human vitreous humor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(9), 2405-2413.
- <sup>53</sup> Santos Junior, J. C., Mollo Filho, P. C., Felice Guidugli, R. B., Eberlin, M. N., Pessôa, G. D. S., da Silva, E. G., Zezzi Arruda, M. A., Höehr, N. F. (2014). Metals and (metallo) proteins identification in vitreous humor focusing on post-mortem biochemistry. *Metallomics*, *6*(10), 1801-1807.
- <sup>54</sup> Vázquez, M., Ibarra, I., Sibón, A., Pérez-Cárceles, M. D. (2017). Multi-element Analysis of Vitreous Humour Samples by ICP-MS and ICP-OES. *At. Spectrosc*, *38*, 124-132.
- <sup>55</sup> Moyano, F., Verni, E., Tamashiro, H., Digenaro, S., Martinez, L. D., & Gil, R. A. (2014). Single-step procedure for trace element determination in synovial fluid by dynamic reaction cell-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, *112*, 17-24.
- <sup>56</sup> Galusha, A. L., Haig, A. C., Bloom, M. S., Kruger, P. C., McGough, A., Lenhart, N., Wong, R., Fujimoto, V. Y., Mok-Lin, E., Parsons, P. J. (2019). Ultra-trace element analysis of human follicular fluid by ICP-MS/MS: pre-analytical challenges, contamination control, and matrix effects. *Journal of analytical atomic spectrometry*, *34*(4), 741-752.
- <sup>57</sup> Markiewicz, B., Sajnog, A., Lorenc, W., Hanć, A., Komorowicz, I., Suliburska, J., Kocylowski, R., Barankiewicz, D. (2017). Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty. *Talanta*, *174*, 122-130.
- <sup>58</sup> Lemoine, L., Thijssen, E., Noben, J. P., Adriaensens, P., Carleer, R., & Van der Speeten, K. (2018). A validated inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the quantification of total platinum content in plasma, plasma ultrafiltrate, urine and peritoneal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *152*, 39-46.

- <sup>59</sup> Sajnog, A., Tkaczyk, M., Stańczyk, M., Szaflik, K., Suliburska, J., Kocylowski, R., & Barańkiewicz, D. (2021). A new procedure for the determination of 21 macro-and trace elements in human fetal urine using an inductively coupled plasma mass spectrometry with dynamic reaction cell (ICP-DRC-MS) equipped with a micro-flow nebulizer. *Talanta*, 222, 121672.
- <sup>60</sup> García-Cabo, C., Llano-Suárez, P., Benavente-Fernández, L., Calleja-Puerta, S., Costa-Fernández, J. M., & Fernández-Abedul, M. T. (2020). Obtaining information from the brain in a non-invasive way: determination of iron in nasal exudate to differentiate hemorrhagic and ischemic strokes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(5), 847-853.
- <sup>61</sup> García-Cabo, C., Llano-Suárez, P., Fernández, L. B., Costa-Fernández, J. M., Fernández-Abedul, M. T., & Calleja-Puerta, S. (2020). Iron measured in nasal exudate samples as a new and useful biomarker in the differential diagnosis of patients with acute stroke. *Cerebrovascular Diseases*, 49(6), 625-631.
- <sup>62</sup> Li, P., Zhong, Y., Jiang, X., Wang, C., Zuo, Z., & Sha, A. (2012). Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality. *Biological trace element research*, 148(1), 1-6.
- <sup>63</sup> Katayama, M., Kaneko, S., Takamatsu, K., Tsukimura, T., Togawa, T. (2013). Determination of trace metals in human seminal plasma using inductively coupled plasma mass spectrometry and multivariate statistical analyses for sperm parameters. *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, 4, 147.
- <sup>64</sup> Subashchandrabose, S., Pereira-Filho, E. R., Donati, G. L. (2017). Trace element analysis of urine by ICP-MS/MS to identify urinary tract infection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(8), 1590-1594.
- <sup>65</sup> Aramendía, M., Rello, L., Vanhaecke, F., & Resano, M. (2012). Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers. *Analytical chemistry*, 84(20), 8682-8690.
- <sup>66</sup> Resano, M., Aramendía, M., Rello, L., Calvo, M. L., Bérail, S., & Pécheyran, C. (2013). Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28(1), 98-106.
- <sup>67</sup> Minnich, M. G., Miller, D. C., & Parsons, P. J. (2008). Determination of As, Cd, Pb, and Hg in urine using inductively coupled plasma mass spectrometry with the direct injection high efficiency nebulizer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(3), 389-395.
- <sup>68</sup> Jones, D. R., Jarrett, J. M., Stukes, D., Baer, A., McMichael, M., Wallon, K., Xiao, G., Jones, R. L. (2021). Development and validation of a biomonitoring method to measure As, Cr, and Ni in human urine samples by ICP-UCT-MS. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 234, 113713.
- <sup>69</sup> Romano, F., Castiblanco, A., Spadotto, F., Di Scipio, F., Malandrino, M., Berta, G. N., Aimetti, M. (2020). ICP-mass-spectrometry ionic profile of whole saliva in patients with untreated and treated periodontitis. *Biomedicines*, 8(9), 354
- <sup>70</sup> Marín Martínez, L., Molino Pagán, D., López Jornet, P. (2018). Trace elements in saliva as markers of type 2 diabetes mellitus. *Biological trace element research*, 186(2), 354-360.

- <sup>71</sup> Kim, Y. J., Kim, Y. K., Kho, H. S. (2010). Effects of smoking on trace metal levels in saliva. *Oral diseases*, 16(8), 823-830.
- <sup>72</sup> Siquier-Coll, J., Bartolomé, I., Pérez-Quintero, M., Muñoz, D., Robles, M. C., & Maynar-Mariño, M. (2020). Effect of exposure to high temperatures in the excretion of cadmium and lead. *Journal of Thermal Biology*, 89, 102545.
- <sup>73</sup> Saran, T., Zawadka, M., Chmiel, S., & Mazur, A. (2018). Sweat iron concentration during 4-week exercise training. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(3), 500.
- <sup>74</sup> Tan, S. S., Khor, G. L., Stoutjesdijk, E., Ng, K. W. T., Khouw, I., Bragt, M., Schaafsma, A., Dijck-Brouwer, D.A.J., Muskiet, F. A. (2020). Case study of temporal changes in maternal dietary intake and the association with breast milk mineral contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 89, 103468.
- <sup>75</sup> Levi, M., Hjelm, C., Harari, F., Vahter, M. (2018). ICP-MS measurement of toxic and essential elements in human breast milk. A comparison of alkali dilution and acid digestion sample preparation methods. *Clinical biochemistry*, 53, 81-87.
- <sup>76</sup> Astolfi, M. L., Marotta, D., Cammalleri, V., Marconi, E., Antonucci, A., Avino, P., Canepari, S., Vitali, M., Protano, C. (2021). Determination of 40 elements in powdered infant formulas and related risk assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5073.
- <sup>77</sup> Dutkiewicz, E. P., Urban, P. L. (2016). Quantitative mass spectrometry of unconventional human biological matrices. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2079), 20150380
- <sup>78</sup> Tamhane, M., Cabrera-Ghayouri, S., Abelian, G., Viswanath, V. (2019). Review of biomarkers in ocular matrices: challenges and opportunities. *Pharmaceutical research*, 36(3), 1-35.
- <sup>79</sup> Ngo, W., Chen, J., Panthi, S., Nichols, K. K., Nichols, J. J. (2018). Comparison of collection methods for the measure of human meibum and tear film-derived lipids using mass spectrometry. *Current eye research*, 43(10), 1244-1252
- <sup>80</sup> Cicalini, I., Rossi, C., Pieragostino, D., Agnifili, L., Mastropasqua, L., di Ioia, M., De Luca, G., Onofri, M., Federici, L., Del Boccio, P. (2019). Integrated Lipidomics and Metabolomics Analysis of Tears in Multiple Sclerosis: An Insight into Diagnostic Potential of Lacrimal Fluid. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1265.
- <sup>81</sup> Cancarini, A., Fostinelli, J., Napoli, L., Gilberti, M. E., Apostoli, P., Semeraro, F. (2017). Trace elements and diabetes: assessment of levels in tears and serum. *Experimental eye research*, 154, 47-52.
- <sup>82</sup> Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523(7560), 337-341.
- <sup>83</sup> Ju, H., Lai, G, Yan. F. (2017). Chapter 1: Introduction, Immunosenescence for detection of protein biomarkers, Elsevier, Amsterdam, 1-30
- <sup>84</sup> Mikkelsen, S. R., Cortón. E. (2016). Chapter 6: Antibodies, Bioanalytical Chemistry, John Wiley & Sons, Nueva Jersey, 117-130
- <sup>85</sup> Giesen, C., Waentig, L., Panne, U., Jakubowski, N. (2012). History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 76, 27-39.

- 
- <sup>86</sup> Ju, H., Lai, G, Yan, F. (2017). Chapter 1: Introduction, *Inmunosensing for detection of protein biomarkers*, Elsevier, Amsterdam, 1-30
- <sup>87</sup> Mikkelsen, S. R., Cortón, E. (2016). Chapter 7: Quantitative Immunoassays with Labels, *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Nueva Jersey, 131-165
- <sup>88</sup> Bishop, D. P., Cole, N., Zhang, T., Doble, P. A., Hare, D. J. (2018). A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging. *Chemical Society Reviews*, 47(11), 3770-3787.
- <sup>89</sup> Kim, S. W., Roh, J., Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *Journal of pathology and translational medicine*, 50(6), 411.
- <sup>90</sup> Kalantari, N., Bayani, M., Ghaffari, T. (2016). Deparaffinization of formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks using hot water instead of xylene. *Analytical biochemistry*, 507, 71-73.
- <sup>91</sup> Feynman, R.P. (1960). *There's plenty of room at the bottom*. Caltech Engineering and Science, 23, 5, 22-36.
- <sup>92</sup> "ISO/TR 18401:2017: Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series."
- <sup>93</sup> Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., Gordon, S. C. (2015). *Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 137–150.
- <sup>94</sup> "Recomendación de la Comisión de 18 de Octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (2011/696/UE)."
- <sup>95</sup> Zhang, Q., Yang, M., Zhu, Y., Mao, C. (2018). Metallic nanoclusters for cancer imaging and therapy. *Current medicinal chemistry*, 25(12), 1379-1396.
- <sup>96</sup> Li, J., Zhu, J. J., Xu, K. (2014). Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 58, 90-98.
- <sup>97</sup> Tao, Y., Li, M., Ren, J., Qu, X. (2015). Metal nanoclusters: novel probes for diagnostic and therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8636-8663.
- <sup>98</sup> Goswami, N., Yao, Q., Luo, Z., Li, J., Chen, T., Xie, J. (2016). Luminescent metal nanoclusters with aggregation-induced emission. *The journal of physical chemistry letters*, 7(6), 962-975.
- <sup>99</sup> Lu, Y., Chen, W. (2012). Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chemical Society Reviews*, 41(9), 3594-3623.
- <sup>100</sup> Díez, I., Ras, R. H. (2011). Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, 3(5), 1963-1970.
- <sup>101</sup> Zhang, Q., Yang, M., Zhu, Y., Mao, C. (2018). Metallic nanoclusters for cancer imaging and therapy. *Current medicinal chemistry*, 25(12), 1379-1396.
- <sup>102</sup> Su, Y., Xue, T., Liu, Y., Qi, J., Jin, R., Lin, Z. (2019). Luminescent metal nanoclusters for biomedical applications. *Nano Research*, 12(6), 1251-1265.
- <sup>103</sup> Yang, T. Q., Peng, B., Shan, B. Q., Zong, Y. X., Jiang, J. G., Wu, P., Zhang, K. (2020). Origin of the photoluminescence of metal nanoclusters: from metal-centered emission to ligand-centered emission. *Nanomaterials*, 10(2), 261.
- <sup>104</sup> Shang, L., Dong, S., Nienhaus, G. U. (2011). Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: synthesis and biological applications. *Nano today*, 6(4), 401-418.
- <sup>105</sup> Udaya Bhaskara Rao, T., Pradeep, T. (2010). Luminescent Ag7 and Ag8 clusters by interfacial synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(23), 3925-3929.
-

- <sup>106</sup> Cao, X. L., Li, H. W., Yue, Y., Wu, Y. (2013). pH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@ BSA and its effects on NCs emission. *Vibrational Spectroscopy*, 65, 186-192.
- <sup>107</sup> Guo, L., Tang, T., Hu, L., Yang, M., Chen, X. (2017). Fluorescence assay of Fe (III) in human serum samples based on pH dependent silver nanoclusters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 773-778.
- <sup>108</sup> Qu, F., Dou, L. L., Li, N. B., Luo, H. Q. (2013). Solvatofluorochromism of polyethyleneimine-encapsulated Ag nanoclusters and their concentration-dependent fluorescence. *Journal of Materials Chemistry C*, 1(25), 4008-4013
- <sup>109</sup> Ou, G., Zhao, J., Chen, P., Xiong, C., Dong, F., Li, B., Feng, X. (2018). Fabrication and application of noble metal nanoclusters as optical sensors for toxic metal ions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410(10), 2485-2498.
- <sup>110</sup> Viet, P. V., Phan, B. T., Thi, C. M., Hieu, L. V. (2017). Controlled formation of silver nanoparticles on TiO<sub>2</sub> nanotubes by photoreduction method. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(2), 1497-1503.
- <sup>111</sup> Shang, L., Yang, L., Stockmar, F., Popescu, R., Trouillet, V., Bruns, M., Gerthsen, Dagmar, Nienhaus, G. U. (2012). Microwave-assisted rapid synthesis of luminescent gold nanoclusters for sensing Hg<sup>2+</sup> in living cells using fluorescence imaging. *Nanoscale*, 4(14), 4155-4160.
- <sup>112</sup> Wang, C., Wu, J., Jiang, K., Humphrey, M. G., Zhang, C. (2017). Stable Ag nanoclusters-based nano-sensors: Rapid sonochemical synthesis and detecting Pb<sup>2+</sup> in living cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238, 1136-1143.
- <sup>113</sup> Wen, Q. L., Peng, J., Liu, A. Y., Hu, Y. L., Wang, J., Ling, J., Cao, Q. E. (2020). Fluorescent silver nanoclusters stabilized in guanine-enhanced DNA hybridization for recognizing different small biological molecules. *Journal of Luminescence*, 221, 117038.
- <sup>114</sup> Yuan, X., Tay, Y., Dou, X., Luo, Z., Leong, D. T., Xie, J. (2013). Glutathione-protected silver nanoclusters as cysteine-selective fluorometric and colorimetric probe. *Analytical chemistry*, 85(3), 1913-1919.
- <sup>115</sup> 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 advances*, 4(105), 60581-60596.
- <sup>116</sup> Qu, F., Li, N. B., Luo, H. Q. (2013). Highly sensitive fluorescent and colorimetric pH sensor based on polyethylenimine-capped silver nanoclusters. *Langmuir*, 29(4), 1199-1205.
- <sup>117</sup> Zhang, X., Chen, F., Song, X., He, P., Zhang, S. (2018). Proximity ligation detection of lectin Concanavalin A and fluorescence imaging cancer cells using carbohydrate functionalized DNA-silver nanocluster probes. *Biosensors and Bioelectronics*, 104, 27-31.
- <sup>118</sup> Sharma, J., Yeh, H. C., Yoo, H., Werner, J. H., Martinez, J. S. (2011). Silver nanocluster aptamers: in situ generation of intrinsically fluorescent recognition ligands for protein detection. *Chemical Communications*, 47(8), 2294-2296.
- <sup>119</sup> Wu, Y., Wang, B., Wang, K., Yan, P. (2018). Identification of proteins and bacteria based on a metal ion-gold nanocluster sensor array. *Analytical Methods*, 10(32), 3939-3944.
- <sup>120</sup> Xia, X., Long, Y., Wang, J. (2013). Glucose oxidase-functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose. *Analytica chimica acta*, 772, 81-86

- <sup>121</sup> Tanaka, S. I., Aoki, K., Muratsugu, A., Ishitobi, H., Jin, T., Inouye, Y. (2013). Synthesis of green-emitting Pt 8 nanoclusters for biomedical imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and mild reduction. *Optical Materials Express*, 3(2), 157-165.
- <sup>122</sup> Roy, S., Baral, A., Banerjee, A. (2014). Tuning of silver cluster emission from blue to red using a bio-active peptide in water. *ACS applied materials & interfaces*, 6(6), 4050-4056.
- <sup>123</sup> Jin, J. C., Wu, X. J., Xu, J., Wang, B. B., Jiang, F. L., Liu, Y. (2017). Ultrasmall silver nanoclusters: Highly efficient antibacterial activity and their mechanisms. *Biomaterials Science*, 5(2), 247-257.
- <sup>124</sup> Yang, L., Shang, L., Nienhaus, G. U. (2013). Mechanistic aspects of fluorescent gold nanocluster internalization by live HeLa cells. *Nanoscale*, 5(4), 1537-1543.
- <sup>125</sup> Yuan, X., Luo, Z., Zhang, Q., Zhang, X., Zheng, Y., Lee, J. Y., Xie, J. (2011). Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer. *Acs Nano*, 5(11), 8800-8808.
- <sup>126</sup> Zhang, L., Wang, E. (2014). Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9(1), 132-157
- <sup>127</sup> Yu, H., Rao, B., Jiang, W., Yang, S., Zhu, M. (2019). The photoluminescent metal nanoclusters with atomic precision. *Coordination Chemistry Reviews*, 378, 595-617.
- <sup>128</sup> Zhang, Y., Li, M., Niu, Q., Gao, P., Zhang, G., Dong, C., Shuang, S. (2017). Gold nanoclusters as fluorescent sensors for selective and sensitive hydrogen sulfide detection. *Talanta*, 171, 143-151.
- <sup>129</sup> Alonso, M. C., Trapiella-Alfonso, L., Fernández, J. M. C., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2016). Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 1055-1061.
- <sup>130</sup> Das, N. K., Ghosh, S., Priya, A., Datta, S., Mukherjee, S. (2015). Luminescent copper nanoclusters as a specific cell-imaging probe and a selective metal ion sensor. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(43), 24657-24664.
- <sup>131</sup> Lin, L., Hu, Y., Zhang, L., Huang, Y., Zhao, S. (2017). Photoluminescence light-up detection of zinc ion and imaging in living cells based on the aggregation induced emission enhancement of glutathione-capped copper nanoclusters. *Biosensors and Bioelectronics*, 94, 523-529.
- <sup>132</sup> Zhang, J. R., Zeng, A. L., Luo, H. Q., Li, N. B. (2016). Fluorescent silver nanoclusters for ultrasensitive determination of chromium (VI) in aqueous solution. *Journal of hazardous materials*, 304, 66-72.
- <sup>133</sup> Peng, Y., Wang, P., Luo, L., Liu, L., Wang, F. (2018). Green synthesis of fluorescent palladium nanoclusters. *Materials*, 11(2), 191
- <sup>134</sup> Lores-Padín, A., Cruz-Alonso, M., González-Iglesias, H., Fernández, B., Pereiro, R. (2019). Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay. *Microchimica Acta*, 186(11), 1-10.
- <sup>135</sup> Lores-Padín, A., Menero-Valdés, P., Fernández, B., Pereiro, R. (2020). Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the determination of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1128, 251-268.
- <sup>136</sup> Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., Medintz, I. L. (2013). Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical reviews*, 113(3), 1904-2074.

- 
- <sup>137</sup> Cruz-Alonso, M., Trapiella-Alfonso, L., Fernández, J.M.C., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2016). *Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: Application to human serum immunoglobulin E determination*. *Biosensors and Bioelectronics*, *77*, 1055-1061.
- <sup>138</sup> Lou, X., Zhang, G., Herrera, I., Kinach, R., Ornatsky, O., Baranov, V., Nitz, M., Winnik, M. A. (2007). Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(32), 6111-6114
- <sup>139</sup> Nain, A., Tseng, Y. T., Lin, Y. S., Wei, S. C., Mandal, R. P., Unnikrishnan, B., Huang, C.C., Tseng, F. G., Chang, H. T. (2020). Tuning the photoluminescence of metal nanoclusters for selective detection of multiple heavy metal ions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *321*, 128539.
- <sup>140</sup> Huang, Y., Zhang, H., Xu, X., Zhou, J., Lu, F., Zhang, Z., ... & Luo, J. (2018). Fast synthesis of porous copper nanoclusters for fluorescence detection of iron ions in water samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *202*, 65-69.
- <sup>141</sup> hong, K., Hao, C., Liu, H., Yang, H., & Sun, R. (2021). Synthesis of dual-emissive ratiometric probe of BSA-Au NCs and BSA-Cu NCs and their sensitive and selective detection of copper and mercury ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *408*, 113100.
- <sup>142</sup> Zhao, Q., Chen, S., Zhang, L., Huang, H., Zeng, Y., Liu, F. (2014). Multiplex sensor for detection of different metal ions based on on-off of fluorescent gold nanoclusters. *Analytica Chimica Acta*, *852*, 236-243
- <sup>143</sup> Jin, L., Zhang, Z., Tang, A., Li, C., Shen, Y. (2016). Synthesis of yeast extract-stabilized Cu nanoclusters for sensitive fluorescent detection of sulfide ions in water. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 108-113.
- <sup>144</sup> Liu, Y. (2018). Application of Gold-Nanocluster-Based Fluorescent Sensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Cyanide in Water. In *Multifunctional Nanoprobess* (pp. 51-64). Springer, Singapore.
- <sup>145</sup> Zhou, D. L., Huang, H., Wang, Y. (2017). Sensitive and selective detection of nitrite ions with highly fluorescent glutathione-stabilized copper nanoclusters. *Analytical Methods*, *9*(38), 5668-5673.
- <sup>146</sup> Zhang, X., Jin, Y., Li, B. (2018). Copper nanocluster as a fluorescent indicator for label-free and sensitive detection of DNA hybridization assisted with a cascade isothermal exponential amplification reaction. *New Journal of Chemistry*, *42*(7), 5178-5184.
- <sup>147</sup> Sahoo, A. K., Sailapu, S. K., Dutta, D., Banerjee, S., Ghosh, S. S., Chattopadhyay, A. (2018). DNA-templated single thermal cycle based synthesis of highly luminescent Au nanoclusters for probing gene expression. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(2), 2142-2151.
- <sup>148</sup> Hu, X. L., Wu, X. M., Fang, X., Li, Z. J., Wang, G. L. (2016). Switchable fluorescence of gold nanoclusters for probing the activity of alkaline phosphatase and its application in immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, *77*, 666-672.
- <sup>149</sup> Yang, D., Meng, H., Tu, Y., Yan, J. (2017). A nanocluster-based fluorescent sensor for sensitive hemoglobin detection. *Talanta*, *170*, 233-237
- <sup>150</sup> Nair, L. V., Nair, R. V., Shenoy, S. J., Thekkuveetil, A., Jayasree, R. S. (2017). Blood brain barrier permeable gold nanocluster for targeted brain imaging and therapy: an in vitro and in vivo study. *Journal of Materials Chemistry B*, *5*(42), 8314-8321.

- <sup>151</sup> Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International journal of nanomedicine*, 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
- <sup>152</sup> Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Advanced healthcare materials*, 7(13), 1701503.
- <sup>153</sup> Shitomi, K., Miyaji, H., Miyata, S., Sugaya, T., Ushijima, N., Akasaka, T., Kawasaki, H. (2020). Photodynamic inactivation of oral bacteria with silver nanoclusters/rose bengal nanocomposite. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101647.
- <sup>154</sup> Dong, P., Li, J. H., Xu, S. P., Wu, X. J., Xiang, X., Yang, Q. Q., Jin, J. C., Liu, Y., Jiang, F. L. (2016). Mitochondrial dysfunction induced by ultra-small silver nanoclusters with a distinct toxic mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 139-148.
- <sup>155</sup> Dhass, C. (2007). Capítulo 1: Basics of Mass Spectrometry. *Fundamentals of contemporary Mass Spectrometry*, Wiley Interscience, New Jersey, 3-13.
- <sup>156</sup> Thomas, R. (2013). “Capítulo 4: Plasma source” *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC Press, Florida, 26-30.
- <sup>157</sup> Vanhaecke, F., Degryse, P. (Eds.). (2012). Capítulo 2: Single-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Isotopic analysis: fundamentals and applications using ICP-MS*. John Wiley & Sons.
- <sup>158</sup> Todolí, J. L., & Mermet, J. M. (2006). Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(3), 239-283.
- <sup>159</sup> Grotti, M., Ardini, F., & Todolí, J. L. (2013). Total introduction of microsamples in inductively coupled plasma mass spectrometry by high-temperature evaporation chamber with a sheathing gas stream. *Analytica Chimica Acta*, 767, 14-20.
- <sup>160</sup> Thomas, R. (2013). “Capítulo 5: Interface Region” *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC Press, Florida, 26-30.
- <sup>161</sup> Thomas, R. (2013). “Capítulo 7: Mass Analyzers: Quadrupole Technology”. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC Press, Florida, 26-30.
- <sup>162</sup> [https://www.shimadzu.co.kr/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.co.kr/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html) (Consultada 27.02.2022)
- <sup>163</sup> Otles, S. (2016). Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis. In *Handbook of Food Analysis Instruments* (pp. 213-244). CRC Press.
- <sup>164</sup> Mamyryn, B. A. (2001). Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, 206(3), 251-266.
- <sup>165</sup> Johansson, P. (2013). Characterization of protein surface interactions: collagen and osteocalcin.
- <sup>166</sup> Balaram, V. (2021). Strategies to overcome interferences in elemental and isotopic geochemical analysis by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry: A critical evaluation of the recent developments. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(10), e9065.
- <sup>167</sup> Hoffmann, E., Stroobant, V. (Eds.). (2007). “Capítulo 3: Detectors and computers”. *Mass Spectrometry: Principles and applications*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 15-79.
- <sup>168</sup> Bocca, B., Battistini, B., Petrucci, F. (2020). Silver and gold nanoparticles characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALS-UV-ICP-MS in human samples used for biomonitoring. *Talanta*, 220, 121404.

- <sup>169</sup> Bouzas-Ramos, D., García-Alonso, J. I., Costa-Fernández, J. M., Ruiz Encinar, J. (2019). Quantitative Assessment of Individual Populations Present in Nanoparticle–Antibody Conjugate Mixtures Using AF4-ICP-MS/MS. *Analytical chemistry*, *91*(5), 3567-3574.
- <sup>170</sup> Cid-Barrio, L., Calderón-Celis, F., Costa-Fernández, J. M., Encinar, J. R. (2020). Assessment of the potential and limitations of elemental mass spectrometry in life sciences for absolute quantification of biomolecules using generic standards. *Analytical Chemistry*, *92*(19), 13500-13508.
- <sup>171</sup> Calderón-Celis, F., Cid-Barrio, L., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A., Calvete, J. J. (2017). Absolute venomomics: Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *Journal of proteomics*, *164*, 33-42.
- <sup>172</sup> Theiner, S., Loehr, K., Koellensperger, G., Mueller, L., & Jakubowski, N. (2020). Single-cell analysis by use of ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *35*(9), 1784-1813.
- <sup>173</sup> Corte-Rodriguez, M., Blanco-Gonzalez, E., Bettmer, J., Montes-Bayon, M. (2019). Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection. *Analytical chemistry*, *91*(24), 15532-15538.
- <sup>174</sup> Lores-Padín, A., Mavrikakis, E., Fernández, B., García, M., González-Iglesias, H., Pereiro, R., & Pergantis, S. A. (2022). 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*, 339701.
- <sup>175</sup> Amais, R. S., Donati, G. L., Arruda, M. A. Z. (2020). ICP-MS and trace element analysis as tools for better understanding medical conditions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *133*, 116094.
- <sup>176</sup> Zoroddu, M. A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of inorganic biochemistry*, *195*, 120-129.
- <sup>177</sup> Weekley, C. M., He, C. (2017). Developing drugs targeting transition metal homeostasis. *Current opinion in chemical biology*, *37*, 26-32.
- <sup>178</sup> Laur, N., Kinscherf, R., Pomytkin, K., Kaiser, L., Knes, O., & Deigner, H. P. (2020). ICP-MS trace element analysis in serum and whole blood. *PloS one*, *15*(5), e0233357.
- <sup>179</sup> de Oliveira, M., Gianeti, T. M. R., da Rocha, F. C. G., Lisboa-Filho, P. N., & Piacenti-Silva, M. (2020). A preliminary study of the concentration of metallic elements in the blood of patients with multiple sclerosis as measured by ICP-MS. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-8.
- <sup>180</sup> Meyer, S., Markova, M., Pohl, G., Marschall, T. A., Pivovarova, O., Pfeiffer, A. F., & Schwerdtle, T. (2018). Development, validation and application of an ICP-MS/MS method to quantify minerals and (ultra-) trace elements in human serum. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *49*, 157-163.
- <sup>181</sup> J.I., García Alonso, P. Rodríguez-González. Isotope dilution mass spectrometry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2013. Capítulo 1: Introduction to Isotope Dilution Mass Spectrometry.
- <sup>182</sup> Vanhaecke, F., & Degryse, P. (Eds.). (2012). *Isotopic analysis: fundamentals and applications using ICP-MS*. John Wiley & Sons.
- <sup>183</sup> Xie, L. W., Evans, N. J., Yang, Y. H., Huang, C., & Yang, J. H. (2018). U–Th–Pb geochronology and simultaneous analysis of multiple isotope systems in geological

---

samples by LA-MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(10), 1600-1615.

<sup>184</sup> Li, X., & Han, G. (2021). One-step chromatographic purification of K, Ca, and Sr from geological samples for high precision stable and radiogenic isotope analysis by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(3), 676-684.

<sup>185</sup> Penanes, P. A., Moldovan, M., Mederos, A., Martín-Ramos, P., & Alonso, J. I. G. (2021). Direct determination of Pb isotope ratios in archaeological materials by coupling liquid chromatography to multicollector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(8), 1694-1703.

<sup>186</sup> Gao, Y., Xu, M., Sturgeon, R. E., Mester, Z., Shi, Z., Galea, R., ... & Yang, L. (2015). Metal ion-assisted photochemical vapor generation for the determination of lead in environmental samples by multicollector-ICPMS. *Analytical chemistry*, 87(8), 4495-4502.

<sup>187</sup> A Morgan, J. L., Gordon, G. W., Arrua, R. C., Skulan, J. L., Anbar, A. D., & Bullen, T. D. (2011). High-precision measurement of variations in calcium isotope ratios in urine by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83(18), 6956-6962.

<sup>188</sup> Sauzéat, L., Bernard, E., Perret-Liaudet, A., Quadrio, I., Vighetto, A., Krolak-Salmon, P., Broussolle, E., Leblanc, P., & Balter, V. (2018). Isotopic Evidence for Disrupted Copper Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *iScience*, 6, 264–271.

<sup>189</sup> Balter, V., da Costa, A. N., Bondanese, V. P., Jaouen, K., Lamboux, A., Sangrajang, S., ... & Hainaut, P. (2015). Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4), 982-985.

<sup>190</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Santens, P., Vanhaecke, F. (2020). Multicollector Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry with  $10^{13} \Omega$  Faraday Cup Amplifiers for Ultrasensitive Mg Isotopic Analysis of Cerebrospinal Fluid Microsamples. *Analytical chemistry*, 92(24), 15975–15981.

<sup>191</sup> Ma, Q., Yang, M., Zhao, H., Evans, N. J., Chu, Z. Y., Xie, L. W., Huang, C., Zhao, Z.D., Yang, Y. H. (2019). Accurate and precise determination of Lu and Hf contents and Hf isotopic composition at the sub-nanogram level in geological samples using MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(6), 1256-1262.

<sup>192</sup> Costas-Rodríguez, M., Delanghe, J., Vanhaecke, F. (2016). High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine: natural isotope ratio variations as potential diagnostic and/or prognostic markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 182-193

<sup>193</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Vandenbroucke, R. E., & Vanhaecke, F. (2020). High-precision isotopic analysis of Mg and Ca in biological samples using multi-collector ICP-mass spectrometry after their sequential chromatographic isolation—application to the characterization of the body distribution of Mg and Ca isotopes in mice. *Analytica Chimica Acta*, 1130, 137-145.

<sup>194</sup> Yang, L. (2009). Accurate and precise determination of isotopic ratios by MC-ICP-MS: A review. *Mass spectrometry reviews*, 28(6), 990-1011.

<sup>195</sup> Coath, C. D., Elliott, T., & Hin, R. C. (2017). Double-spike inversion for three-isotope systems. *Chemical Geology*, 451, 78-89.

- <sup>196</sup> Feldmann, I., Tittes, W., Jakubowski, N., Stuewer, D. y Giessmann, U. (1994). Performance Characteristics of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry With High Mass Resolution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9, 1007-1014.
- <sup>197</sup> Vanhaecke, F., Degryse, P. (Eds.). (2012). Capítulo 5: Correction of Instrumental Mass Discrimination for Isotope Ratio Determination with Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Isotopic analysis: fundamentals and applications using ICP-MS*. John Wiley & Sons.
- <sup>198</sup> Sussulini, A., Becker, J. S., Becker, J. S. (2017). Laser ablation ICP-MS: Application in biomedical research. *Mass spectrometry reviews*, 36(1), 47-57.
- <sup>199</sup> Becker, J. S., Matusch, A., Wu, B. (2014). Bioimaging mass spectrometry of trace elements—recent advance and applications of LA-ICP-MS: a review. *Analytica chimica acta*, 835, 1-18.
- <sup>200</sup> Fernández, B., Claverie, F., Pecheyran, C., Donard, O.F.X. (2007). *Direct Analysis of Solid Samples by fs-LA-ICP-MS*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 10, 951-966.
- <sup>201</sup> Feng, L., Wang, J., Li, H., Luo, X., & Li, J. (2017). A novel absolute quantitative imaging strategy of iron, copper and zinc in brain tissues by Isotope Dilution Laser Ablation ICP-MS. *Analytica Chimica Acta*, 984, 66-75.
- <sup>202</sup> Urgast, D. S., Hill, S., Kwun, I. S., Beattie, J. H., Goenaga-Infante, H., & Feldmann, J. (2012). Zinc isotope ratio imaging of rat brain thin sections from stable isotope tracer studies by LA-MC-ICP-MS. *Metallomics*, 4(10), 1057-1063.
- <sup>203</sup> Reifschneider, O., Schütz, C. L., Brochhausen, C., Hampel, G., Ross, T., Sperling, M., & Karst, U. (2015). Quantitative bioimaging of p-boronophenylalanine in thin liver tissue sections as a tool for treatment planning in boron neutron capture therapy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2365-2371.
- <sup>204</sup> Lugli, F., Cipriani, A., Arnaud, J., Arzarello, M., Peretto, C., & Benazzi, S. (2017). Suspected limited mobility of a Middle Pleistocene woman from Southern Italy: strontium isotopes of a human deciduous tooth. *Scientific reports*, 7(1), 1-8.
- <sup>205</sup> Crone, B., Schlatt, L., Nadar, R. A., van Dijk, N. W. M., Margiotta, N., Sperling, M., ... & Karst, U. (2019). Quantitative imaging of platinum-based antitumor complexes in bone tissue samples using LA-ICP-MS. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 98-102.
- <sup>206</sup> Mezzaroba, L., Alfieri, D. F., Simão, A. N. C., & Reiche, E. M. V. (2019). The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, 74, 230-241.
- <sup>207</sup> Sabine Becker, J., Matusch, A., Palm, C., Salber, D., Morton, K. A., Susanne Becker, J. (2010). Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics*, 2(2), 104-111.
- <sup>208</sup> Liu, J., Zheng, L., Wei, X., Wang, B., Chen, H., Chen, M., Wang, M., Feng, W., Wang, J. (2022). Quantitative imaging of trace elements in brain sections of Alzheimer's disease mice with laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 172, 106912
- <sup>209</sup> Rodríguez-Menéndez, S., Fernández, B., García, M., Álvarez, L., Fernández, M. L., Sanz-Medel, A., Coca-Prados, M., Pereiro, R., González-Iglesias, H. (2018). Quantitative study of zinc and metallothioneins in the human retina and RPE cells by mass spectrometry-based methodologies. *Talanta*, 178, 222-230.

- <sup>210</sup> Lobo, L., Pereiro, R., Fernández, B. (2018). Opportunities and challenges of isotopic analysis by laser ablation ICP-MS in biological studies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *105*, 380-390.
- <sup>211</sup> Lin, J., Liu, Y., Yang, Y., Hu, Z. (2016). Calibration and correction of LA-ICP-MS and LA-MC-ICP-MS analyses for element contents and isotopic ratios. *Solid Earth Sciences*, *1*(1), 5-27.
- <sup>212</sup> Resano, M., Aramendía, M., Rello, L., Calvo, M. L., Bérail, S., Pécheyran, C. (2013). Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *28*(1), 98-106.
- <sup>213</sup> García-Poyo, M. C., Bérail, S., Ronzani, A. L., Rello, L., García-González, E., Lelièvre, B., Cales, P., Nakadi, F. V., Aramendia, M., Resano, M., Pecheyran, C. (2021). Laser ablation of microdroplets for copper isotopic analysis via MC-ICP-MS. Analysis of serum microsamples for the diagnosis and follow-up treatment of Wilson's disease. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *36*(5), 968-980
- <sup>214</sup> Sabine Becker, J., Matusch, A., Palm, C., Salber, D., Morton, K. A., Susanne Becker, J. (2010). Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics*, *2*(2), 104-111.
- <sup>215</sup> Cid-Barrio, L., Calderón-Celis, F., Abásolo-Linares, P., Fernández-Sánchez, M. L., Costa-Fernández, J. M., Encinar, J. R., Sanz-Medel, A. (2018). Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *104*, 148-159.
- <sup>216</sup> Waentig, L., Jakubowski, N., Hayen, H., & Roos, P. H. (2011). Iodination of proteins, proteomes and antibodies with potassium triiodide for LA-ICP-MS based proteomic analyses. *Journal of analytical atomic spectrometry*, *26*(8), 1610-1618.
- ISO 690
- <sup>217</sup> de Bang, T. C., & Husted, S. (2015). Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *72*, 45-52.
- <sup>218</sup> Seuma, J., Bunch, J., Cox, A., McLeod, C., Bell, J., Murray, C. (2008). Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics*, *8*(18), 3775-3784.
- <sup>219</sup> Boyraz, B., Saatz, J., Pompös, I. M., Gad, M., Dervede, J., Maier, A. K. B., Moscovitz, O., Seeberger, P. H., Traub, H., Tauber, R. (2022). Imaging Keratan Sulfate in Ocular Tissue Sections by Immunofluorescence Microscopy and LA-ICP-MS. *ACS Applied Bio Materials*.
- <sup>220</sup> Giesen, C., Mairinger, T., Khoury, L., Waentig, L., Jakubowski, N., Panne, U. (2011). Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical chemistry*, *83*(21), 8177-8183
- <sup>221</sup> Gao, X., Pan, H., Han, Y., Feng, L., Xiong, J., Luo, S., Li, H. (2021). Quantitative imaging of amyloid beta peptide (A $\beta$ ) in Alzheimer's brain tissue by laser ablation ICP-MS using gold nanoparticles as labels. *Analytica Chimica Acta*, *1148*, 238197.
- <sup>222</sup> Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Álvarez, L., González-Iglesias, H., Traub, H., Jakubowski, N., Pereiro, R. (2018). Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by laser ablation-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags. *Microchimica Acta*, *185*(1), 1-9.

<sup>223</sup> Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Garcia, M., González-Iglesias, H., Pereiro, R. (2018). Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Analytical chemistry*, 90(20), 12145-12151.

# **OBJETIVOS**

# **OBJECTIVES**

## Objetivos

Dada la existencia de una relación entre la dishomeostasis de metales, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación, el envejecimiento y la muerte celular en lo que a patologías neurodegenerativas se refiere y considerando la necesidad de disponer de enfoques analíticos avanzados tanto para la identificación de biomarcadores (proteínas, metabolitos, elementos esenciales) que permitan una detección temprana de estas patologías o una mayor comprensión de los procesos biológicos y bioquímicos subyacentes a la progresión de estas enfermedades el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido: el desarrollo de **nuevas metodologías analíticas basadas en espectrometría de masas elemental para el estudio de elementos esenciales y (metalo)-proteínas implicados en enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad, en diferentes tipos de muestras de origen biológico**. Dentro de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1. Análisis dirigido en lágrimas de pacientes con degeneración macular asociada a la edad para el estudio del estado homeostático de elementos esenciales y (metalo)-proteínas.** Se desarrollará una metodología analítica que permita un análisis multiparamétrico dirigido para la cuantificación de proteínas [factor H de complemento (CFH), clusterina (CLU), proteína precursora amiloidea (APP), S100A6, lactoferrina (LF), metalotioneína 1A (MT1A)] y elementos (Na, Mg, P, Ca, Fe, Cu, Zn) en muestras de fluido lagrimal de pacientes con DMAE y sujetos control, mediante espectrofotometría e ICP-MS.
- 2. Síntesis de nanoclústeres de plata (AgNCs), bioconjugación y análisis en suero mediante ICP-MS para la detección de proteínas relacionadas con la DMAE.** Partiendo de la proteína CFH, componente constitutivo de las drusas relacionada con una mayor predisposición al desarrollo de la DMAE, se llevará a cabo el desarrollo de un fluoroinmunoensayo para la cuantificación de CFH en muestras de suero. Para ello, se partirá AgNCs cuya síntesis, purificación y caracterización,

será previamente optimizada junto con los parámetros para su bioconjugación a anticuerpos anti-CFH.

- 3. Análisis de la distribución de proteínas en tejidos oculares mediante el empleo de AgNCs enriquecidos isotópicamente y detección multimodal por microscopia de fluorescencia y LA-ICP-MS.** Se analizarán dos proteínas con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, la SOD y las MTs, en secciones de tejidos oculares mediante LA-ICP-MS y fluorescencia. Para ello, se pondrá a punto la síntesis de AgNCs de abundancia natural y enriquecidos en el isótopo  $^{109}\text{Ag}$ . Los AgNCs bioconjugados con anticuerpos anti-SOD y anti-MTs serán empleados posteriormente como marcas biológicas para la detección espacial las proteínas objeto de estudio.
- 4. Desarrollo de un método de separación cromatográfico de Ca rápido y para pequeños volúmenes de muestra para estudiar posibles alteraciones en la composición isotópica de este elemento asociadas al glaucoma.** Concretamente, la muestra objeto de estudio fue el humor acuoso y teniendo en cuenta la limitación en cuanto a la disponibilidad de muestras disponibles empleó suero sanguíneo (mayor complejidad de matriz) como muestras modelo para la optimización del protocolo. A continuación, la metodología desarrollada se aplicó a muestras de humor acuoso de pacientes de glaucoma y controles para posterior análisis isotópico de Ca mediante MC-ICP-MS.

## Objetives

Considering that I) metal dyshomeostasis is associated to mitochondrial dysfunction, inflammation, aging and apoptosis when dealing with neurodegenerative disorders and II) the development of advanced analytical approaches based on mass spectrometry techniques for the identification of potential biomarkers (proteins, metabolic, essential elements) allowing for an early diagnosis of these pathologies and/or a better understanding of the biological and biochemical processes underlying the progression of these diseases is mandatory, the main goal of this Doctoral Thesis has been **the development of new analytical methodologies based on elemental mass spectrometry for the study of essential elements and (metallo)-proteins involved in neurodegenerative eye diseases associated with age, in different types of samples of biological origin**. Such aim has been pursued according to the following partial objectives:

1. **Targeted analysis of tears from patients with age-related macular degeneration to study the homeostatic state of essential elements and (metallo)-proteins.** An analytical methodology allowing for multiparametric quantitative analysis of proteins: complement factor H (CFH), clusterin (CLU), amyloid precursor protein (APP), S100A6, lactoferrin (LF), metallothionein 1A (MT1A) and elements: Na, Mg, P, Ca, Fe, Cu, Zn, in tear fluid from patients of AMD and control subjects has been developed by means of spectrophotometry and ICP-MS.
2. **Synthesis of silver nanoclusters (AgNCs), bioconjugation and serum analysis by ICP-MS for the detection of proteins related to AMD.** CFH, a protein related to the presence of drusen and also related to a greater predisposition to suffer from AMD will be selected as model protein for the development of a quantitative fluoroimmunoassay in serum samples. For such aim, first synthesis of the AgNCs, their purification and characterization will be optimized as well as the parameters needed for their bioconjugation to anti-CFH antibodies.

3. **Protein distribution in ocular tissues using isotopically enriched AgNCs and multimodal detection by fluorescence microscopy and LA-ICP-MS.** Two proteins with antioxidant and anti-inflammatory properties, SOD and MTs, will be analyzed in ocular tissue sections by LA-ICP-MS and fluorescence. For such purpose, the synthesis of AgNCs of natural abundance and enriched in the  $^{109}\text{Ag}$  isotope will be developed. Then, the AgNCs bioconjugated with anti-SOD and anti-MTs antibodies will be used as biological labels for the spatial detection of the target proteins.
  
4. **Development of a fast Ca isolation procedure intended for low sample biological fluids to study potential alterations in the isotopic composition of this element associated with glaucoma disorder.** Particularly, such procedure is thought for aqueous humor, but first and due to the lack of sample availability, optimization will be performed using serum as model sample (more complex biological fluid). Once optimized, the procedure will be applied to aqueous humor samples from glaucoma and control individuals for subsequent Ca isotopic analysis via MC-ICP-MS.

**EXPERIMENTAL**

## Instrumentación

En este apartado se recogen las características específicas de los distintos instrumentos utilizados en la realización de esta Tesis Doctoral.

### 1. ICP-MS de tipo Cuadrupolo

A lo largo del desarrollo de este trabajo se han utilizado tres modelos de ICP-MS de tipo cuadrupolo, modelo 7500ce, 7700x y 7900 de la casa comercial *Agilent Technologies* (Tokio, Japón). Estos tres modelos están provistos de celda de colisión-reacción de tipo octapolo para la eliminación de interferencias poliatómicas mediante su presurización con gases como He o H<sub>2</sub>.

Se han utilizado con nebulización convencional con el fin de determinar los niveles totales elementos en muestras en disolución. El nebulizador es de tipo Meinhard y una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott con un sistema de refrigeración (2-4 °C). Dispone de conos de extracción de Ni y el detector es un multiplicador de electrones secundarios, el cual puede trabajar en modo analógico o digital dependiendo de la intensidad de señal.

Cada día de medida se realiza la calibración del sistema con una disolución patrón multielemental Li, Y y Tl, de 1 ng·mL<sup>-1</sup> de concentración para la optimización de la sensibilidad del equipo, esto es, la máxima señal, y minimizando la generación de óxidos y los iones doblemente cargados.

### 2. ICP-MS de Doble Enfoque

Se ha utilizado un equipo ICP-MS de doble enfoque, de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Alemania) modelo Element 2. Este equipo de doble enfoque presenta una geometría *Nier-Johnson* inversa. Posee un nebulizador concéntrico convencional y una cámara de nebulización de *pyrex* sin refrigeración. La antorcha es

una sola pieza de cuarzo, con un inyector de 1 mm de diámetro interno. En el Element 2 el detector es un multiplicador de electrones secundarios, consiguiendo un rango lineal de nueve órdenes de magnitud.

Respecto a la resolución empleada en este equipo, se ha trabajado a baja ( $R=300$ ) y media resolución ( $R=4000$ ), dependiendo del elemento analizado. La calibración y optimización del instrumento se hace diariamente al igual que con los espectrómetros de masas de tipo cuadrupolo. En este caso, se utiliza una disolución patrón multielemental de Li, In y U con una concentración de  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Parámetros como el flujo de Ar o la posición de antorcha fueron modificados a fin de obtener la máxima sensibilidad de señal y una mínima formación de óxidos. Adicionalmente, para todos los elementos que se pretende analizar, se determina la ventana de masa (*mass offset*) empleando una disolución que contenga dichos analitos. La concentración empleada en este caso dependió de la abundancia del elemento a analizar (por ejemplo, para la ventana de masas de Ca, fue necesario introducir al menos  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mientras que la concentración requerida para el resto de los analitos fue entorno a  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )

### **3. ICP-MS de doble enfoque tipo multicolector**

Otro tipo de ICP-MS con analizador de doble enfoque utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral ha sido el multicolector Neptune (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany).

En este caso, la configuración del equipo presenta una geometría de Nier-Johnson directa. Al igual que el instrumento Element 2, este equipo también presenta la capacidad de hacer medidas en baja, media o pseudo-alta resolución. El modo de operación ha sido en media resolución. Esta geometría permite una detección multiisotópica simultánea y está equipado con 9 copas de Faraday conectadas a amplificadores de  $10^{11} \Omega$ . Cabe mencionar que la copa central se mantiene fija respecto a las otras ocho restantes.

Las muestras se introdujeron en el ICP con un nebulizador concéntrico PFA (caudal de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) y una cámara de pulverización de doble paso tipo Scott.

#### **4. Sistema de Ablación Láser**

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado el sistema de ablación láser LSX-213 de la casa comercial *Teledyne Cetac Technologies* (Omaha, Estados Unidos). Este sistema LA se ha acoplado al ICP-MS de doble enfoque Element 2 ya mencionado.

En este sistema LA se utiliza un láser de tipo Nd:YAG que emplea un láser pulsado de nanosegundos. La duración de los pulsos es menor a los 6 ns y la longitud de onda de la radiación láser es de 213 (UV lejano). La cámara de ablación comercial de este sistema fue sustituida por una cámara refrigerada de tipo Peltier que permite trabajar en condiciones de baja temperatura ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).<sup>1</sup> Mediante esta celda es posible controlar la temperatura a la que se encuentra sometida la muestra que se está analizando. De este modo, se asegura la integridad de los tejidos biológicos cuando están siendo analizados por LA-ICP-MS, así como disponer de una mejor resolución lateral al minimizarse los efectos térmicos de la ablación.

Aunque el He fue el gas portador seleccionado para transportar el aerosol generado por el láser fuera de la cámara de ablación, se usó un caudal adicional de Ar para transportar las partículas al ICP-MS (los gases He y Ar se mezclaron usando una conexión interna ubicada después de la cámara de ablación).

#### **5. FIA (Análisis por inyección en flujo)**

Permite introducir pequeños volúmenes de muestra a través de un flujo transportador conectado directamente a la entrada del nebulizador. Entre las ventajas que presenta este sistema de introducción de muestra están:

- Se requiere manejar pequeños volúmenes de muestra o reactivos, por lo que se evitan posibles contaminaciones
- Es posible realizar procedimientos *online* de forma automatizada, como diluciones o reacciones

El sistema FIA-ICP-MS, en su configuración más sencilla, consta de una bomba peristáltica y una válvula de inyección de seis vías de tipo *Rheodyne*, que lleva conectado un *loop* de carga de muestra de volumen definido. La válvula tiene dos posiciones, según se requiera cargar la muestra en el loop de inyección o inyectarla al flujo transportador. La señal obtenida es transitoria y se representa frente al tiempo. <sup>2</sup>

## 6. Fluorímetro

Las medidas de fluorescencia se han llevado a cabo con un fluorímetro modelo LS50B de la casa comercial *Perkin Elmer* (Massachusetts, Estados Unidos). La fuente de radiación consta de una lámpara de descarga de Xe, con pulsos de 8  $\mu$ s y energía de 20 kW. Existen rendijas a la entrada y salida del compartimento de la muestra que pueden ser modificadas: en el caso de la rendija de excitación de 2,5 a 15,0 nm, y en el caso de la emisión de 2,5 a 20 nm, con incrementos de 0,1 nm. Dispone de un fotomultiplicador como detector y la velocidad de barrido se puede seleccionar de 10 a 1500 nm/min con incrementos de 1 nm. Presenta alta reproducibilidad y la exactitud de la longitud de onda es de  $\pm 0,5$  nm y  $\pm 1$  nm, respectivamente.

## 7. Microscopio Láser Confocal

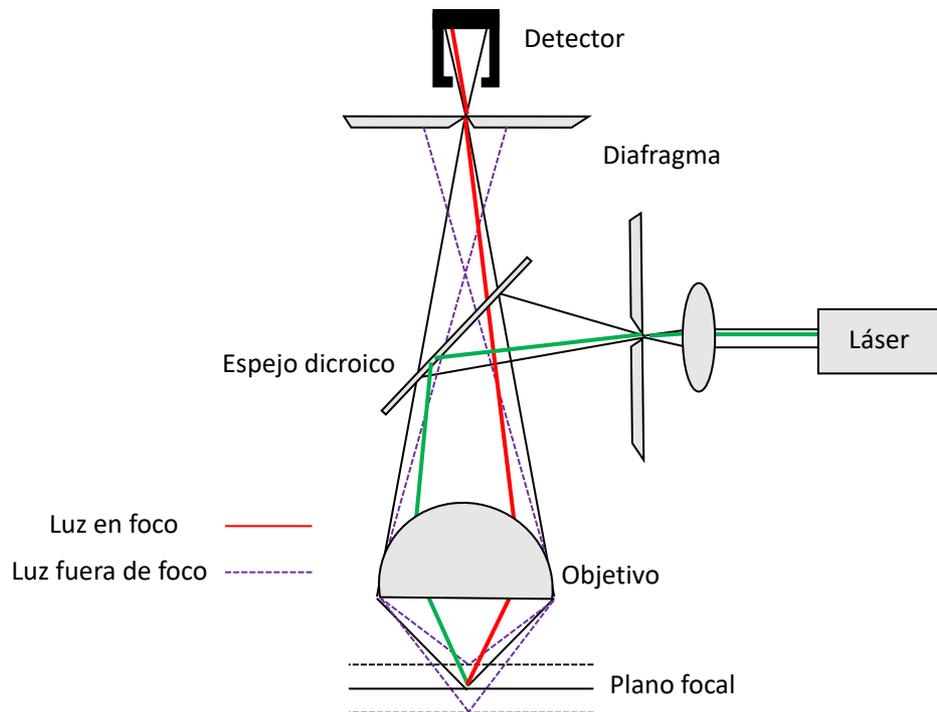


Figura 25. Diagrama de funcionamiento de un equipo de microscopía confocal.

Las funciones principales de un microscopio confocal son producir una fuente de luz focalizada y rechazar la luz desenfocada, lo que ofrece la posibilidad de obtener imágenes profundas de los tejidos con alta resolución y realizar cortes ópticos para reconstrucciones 3D de las muestras. El principio básico de la microscopía confocal es que la iluminación y la óptica de detección se enfocan en el mismo punto de difracción limitada, que se mueve sobre la muestra para construir la imagen completa en el detector. Si bien todo el campo de visión se ilumina durante la imagen confocal, todo lo que esté fuera del plano focal contribuye poco a la imagen, lo que reduce la neblina observada en la microscopía de luz estándar con imágenes gruesas y oscuras.<sup>3</sup>

Entre la fuente de luz y el objetivo y entre el objetivo y el detector existen dos diafragmas (*pinhole*). Parte de la luz atraviesa el primer diafragma y es reflejada por un espejo dicroico y mediante la lente del objetivo, será enfocada hacia un punto de la muestra. La fluorescencia o luz reflejada emitida, recorre a la inversa el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicroico y es enfocada a un detector. El segundo

diafragma se encuentra colocado por delante del detector y se encarga de eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco. Ambos diafragmas deberán estar alineados, de forma que solo llegue al detector la luz que proceda del plano focal. Además, lleva incorporado un sistema de barrido y de formación de imágenes para recopilar toda la información procedente de la muestra. La señal emitida procedente de la muestra es procesada en un tubo fotomultiplicador transformándose en una señal de vídeo que se digitaliza y registra en un ordenador.<sup>4</sup>

El microscopio láser confocal utilizado en esta Tesis Doctoral es el modelo TCS-SP8X (*Leica*) con un diodo láser de 450 nm y un láser blanco con libre selección de líneas de excitación en el rango de 470 a 670 nm. Es un microscopio invertido para observaciones con luz transmitida y fluorescencia con luz incidente. Dispone de tres tipos de objetivos: 10x (seco), 20x (seco), 20x (inmersión en aceite), 40x (inmersión en aceite), 40x (inmersión en agua) y 63x (inmersión en aceite). Posee cuatro detectores internos: 2 fotomultiplicadores y 2 detectores híbridos (HyD) de alta sensibilidad y un detector externo para iluminación transmitida. También presenta una platina motorizada en xy de alta precisión para realización de mosaicos de imágenes y una platina galvanométrica de alta velocidad y precisión para movimiento en z (enfoco).<sup>5</sup>

## **8. Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM)**

Para la caracterización de los nanoclústeres metálicos sintetizados a lo largo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado el microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM). Este permite adquirir información acerca de la estructura de una muestra, tanto amorfa como cristalina. De este modo, se puede obtener imágenes estructurales de una muestra a nivel atómico con una resolución de 0,5 Å.

El modelo utilizado en este trabajo ha sido JEM-2100 de la casa comercial *JEOL* (Tokio, Japón). Tiene 200 kV de aceleración y está equipado con un cañón de electrones de emisión de campo, para la adquisición de haces de electrones muy intensos 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 también de un microanalizador por energía de rayos X dispersados (EDX) para la detección y cuantificación de los elementos presentes en la muestra.

## **9. Lectores de microplacas con detección espectrofotométrica**

Para medir la absorbancia de los distintos inmunoensayos ELISA desarrollados se utilizaron dos lectores de microplacas: modelo ELX800 (*BioTek*, Estados Unidos) y un PerkinElmer 2030 Multilabel Reader VICTORTM X5 (Waltham, MA, USA). El rango de longitud de onda es de 400 nm a 750 nm y 340 nm a 1000 nm, respectivamente.

## **10. Espectrofluorómetro FS5**

El rendimiento cuántico (QY) de los nanoclústeres metálicos de plata sintetizados en el desarrollo de este trabajo se determinó utilizando un espectrofluorómetro FS5 (Edinburgh Instruments, Livingston, Reino Unido). Para tal fin, se utilizó una esfera integradora compuesta por un material fluoropolimérico de alta reflectancia. Esta

propiedad hace que toda la luz que entra en el interior de la esfera tenga solo dos caminos posibles: absorción por AgNCs o recogida por el detector. El número de fotones absorbidos por AgNCs (por unidad de tiempo) se determinó como la diferencia entre el número de fotones emitidos por la lámpara y el número de fotones que llegan al detector. Los fotones emitidos fueron recogidos por la esfera integradora que los enfoca todos cerca del detector para su cuantificación. Se utilizó agua ultrapura para realizar una corrección espectral de los valores obtenidos. La solución de AgNCs se midió en cubetas de cuarzo estándar (10 mm x 10 mm) con tapón de PTFE para evitar el derrame y evitar la evaporación. El cálculo final del QY se obtuvo mediante el software Fluoracle (Edinburgh Instruments).<sup>6</sup>

---

### **Referencias bibliográficas**

---

<sup>1</sup> Konz, I., Fernández, B., Fernandez, M. L., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2014). Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control. *Analytica Chimica Acta*, 809, 88-96

<sup>2</sup> Thomas, R. (2013). "Capítulo 17: Alternative Sample Introduction Techniques" *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC Press, Florida, 26-30.

<sup>3</sup> Elliott, A. D. (2020). Confocal microscopy: principles and modern practices. *Current protocols in Cytometry*, 92(1), e68.

<sup>4</sup> Paddock, S. W. (2000). Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molecular biotechnology*, 16(2), 127-149.

<sup>5</sup> <https://www.sct.uniovi.es/unidades/analisis-biologico/microscopia/equipos> (Consultada 5/03/2022).

<sup>6</sup> <https://www.directindustry.es/prod/edinburgh-instruments/product-25178-1612561.html> (Consultada 10/02/2022)

# **CAPÍTULO 1**

---

# **Análisis dirigido en lágrimas para el estudio del estado homeostático de elementos esenciales y metaloproteínas en degeneración macular asociada a la edad**

## **1. Introducción**

Como ya se ha descrito durante la Introducción general de la presente Tesis Doctoral, el proceso de envejecimiento está asociado a la aparición y desarrollo de enfermedades, con un particular impacto en las patologías neurodegenerativas<sup>1</sup>. Concretamente, en las etapas iniciales de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), se han identificado depósitos de proteínas oligomerizadas insolubles en la cama posterior del ojo, específicamente en la región macular de la retina<sup>2</sup>. Los inicios de esta enfermedad comienzan con la formación de los depósitos extracelulares, denominados drusas, entre la lámina basal del EPR y la membrana de Bruch, cuya degeneración progresiva lleva a estadios avanzados de la enfermedad, las formas neovascular (húmeda) y la atrofia geográfica (seca) de la DMAE<sup>3</sup>. En la actualidad, existen terapias para la DMAE neovascular, que representan el 10-15 % de los casos, pero no hay tratamiento efectivo para la forma seca de la DMAE, que representa el 85 % de los casos de la enfermedad avanzada<sup>4,5</sup>.

La composición de las drusas es altamente compleja, conteniendo lípidos, minerales y agregados proteicos anómalos<sup>6-10</sup> cuyos mecanismos moleculares de formación incluyen el plegamiento erróneo de proteínas inducido por metales<sup>11,12</sup>. Por tanto, el deterioro del control homeostático intracelular de los metales subyace en sus efectos citotóxicos, en la oligomerización de proteínas y en la agregación y consecuente pérdida de funcionalidad de las moléculas. La alteración específica de la homeostasis de los metales puede ocurrir durante el inicio y desarrollo de la DMAE, tanto a nivel local como sistémico. Sin embargo, sería mucho más sencillo y fácilmente interpretable emplear una muestra localizada o cercana al sistema ocular. Así, aunque la neurodegeneración progresiva observada durante la DMAE ocurre en el EPR y en la

retina neurosensorial, se podrían observar cambios en el segmento anterior del globo ocular, específicamente en fluidos fácilmente accesibles con métodos de extracción no invasivos como el fluido lagrimal<sup>13</sup>. El fluido lagrimal, es producido por las glándulas de meibomio, la glándula lagrimal principal y las glándulas accesorias, junto con las células caliciformes<sup>14</sup>. Se compone de tres capas, la capa interna de mucina hidrófila, la capa acuosa media y la capa lipídica externa (Figura 26)<sup>15</sup>. Este fluido (de hasta 6  $\mu\text{m}$  de espesor) resulta particularmente interesante para la e implementación de biomarcadores o para estudiar alteraciones locales relacionadas con las enfermedades oculares, dado que contiene un proteoma relativamente simple, compuesto por una limitada variedad de moléculas, y por cuyo medio se eliminan productos de desecho locales, drogas y otros metabolitos relacionados con los procesos fisiopatológicos<sup>16</sup>. Además, la obtención del fluido lagrimal requiere un procedimiento de toma de muestra no invasivo, por ejemplo, mediante el empleo de las tiras de Schirmer o microtubos capilares, de tal forma que no evitándose así una incisión en el ojo o la extracción de tejido<sup>17</sup>. No obstante, la inherente escasez de muestra limita de manera severa el análisis múltiple de analitos en este fluido. Esto resulta incluso más complicado cuando se estudian poblaciones de sujetos con edad avanzada, ya que la producción y/o secreción de lágrimas comienza a verse afectada con el envejecimiento. **Error! Marcador no definido.**<sup>18</sup>.

Hasta ahora momento, el número de estudios que recogen cambios específicos en fluido lagrimal asociados con la progresión neurodegenerativa de la DMAE ha sido limitado<sup>19, 20</sup>. Además, la ausencia de metodologías poderosas para un enfoque multidisciplinario sigue siendo una limitación importante, ya que las técnicas biológicas/biomédicas convencionales solo abordan una parte específica del problema y el fluido lagrimal representa un gran desafío desde el punto de vista analítico.

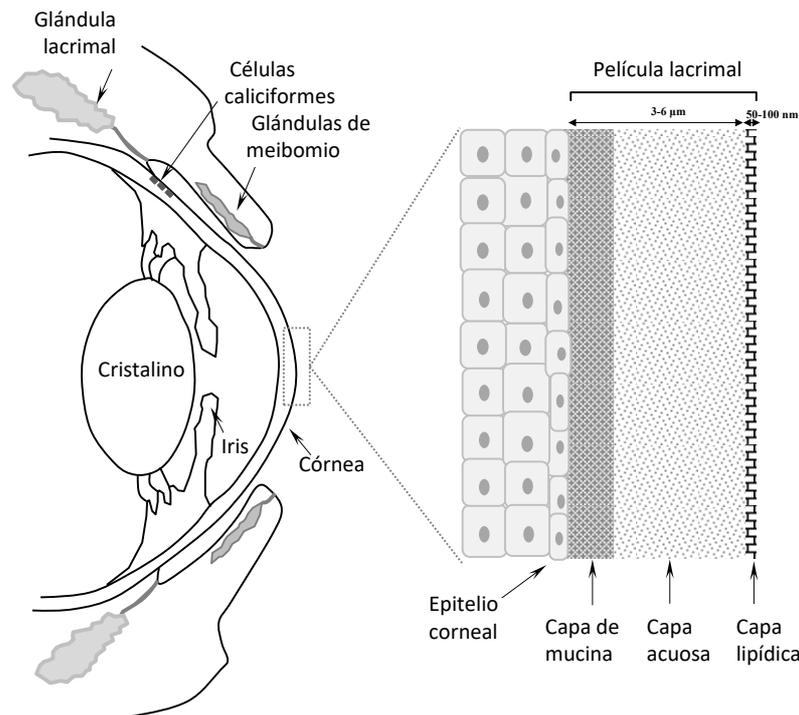


Figura 26. Diagrama que resume el aparato lagrimal y la estructura del fluido lagrimal

## 2. Objetivos

Considerando que la dishomeostasis de metales contribuye a la producción de radicales libres, la inflamación y la apoptosis y da como resultado cambios conformacionales de las proteínas en este primer capítulo de la Tesis Doctoral y partiendo de un fluido con toma de muestra no invasiva (fluido lagrimal) se planteó estudiar alteraciones en el ionoma y en el proteoma en la DMAE comparando los niveles de concentración encontrados en un grupo de controles y un grupo de pacientes con DMAE. Para ello, por un lado, se ha desarrollado una metodología analítica basada en FIA-ICP-MS para la determinación del contenido elemental de Mg, P, Na, Fe, Cu, Zn y Ca y por otro, se ha llevado a cabo la cuantificación de una serie de proteínas potencialmente relacionadas con esta patología según la literatura: lactoferrina, S100A6, MT1A, CFH, CLU, y APP. Dicha cuantificación se llevó a cabo mediante ELISAs.

### 3. Procedimiento Experimental

#### 3.1. Materiales y reactivos

- Microtubos capilares de 10  $\mu\text{L}$  de capacidad (Blaubrand® intraMark, Wertheim, Germany).
- Kits ELISA comerciales de tipo sándwich (Abcam, Cambridge, UK). lactoferrina, LF (ab200015), factor H del complemento, CFH (ab252359), clusterina, CLU (ab174447) y proteína precursora de amiloide, APP (ab216944).
- Kit ELISA de Abyntek Biopharma (Vizcaya, Spain) S100A6 (ABK1-E1028).
- Kit ELISA de LS BIO (Settle, WA, USA) metalotioneína 1A MT1A (LS-F10296).
- Kit comercial de BCA QuantiPro™ (Sigma Aldrich, Madrid, Spain).
- Disolución de patrón estándar para Mg, P, Fe, Cu, Zn ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Na, Ca ( $10000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Ga ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (Tracemetal™ grade, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 3.2. Instrumentación

- Espectrofotómetro PerkinElmer 2030 Multilabel Reader VICTORTM X5 (Waltham, MA, USA).
- ICP 7900 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) con analizador de masas de tipo cuadrupolo, equipado con una celda de colisión/reacción presurizada con gas He (flujo de  $4.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) para minimizar las interferencias poliatómicas.
- Sistema FIA con una válvula de 6 canales Rheodyne 3125 (Rohnert Park, CA, USA) con un bucle o "loop" de 5  $\mu\text{L}$  acoplado de forma "on-line" al nebulizador del ICP-MS.
- Jeringa de vidrio de 100  $\mu\text{L}$  de volumen (Hamilton, Reno, NV, USA) para cargar las muestras y estándares a través del sistema FIA.

### 3.3. Población de estudio

El presente estudio observacional, prospectivo de pacientes de DMAE e individuos control involucró un total de 60 sujetos, 31 pacientes diagnosticados con la forma seca de la DMAE y 29 individuos control. El estudio realizado se adhiere a los principios de la Declaración de Helsinki sobre Investigación Biomédica en Seres Humanos y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Principado de Asturias (Oviedo, España). Los sujetos del estudio fueron reclutados en el Instituto de Oftalmología Fernández-Vega (Oviedo, España) en base a los criterios de inclusión y exclusión acordados, bajo consentimiento informado y la toma de muestra fue realizada por personal médico cualificado. Para cada individuo incluido en este estudio, se realizaron exámenes oftalmológicos completos tanto para pacientes como para los individuos control, incluyendo biomicroscopía con lámpara de hendidura y fondo de ojo en ambos ojos. Los pacientes diagnosticados con DMAE fueron examinados más a fondo mediante angiografía con fluorescencia o tomografía de coherencia óptica. Solo se incluyeron individuos con DMAE seca con evidencia de forma activa de atrofia geográfica en al menos un ojo y ausencia de neovascularización coroidea. Los sujetos control se seleccionaron entre pacientes mayores de 60 años y con ausencia de DMAE o glaucoma. Específicamente, los sujetos control no mostraron ningún signo de drusas, incluidas las pseudodrusas reticulares, ni anomalías pigmentarias en ninguno de los ojos, estando en el estadio 1 de la clasificación de estadificación de maculopatía relacionada con la edad clínica (es decir, sin drusas)<sup>21</sup>. Los criterios de exclusión para controles y pacientes con DMAE incluyeron la ausencia de otras patologías oculares relevantes, como la retinopatía diabética o cualquier otra enfermedad de la superficie ocular, incluido el síndrome del ojo seco, trastornos de la superficie ocular, glaucoma y cirugía ocular previa excepto la extracción de cataratas. También se descartaron aquellos individuos que precisaran de medicamentos tópicos o lentes de contacto para evitar influencias en la composición del fluido lagrimal

### 3.4. Toma y preparación de muestras

La toma de muestra de fluido lagrimal se realizó de cada ojo de los pacientes, utilizando para ello microtubos capilares de 10 µL de capacidad. La recogida de muestra

se realizó por la mañana, entre las 9 y las 12, utilizando guantes esterilizados. Los tubos microcapilares se situaron en la zona inferior del saco conjuntival de cada ojo evitando cualquier contacto con la superficie ocular para minimizar el riesgo de provocar una irritación, obteniendo muestras de lágrimas procedentes del menisco inferior lagrimal y sin aplicar anestesia. Una vez recogida la muestra, las lágrimas de cada paciente fueron introducida dentro de un tubo Eppendorf utilizando una jeringa de plástico y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. El volumen recogido fue de entre 1 y 5  $\mu\text{L}$ .

### 3.5. Análisis molecular

La cuantificación de las seis proteínas de interés fue llevada a cabo mediante el uso de diferentes kits comerciales de tipo ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de APP, CFH Y S100A6 la muestra de fluido lagrimal fue diluida 1:200, para la cuantificación de MT1A se empleó una dilución 1:1000, para CLU una dilución de 1:6000 y finalmente, para LF la dilución fue de 1:1000000, en PBS. La concentración de las proteínas determinadas fue expresada en ng de proteína por mL de muestra para APP, CFH, S100A6, MT1A y CLU, y en mg de proteína por mL de lágrima para la LF. En la Tabla 2 se muestran los parámetros analíticos obtenidos para cada ensayo ELISA, incluyendo los límites de detección y cuantificación, la ecuación de calibración y el rango de detección.

*Tabla 1. Parámetros analíticos de cada kit ELISA empleado en la cuantificación de las proteínas seleccionadas.*

Kit ELISA	LD (ng.mL <sup>-1</sup> )	LQ (ng.mL <sup>-1</sup> )	Curva de calibración	Coefficiente de correlación	Rango de detección (pg.mL <sup>-1</sup> )
LF	0,193	0,644	$y = 0,00006x + 0,0667$	0,998	0-10000
CLU	0,312	1,042	$y = 0,00007x + 0,0349$	0,998	0-15000
APP	0,134	0,446	$y = 0,0001x + 0,0538$	0,998	0-6000
CFH	0,260	0,869	$y = 0,00006x + 0,0466$	0,997	0-10000

MT1A	0,007	0,025	$y = 0,0011x + 0,0891$	0,998	0-400
S100A6	0,274	0,914	$y = 0,0001x + 0,2518$	0,991	0-5000

Los resultados cuantitativos obtenidos mediante ELISAs fueron normalizados respecto de la concentración total de proteína del fluido lagrimal, utilizando para ello kit BCA QuantiPro™. En este caso, se empleó un estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para realizar un calibrado con un rango de concentración de 0-50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La dilución de la muestra fue de 1:2500. Así, una disolución de trabajo que contenía cobre y ácido bicinconínico, fue añadida a las muestras y a los diferentes puntos del calibrado. Las proteínas presentes en lágrima dieron lugar a la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  y se generó un complejo entre cobre y el ácido bicinconínico, cuya absorbancia fue medida a una longitud de onda de 562 nm.

### 3.6. Cuantificación multielemental de Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe y Cu mediante FIA-ICP-MS

El análisis multielemental de Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe y Cu se llevó a cabo mediante calibración externa por FIA-ICP-MS (utilizando como patrón interno Ga). El rango de concentración para los calibrados fue 0-200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para Mg y P, 0-500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para Na, Zn y Fe, 0-60  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para Cu y 0-1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para Ca. Cada estándar del calibrado fue inyectado 5 veces. Para determinar la concentración multielemental en el fluido lagrimal, las muestras fueron diluidas con 0,14 M de  $\text{HNO}_3$ , utilizando una dilución 1:20 para todos los elementos a excepción del Na, que requirió una mayor dilución de 1:2000. Así, solo 1  $\mu\text{L}$  de fluido lagrimal de cada sujeto fue análisis elemental. Las áreas de cada pico obtenido en cada fiagrama tanto para la medida de los estándares como de las muestras fueron integradas mediante el software MassHunter.

### 3.7. Análisis estadístico

Las características demográficas de los pacientes con DMAE y el grupo control fueron evaluadas con el programa estadístico SPSS Statistics versión 15.0 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). En el caso de variables cuantitativas (edad), fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney, mientras que las variables cualitativas (género, presencia de cataratas, hipertensión arterial o enfermedad cardiovascular) se analizaron utilizando la prueba chi-cuadrado,  $\chi^2$ . El estudio de todos los datos obtenidos, tanto del análisis molecular como del elemental representados como media  $\pm$  desviación estándar de la media, fue llevado a cabo utilizando los programas SPSS Statistics versión 15.0 y GraphPad Prism versión 3 para Windows (San Diego, CA, USA). La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk's y, posteriormente, las posibles diferencias significativas para las proteínas y metales cuantificados en lágrimas, entre el grupo control y DMAE, fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney para los que no siguieron una tendencia normal o la prueba t de Student para los que siguieron una distribución normal. El análisis de correlación de variables se llevó a cabo utilizando el programa SPSS Statistics version 15.0. Un valor p menor de 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

Se llevó a cabo un análisis adicional de discriminación por pasos con SPSS usando las concentraciones de las proteínas y los elementos determinados por ELISA y FIA-ICP-MS, respectivamente, en los diferentes grupos de muestras. Adicionalmente, mediante un análisis de regresión logística, utilizando el programa SPSS, se llevó a cabo un control de factores de confusión potenciales para asegurar que las variables estudiadas no distorsionaban la medida de la asociación de las variables restantes.

Finalmente, se aplicaron varias herramientas estadísticas basadas en modelos de aprendizaje automático utilizando el software Orange Canvas v2.6 (<http://orange.biolab.si>) para evaluar diferentes algoritmos y cuales de ellos proporcionaban la mejor precisión para la clasificación correcta de muestras según el panel seleccionado de proteínas o elementos. Estas herramientas incluyeron análisis ROC (característica operativa del receptor) para cada uno de los marcadores, y los

---

algoritmos *Random Forest*, *Naive Bayes*, *k-Nearest Neighbor*, *Classification Tree* y *Support Vector Machine*<sup>22</sup>.

## 4. Resultados

### 4.1. Sujetos de estudio

Las características demográficas de los pacientes diagnosticados con DMAE y los sujetos control se recogen en la Tabla 3. El origen de la población reclutada en el presente estudio fue caucásico y mayoritariamente de las regiones más septentrionales de España. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para la edad, el sexo, la presencia de cataratas, la hipertensión arterial o las enfermedades cardiovasculares, al comparar los pacientes con la forma seca de la DMAE seca con los individuos control (valor  $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la dislipidemia en pacientes con DMAE en comparación con los sujetos de control (valor  $p = 0,002$ ). El grupo de pacientes con DMAE seca lo constituyeron 31 individuos, de los cuales 18 eran mujeres y 13 hombres, con una edad media de  $80,7 \pm 8,0$  años, mientras que el grupo control estaba formado por 29 sujetos, formado por 18 mujeres y 11 hombres, con una edad media de  $77,2 \pm 8,9$  años. En ambos grupos, el porcentaje de sujetos con cataratas fue similar, concretamente un 75,9% para los controles y un 77,4% para los pacientes con DMAE. El porcentaje significativamente más alto de individuos con dislipidemia en el grupo DMAE (45,2 %), en comparación con los controles (6,9 %), podría indicar una relación entre la alteración de los niveles de lípidos plasmáticos y la patogénesis de la DMAE<sup>23,24</sup>. También se evaluaron los posibles efectos de los diferentes tratamientos sistémicos de los individuos incluidos en el estudio. La Tabla 4 recoge los tratamientos orales más comunes identificados en los sujetos control y los individuos con DMAE, encontrándose equilibrados en ambos grupos.

Tabla 2. Características demográficas de pacientes con DMAE y sujetos control

Población estudiada (n)	Edad (m ± SD)	Rango de edad	Género (f/m)	Cataratas (n, %)	HTA (n, %)	Dislipidemia (n, %)	Enfermedades cardiovasculares (n, %)
Controles (29)	77,2 ± 8,9	63-89	18 (62,1%)/11	22 (75,9%)	13 (44,8%)	2 (6,9%)	2 (6,9%)
DMAE (31)	80,7 ± 8,0	62-101	18 (58,1%)/13	24 (77,4%)	14 (45,1%)	14 (45,2%)	3 (9,7%)

n, número de individuos; m, media; SD, desviación estándar; f, femenino, m, masculino;

HTA, hipertensión arterial

Tabla 3. Tratamientos orales comunes en ambos pacientes control y DMAE

Tratamientos orales	Población de estudio (n)			
	Controles (29)	% controles	DMAE (31)	% DMAE
Lyrica (anticonvulsivo)	2	7	0	0
Adiro 100 (ácido acetilsalicílico)	3	10	2	6
Enalapril (anti- HTA)	1	3	1	3
Tramadol (dolor)	1	3	1	3
Sintrom (acenocoumarol)	2	7	1	3
Omeoprazol	3	10	3	10
Noctamid (lormetazepam)	2	7	0	0
Orfidal (benzodiazepinas)	2	7	4	13
Hemovsas (pentoxifilina)	2	7	0	0
Avidart (dutasterida)	1	3	1	3
Atorvastatina	1	3	3	10
Tranxilium (clorazepato dipotásico)	1	3	1	3
Eutirox (levotirosina)	1	3	1	3
Diovan (anti-HTA)	9	31	11	35
Simvastatina	2	7	10	32

## 4.2. Análisis molecular en lágrima

Las concentraciones totales de LF, S100A6, CFH, CLU, APP y MT1A obtenidos para los 29 sujetos control y 31 pacientes con DMAE seca mediante ensayos ELISA se encuentran recogidos en la Tabla 5. En la Figura 27 se han representado los diagramas de puntos correspondientes. Cuando fue posible, se agruparon las muestras de lágrimas de ambos ojos del mismo individuo. Debido al bajo volumen de muestra disponible, no se pudo determinar la composición molecular en todos los casos. De todas las proteínas analizadas, según la bibliografía solo se habían cuantificado previamente en fluido lagrimal LF, S100A6 y CLU<sup>25-28</sup>.

Tras el análisis cuantitativo realizado, se observaron diferencias estadísticamente significativas para las proteínas LF (0,7 valor factor multiplicador de cambio o “fold change”, valor  $p=0,004$ ), S100A6 (1,4 valor fold change, valor  $p = 0,03$ ) y MT1A (1,9 valor fold change, valor  $p = 0,006$ ), al comparar pacientes con DMAE y sujetos de control (Figura 27 A, B y F). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las proteínas CFH, CLU y APP (Figura 27 C, D y E; valor  $p>0,05$ ). Las correlaciones entre las proteínas analizadas y la edad de los individuos reclutados se evaluaron utilizando el coeficiente de Pearson, mostrando únicamente una correlación negativa y estadísticamente significativa para APP, exclusivamente en el grupo con DMAE (Figura 27G; valor  $r = -0,523$ , valor  $p = 0,005$ ). La concentración promedio de proteína total en lágrimas para los individuos control alcanzó los  $8,87 \pm 4,84 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mientras que para los pacientes con DMAE fue de  $9,26 \pm 5,28 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos, y estando los niveles encontrados en el rango de referencia publicado previamente<sup>29</sup>.

Tabla 4. Concentraciones de proteínas y elementos determinados en el fluido lacrimal de pacientes con DMAE y pacientes control.

Concentración de proteína	Control	DMAE	Fold-change	valor p
<b>Lactoferrina</b> (m ± SD, mg.mL <sup>-1</sup> )	11,81 ± 3,98	8,11 ± 3,47	0,7	0,004
<b>S100A6</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	409,8 ± 158,9	568,59 ± 321,9	1,4	0,03
<b>CFH</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	1692 ± 1167	2051 ± 1573	1,2	0,3
<b>Clusterina</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	29,33 ± 13,01	35,99 ± 14,94	1,2	0,09
<b>APP</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	176,71 ± 76,04	161,88 ± 69,86	0,9	0,3
<b>MT1A</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	154,45 ± 36,56	293,55 ± 214,00	1,9	0,006
<b>Concentración de elemento</b>				
<b>Na</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	2125 ± 524	1783 ± 678	0,8	0,09
<b>Mg</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	9,74 ± 3,68	6,50 ± 3,27	0,7	0,01
<b>P</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	3,95 ± 2,25	2,94 ± 2,14	0,7	0,2
<b>Ca</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	23,98 ± 9,15	22,46 ± 12,91	0,9	0,7
<b>Fe</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	3,53 ± 2,01	2,13 ± 1,37	0,6	0,03
<b>Cu</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	0,17 ± 0,07	0,11 ± 0,04	0,7	0,009
<b>Zn</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	0,36 ± 0,26	0,27 ± 0,21	0,7	0,3

m, media; SD, desviación estándar

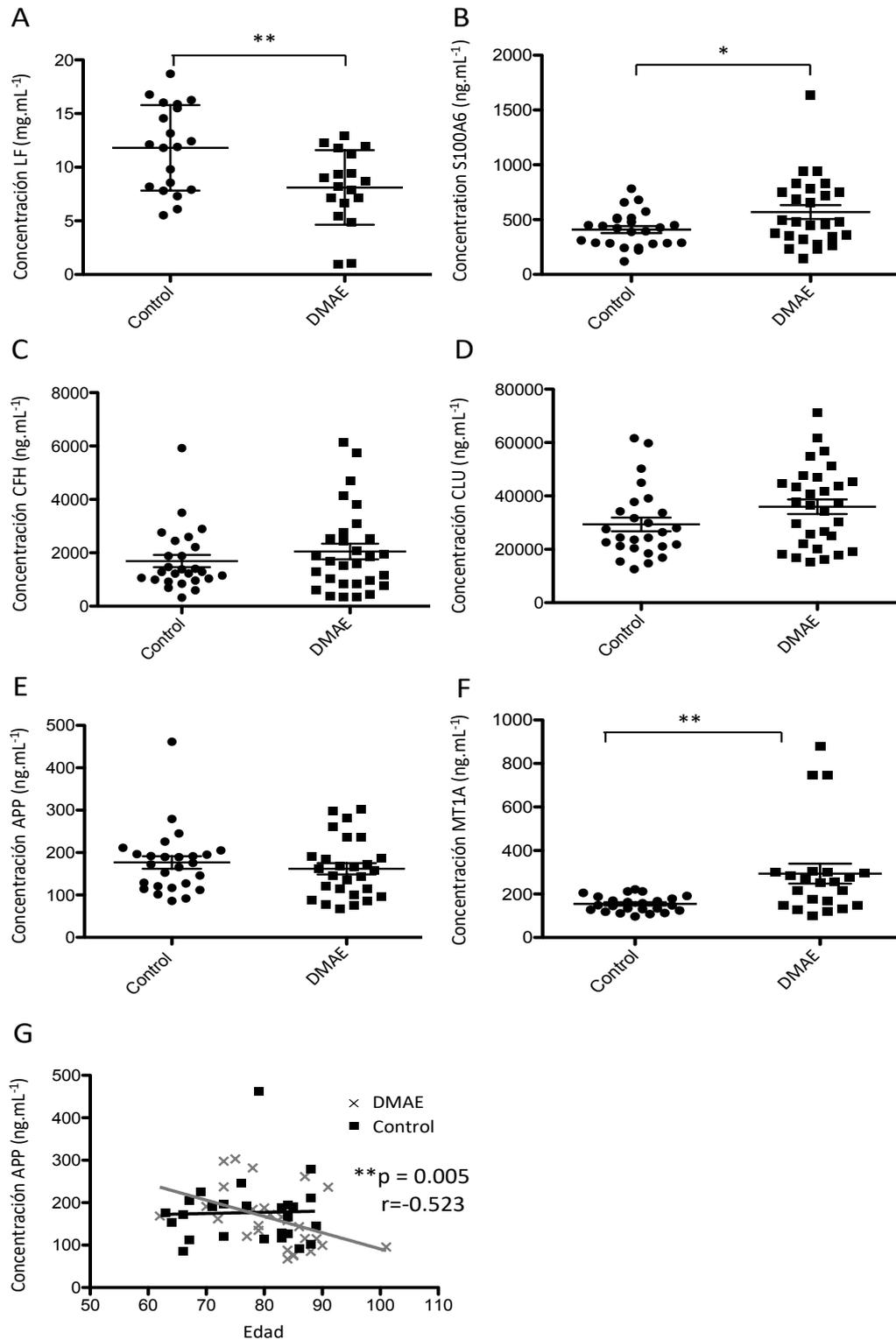


Figura 27. Diagramas de puntos de las concentraciones de proteínas determinadas en lágrima de pacientes con DMAE seca e individuos control (A) LF, (B) S100A6, (C) CFH, (D) CLU, (E) APP y (F) MT1A. (G) Correlación entre la concentración de APP y la edad en pacientes con DMAE e individuos control. Valor  $r$ , coeficiente de correlación de Pearson. \*, valor  $p < 0,05$ ; \*\*, valor  $p < 0,01$ ; \*\*\*, valor  $p < 0,001$ .

### 4.3. Análisis multielemental del fluido lagrimal mediante FIA-ICP-MS

Los resultados cuantitativos derivados del análisis elemental multiparamétrico cuantitativo de Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe y Zn mediante FIA-ICP-MS en el fluido lagrimal del grupo control y patients de DMAE se muestran en la tabla 5. Así mismo, se han representado los diagramas de puntos correspondientes a estos resultados en la Figura 28. Las posibles variaciones entre grupos fueron evaluadas utilizando la distribución normal y la prueba t no pareada.

Se observó una desregulación significativa para Mg (0,7 valor fold change; valor  $p = 0,01$ ; concentración promedio de  $9,74 \pm 3,78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el grupo de control frente a  $6,50 \pm 3,27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el grupo DMAE), Fe (0,6 valor fold change; valor  $p=0,03$ ; concentración promedio de  $3,53 \pm 2,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el grupo control frente a  $2,13 \pm 1,37 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en DMAE) y Cu (0,7 valor fold change; valor  $p=0,009$ ; concentración promedio de  $0,17 \pm 0,07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en grupo control frente a  $0,11 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en DMAE), al comparar pacientes con DMAE y sujetos control (Figura 28 B, F y G). Las correlaciones entre todos los elementos analizados y la edad de los individuos reclutados también se evaluaron mediante el coeficiente de Pearson, sin observarse correlación estadísticamente significativa para cada una de las variables.

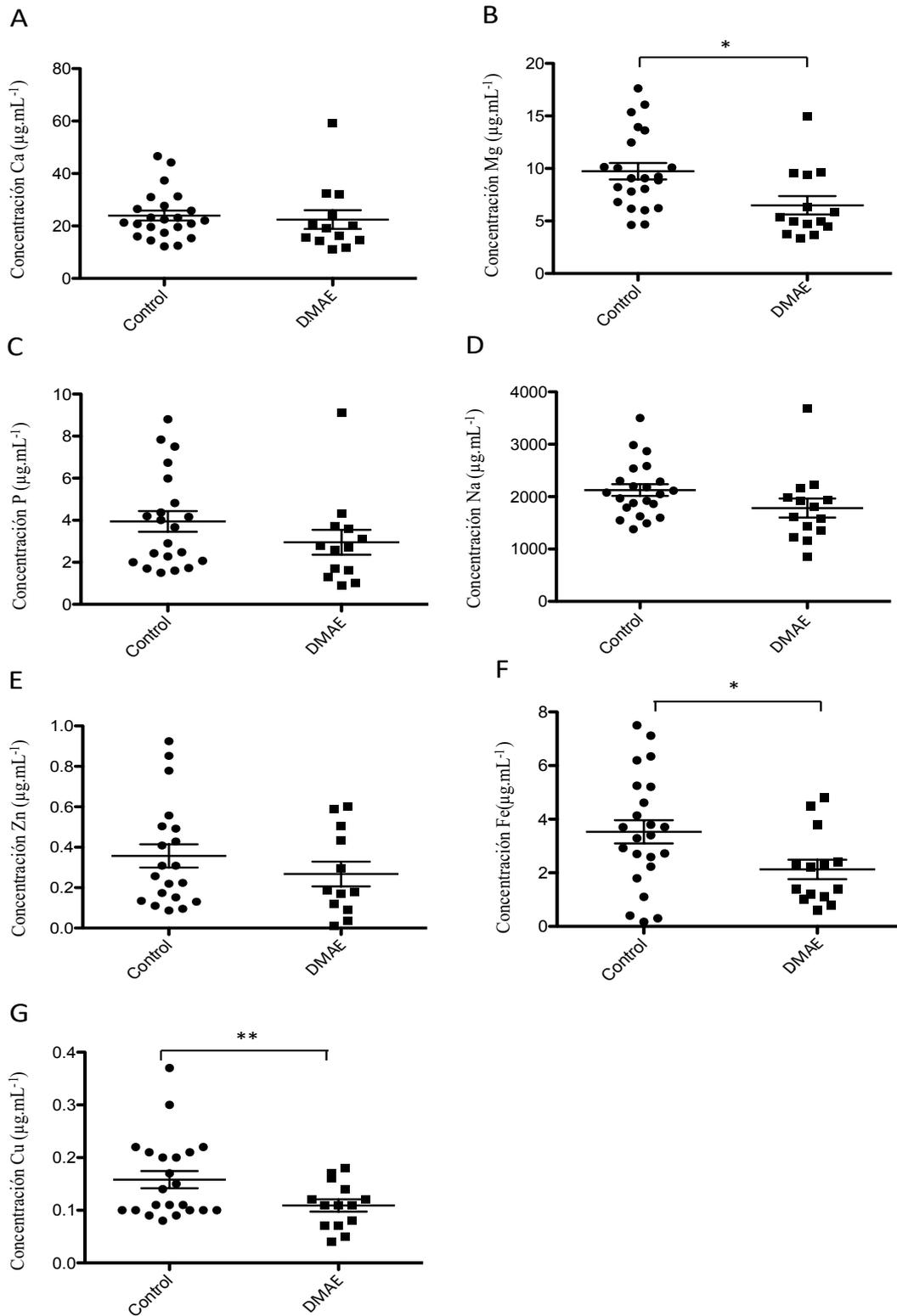


Figura 28. Diagramas de puntos de las concentraciones elementales determinadas en lágrima de pacientes con DMAE seca y sujetos control para (A) Ca, (B) Mg, (C) P, (D) Na, (E) Zn, (F) Fe and (G) Cu. \*, valor  $p < 0,05$ ; \*\*, valor  $p < 0,01$ ; \*\*\*, valor  $p < 0,001$ .

#### 4.4. Estudio de asociación entre variables

En primer lugar, se realizó un estudio de correlación entre elementos y proteínas en pacientes con DMAE y sujetos control utilizando el coeficiente de Pearson, recogiendo en la Figura 29 las asociaciones obtenidas que son estadísticamente significativas. Los valores  $r$  negativos o positivos más altos indican el grado de correlación entre las variables. Se observaron correlaciones positivas tanto para DMAE como para los grupos control cuando se asociaron las variables Mg y Na (valor  $r = 0,716$ , valor  $p = 0,003$  en el grupo de DMAE; valor  $r = 0,711$ , valor  $p = 0,0002$  en el grupo control), Cu y Mg (valor  $r=0,56$ , valor  $p=0,038$  en el grupo DMAE; valor  $r=0,706$ , valor  $p=0,0003$  en el grupo de control) y P y Mg (valor  $r=0,705$ , valor  $p = 0,007$  en el grupo DMAE; valor  $r = 0,756$ , valor  $p = 0,00007$  en el grupo de control) (Figura 29 A, B y C). También se observaron correlaciones positivas altamente significativas para el grupo DMAE cuando se asociaron las variables Cu y LF (valor  $r=0,839$ , valor  $p=0,002$ ), Na y Ca (valor  $r =0,710$ , valor  $p=0,006$ , y Mg y Ca (valor  $r=0,835$ , valor  $p=0,0003$ ) (Figura 29 D, E y F).

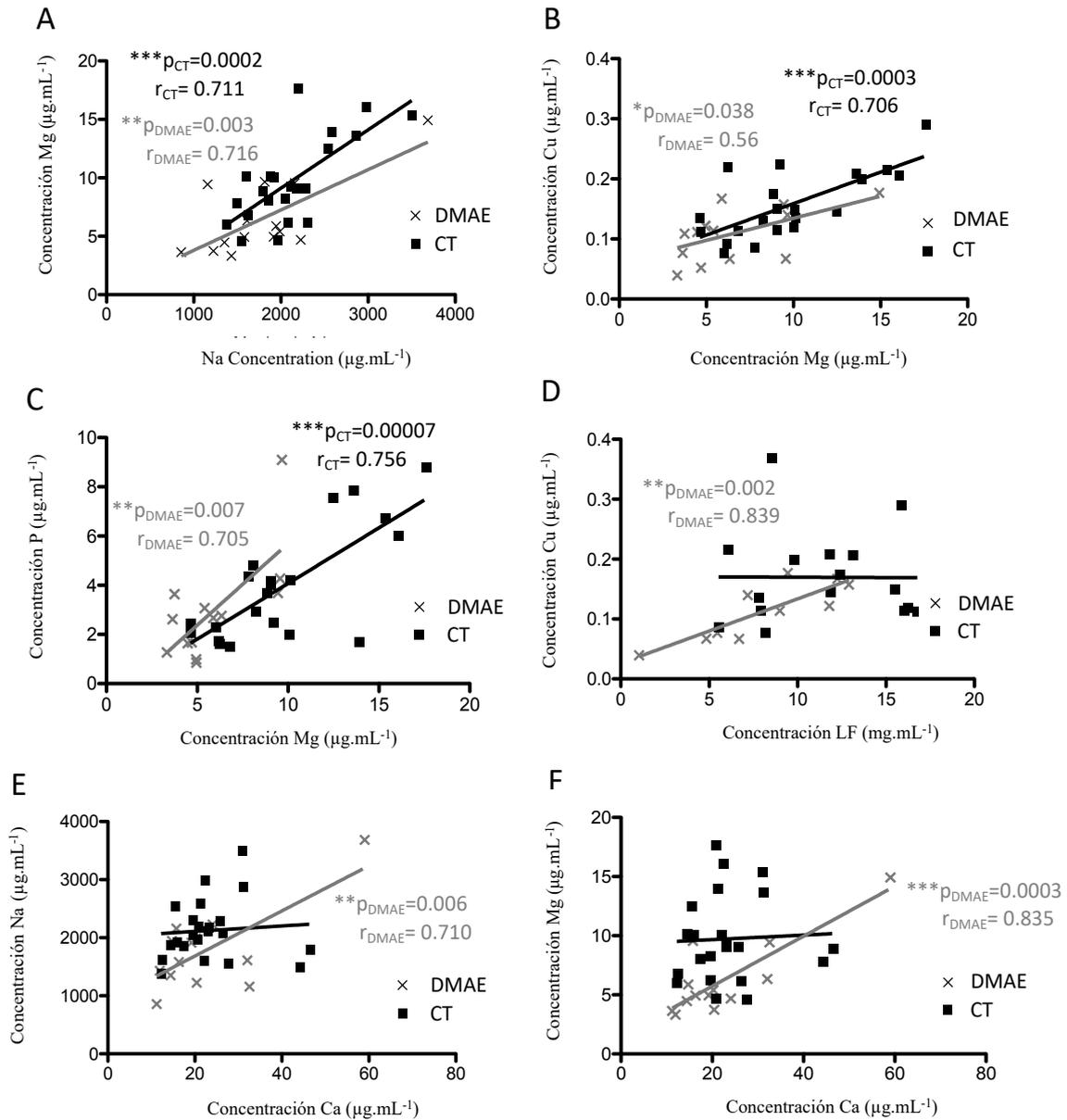


Figura 29. Análisis de la correlación entre (A) Na y Mg, (B) Mg y Cu, (C) Mg y P, (D) LF y Cu, (E) Ca y Na y (F) Ca y Mg, respectivamente.  $r$ -valor, Coeficiente de correlación de Pearson. \*,  $p$ -valor  $< 0,05$ ; \*\*,  $p$ -valor  $< 0,01$ ; \*\*\*,  $p$ -valor  $< 0,001$ .

#### 4.5. Filtrado de datos y regresión logística

Las diferencias estadísticamente significativas observadas entre los grupos DMAE y control para cada una de las variables evaluadas, incluidas las personas con dislipidemia, se exploraron más a fondo en un análisis estadístico integral de dos pasos para evaluar la influencia de este factor de riesgo sistémico en los resultados obtenidos. En primer lugar, se excluyeron los pacientes dislipidémicos y se volvieron a analizar de nuevo los datos filtrados para cada una de las variables estadísticamente significativas. Las concentraciones totales de LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A, Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe y Zn obtenidas para los sujetos control (n=27) y los pacientes con DMAE (n=17), una vez excluidos los individuos con dislipidemia, se muestran en la Tabla 6. Como puede observarse, se obtuvieron resultados comparables a los previamente obtenidos considerando todos los sujetos (ver Tabla 5), con la excepción del Mg. Al considerar a todos los pacientes, las proteínas MT1A, S100A6 y LF, y los metales Fe y Cu mostraron un cambio en los valores de fold change similar (1,9, 1,4, 0,7, 0,6, 0,7, respectivamente) a cuando se excluyeron los sujetos dislipidémicos (2,1, 1,4, 0,5, 0,5, 0,6, respectivamente), con valores de p aún más pequeños en el último caso (ver Tabla 6). Solo el Mg perdió las diferencias significativas cuando se excluyeron los sujetos dislipidémicos (0,7 valor fold change, valor p = 0,07), en comparación con los datos sin filtrar (0,7 valor fold change, valor p = 0,01), aunque el cambio en el valor fold change fue prácticamente nulo. Esta diferencia encontrada para el Mg puede estar relacionada por tanto con el menor número de individuos que se obtuvieron después de excluir a los sujetos con dislipidemia como factor de riesgo, lo que sin duda afecta al poder estadístico del análisis.

Tabla 5. Concentraciones de proteína y elementos determinados en lágrima de pacientes con DMAE (n=17) y sujetos control (n=27), después de excluir a los pacientes con dislipidemia.

<b>Concentración de proteína</b>				
	<b>Control</b>	<b>DMAE</b>	<b>Fold-change</b>	<b>p-valor</b>
<b>Lactoferrina</b> (m ± SD, mg.mL <sup>-1</sup> )	11,96 ± 4,13	5,89 ± 3,13	0,5	0,0005
<b>S100A6</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	393,84 ± 153,38	541,37 ± 238,47	1,4	0,04
<b>CFH</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	1632,82 ± 1152,43	2047,47 ± 1375,23	1,3	0,4
<b>Clusterina</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	28,67 ± 12,78	35,55 ± 15,15	1,2	0,2
<b>APP</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	174,65 ± 78,86	156,03 ± 79,25	0,9	0,2
<b>MT1A</b> (m ± SD, ng.mL <sup>-1</sup> )	154,31 ± 37,63	328,45 ± 258,53	2,1	0,002
<b>Concentración de elemento</b>				
<b>Na</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	2141,09 ± 531,66	1872,65 ± 864,13	0,9	0,3
<b>Mg</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	9,748 ± 3,76	6,81 ± 4,16	0,7	0,07
<b>P</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	3,96 ± 2,31	3,36 ± 2,80	0,8	0,6
<b>Ca</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	22,26 ± 7,38	22,67 ± 16,66	1,0	0,8
<b>Fe</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	3,22 ± 1,88	1,75 ± 1,00	0,5	0,02
<b>Cu</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	0,16 ± 0,06	0,10 ± 0,04	0,6	0,01
<b>Zn</b> (m ± SD, µg.mL <sup>-1</sup> )	0,36 ± 0,27	0,32 ± 0,22	0,9	0,7

m, media; SD, desviación estándar

En segundo lugar, se llevó a cabo una regresión logística multivariante en todos los sujetos reclutados (31 pacientes con DMAE y 29 sujetos control), usando SPSS con todos los datos obtenidos, para evaluar posibles factores de confusión, incluida la dislipidemia, en las diferencias observadas entre el grupo con DMAE y el control. Este análisis confirmó que el factor de riesgo de dislipidemia (valor p=0,989) no contribuyó a las diferencias estadísticamente significativas observadas entre grupos para las restantes variables, descartándose por tanto posibles confusores entre las condiciones demográficas y las proteínas y los elementos estudiados. Por tanto, puede asegurarse

que los niveles alterados de MT1A, S100A6, LF, Fe y Cu en la película lagrimal entre ambos grupos son el resultado de la enfermedad de la DMAE.

#### **4.6. Modelos de aprendizaje automático**

Las concentraciones obtenidas para las seis proteínas y los siete elementos estudiados en las muestras de fluido lagrimal de pacientes con DMAE y sujetos control se emplearon para realizar un análisis discriminante por pasos mediante SPSS con objeto de identificar las mejores variables que clasifican a ambos grupos y, por tanto, los diferencian. Así, resultó que el panel compuesto por MT1A, Na y Mg asigna correctamente el 89% del grupo de muestras y, en consecuencia, se utilizó para generar modelos predictivos multivariados. Todo el conjunto de datos se usó para el entrenamiento (“training”) y el test con distintos algoritmos de aprendizaje automático, incluidos *Random Forest*, *Naive Bayes*, *k-Nearest Neighbor*, *Classification Tree* y *Support Vector Machine*. Posteriormente, se validó el método de clasificación utilizando el 30% de datos restantes para hacer predicciones sobre casos futuros para los que se desconoce la respuesta objetivo, proporcionando los valores de asignación correcta (CA), sensibilidad, especificidad, área bajo la curva (AUC) y precisión de el modelo, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. La mejor eficiencia de clasificación se obtuvo al utilizar el panel de proteínas y elementos constituido por MT1A, Na y Mg y aplicar *Classification Tree* y *Naive Bayes*, los cuales proporcionaron valores de asignación correctos del 68% y 73%, respectivamente, al comparar los grupos DMAE y control. El AUC obtenido alcanzó 0,70 a 0,86 al utilizar *Classification Tree* y *Naive Bayes*, respectivamente. Esto implica que hay entre un 70 a 86 % de probabilidad de que el modelo sepa distinguir entre pacientes con DMAE y control.

Tabla 6. Mejores modelos de aprendizaje automático (*Machine-learning models*) utilizando las variables MT1A, Na y Mg, cuando se comparan pacientes DMAE y sujetos control.

Método	CA	AUC	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Random Forest	0,63	0,73	0,82	0,41	0,61
Naive Bayes	0,73	0,86	0,58	0,90	0,87
k-Nearest Neighbors	0,54	0,59	0,39	0,71	0,60
Classification Tree	0,68	0,70	0,69	0,67	0,70
Support Vector Machine	0,64	0,71	0,77	0,50	0,73

CA, Asignación Correcta; AUC, Área bajo la curva.

## 5. Discusión

Como se ha comentado, la DMAE se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión central causada por cambios neurodegenerativos relacionados con la edad en la mácula, región altamente especializada de la retina central y responsable de la visión fina y cromática. Durante el envejecimiento, el metabolismo sistémico de los metales, incluidos Fe, Cu, Zn y Ca, cambia y su alteración homeostática puede desempeñar un papel importante en los procesos neurodegenerativos. Diversas evidencias sugieren que las proteínas/péptidos identificados en los depósitos extracelulares característicos de la DMAE sufren una agregación patogénica promovida por metales<sup>30,31</sup>. La agregación proteica anómala observada en la DMAE puede estar relacionada con la existencia de una dishomeostasis metálica, como causa o consecuencia<sup>20</sup>. Por lo tanto, la comprensión de la estructura y las interacciones funcionales entre los metales y los componentes intracelulares y extracelulares que se convierten en patógenos pueden arrojar luz sobre la etiología de la DMAE. Por lo tanto, la identificación de niveles potencialmente alterados de metales, metaloides y proteínas que interactúan con metales en la película lagrimal de pacientes con DMAE puede contribuir a la mejor comprensión de los cambios fisiopatológicos observados en este trastorno irreversible y, al mismo tiempo, proponer biomarcadores candidatos para un diagnóstico precoz y/o un mejor pronóstico de la enfermedad.

En consecuencia, en este capítulo se ha diseñado un análisis multiparamétrico dirigido, basado en inmunoensayos y espectrometría de masas elemental, para la determinación cuantitativa de LF, S100A6, CFH, CLU, APP, Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe y Cu en la película lagrimal de pacientes con DAME seca y sujetos control. Las lágrimas son producidas por el aparato lagrimal para humedecer la superficie ocular, protegiendo la córnea de la desecación, facilitando los movimientos de los párpados sobre el globo ocular sin fricción para mejorar el efecto refractivo y preservando de la irritación provocada por el ambiente<sup>32</sup>. Las glándulas lagrimales son glándulas acinares exocrinas clásicas que secretan una solución acuosa diluida que contiene proteínas, componentes de pequeña masa molecular y electrolitos, constituyentes de la película lagrimal. Por lo tanto, la película lagrimal se compone principalmente de H<sub>2</sub>O (≈98%), con un pH normal de 7,5 y Na, Cl, HCO<sub>3</sub>, K, Mg, Ca, glucosa, retinol y urea como solutos principales. Según diversas publicaciones, las proteínas lagrimales más abundantes incluyen inmunoglobulina A, LF, prealbúmina específica de lágrima, proteína G y lisozima. Además, están presentes trazas de otras proteínas, enzimas e inhibidores de origen sérico. La tasa de reposición lagrimal normal se produce aproximadamente en un 16 %/min a una velocidad de parpadeo normal, pero depende en gran medida de la temperatura y la humedad, pudiendo ser inducida por una variedad de estímulos mecánicos y psicofísicos<sup>33,34</sup>. En consecuencia, una de las principales dificultades de este estudio ha sido el volumen de muestra limitado, especialmente teniendo en cuenta la edad de los pacientes reclutados. En el caso de los ensayos ELISA, se realizó la dilución de la muestra de lágrimas con diferentes factores, lo que permitió la cuantificación multiparamétrica de las moléculas seleccionadas. Además, teniendo en cuenta que el análisis multielemental por ICP-MS con nebulización convencional está drásticamente limitado por el alto consumo de volumen de muestra (hasta 200 μL·min<sup>-1</sup>), e incluso con el uso de micronebulizadores suele ser de 50–100 μL·min<sup>-1</sup>, se decidió optimizar e implementar el sistema FIA-ICP-MS, permitiendo la cuantificación de las trece variables seleccionadas en este biofluido.

La composición normal de la lágrima humana se ha caracterizado ampliamente utilizando enfoques proteómicos<sup>35, 36, 37</sup>, lipidómicos<sup>38, 39, 40</sup> metabolómicos<sup>47, 41</sup> y metalómicos<sup>42</sup>. Se han desarrollado metodologías basadas en proteómica o

metabolómica para el estudio de la película lagrimal y la identificación de biomarcadores candidatos en pacientes diagnosticados con glaucoma, ojo seco, retinopatía diabética, queratocono o cáncer, entre otros<sup>Error! Marcador no definido.,13,19</sup>. Sin embargo, son limitados los estudios que abordan el análisis de película lagrimal en pacientes con DMAE. Entre ellos, Yu *et al.*<sup>43</sup> observaron, mediante ensayos ELISA, que la lágrima (junto con el suero) de pacientes con DMAE (n=20) tenía niveles de IgA más elevados que los sujetos control (n=15), lo que puede implicar una relación con la patogénesis de esta enfermedad. Por otro lado, Winiarczyk *et al.*<sup>44</sup> intentaron definir el proteoma de la película lagrimal de sujetos con DMAE mediante el análisis molecular empleando un MALDI-TOF/TOF y usando tiras de Schirmer para la toma de muestras de lágrimas procedentes de 8 pacientes diagnosticados con la DMAE húmeda, 6 con la DMAE seca y 8 individuos control. Esta metodología permitió la identificación de 342 proteínas, encontrándose varias proteínas desreguladas en la película lagrimal de pacientes con DMAE seca que involucran vías específicas relacionadas con el estrés oxidativo, la inflamación y la proteólisis. Recientemente, la película lagrimal de 15 pacientes con DMAE húmeda y 15 controles sanos de la misma edad se analizó comparativamente mediante electroforesis en gel bidimensional y MALDI-TOF/TOF, lo que condujo a la identificación de varias proteínas alteradas que pertenecen a vías relacionadas con el estrés oxidativo, la eliminación de proteínas y la inflamación crónica, destacando alteraciones en las anexinas A1 y A4, que forman parte de la familia de unión a fosfolípidos dependientes del calcio responsables de regular la inflamación y la autofagia<sup>45,46</sup>. Sin embargo, ninguna de las proteínas alteradas identificadas en esos trabajos coincide con las evaluadas en el presente capítulo, mostrando variaciones significativas para las descritas en las secciones anteriores.

En el presente estudio, la desregulación significativa de la proteína S100A6 observada en la película lagrimal de pacientes con DMAE puede estar relacionada con su papel como regulador de la homeostasis del Ca. La S100A6 pertenece a la familia de proteínas S100 de unión a Ca<sup>2+</sup><sup>47</sup>. En el ojo, la proteína S100A6 se expresa en las células endoteliales corneales adultas, pero no en las células endoteliales corneales fetales<sup>48</sup>. En estudios previos se ha observado que los niveles de proteína S100A6 se encontraron elevados en pacientes con ojo seco o con disfunción en las glándulas de Meibomio<sup>26,49</sup>,

y desregulados en la película lagrimal de pacientes diagnosticados con queratocono<sup>50</sup>, proponiéndose como biomarcador candidato de estos trastornos de la superficie ocular. Curiosamente, la proteína S100A6 se encontró desregulada en modelos experimentales de neovascularización corneal<sup>51</sup>, observándose su expresión en tejido de Pterigion extraído del paciente<sup>52,53</sup>, pero hasta la fecha ningún estudio ha relacionado esta proteína con la enfermedad de DMAE.

Por otro lado, en este trabajo se observó una desregulación de LF en los pacientes con DMAE al compararlos con los sujetos emparejados por sexo y edad. Esta glicoproteína se encuentra habitualmente en la mayoría de las secreciones mucosas, es decir, secreción nasal, saliva, etc) así como en lágrimas, humor vítreo, EPR y retina<sup>54,55,56</sup>. La LF regula la homeostasis del hierro<sup>57</sup> y también presenta propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, moduladoras de especies reactivas del oxígeno, con efectos adicionales de inmunidad antiviral y antitumoral<sup>58</sup>. Esta proteína ha sido propuesta previamente como biomarcador candidato de la enfermedad del ojo seco<sup>59</sup>, cuya administración oral podría preservar la función de la glándula lagrimal en ratones de edad avanzada, reduciendo el daño oxidativo y la inflamación<sup>60</sup>. La administración de LF también redujo la neovascularización coroidea en un modelo de ratón inducido por láser que imita la forma húmeda de DMAE a través de la inhibición de factores inducibles por hipoxia<sup>61</sup>. En particular, según diversos estudios la concentración de LF en la película lagrimal de individuos control parece permanecer invariable a lo largo de la edad con independencia del sexo<sup>55,62</sup>, en sintonía con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Además, los niveles más bajos de LF observados en la película lagrimal de los pacientes con DMAE pueden estar relacionados con una concentración más baja de Fe y un mayor estrés oxidativo observado durante el curso de la enfermedad.

Con respecto a la subisoforma MT1A, esta pertenece a familia de las metalotioneínas, definidas como proteínas de bajo peso molecular (< 7 kDa) ricas en cisteína y ligadoras de metales e implicadas en la homeostasis celular de Cu y Zn, desintoxicación de metales, defensa frente al daño oxidativo mediante captación de radicales libres y neuroprotección<sup>63,64,65</sup>. La MT1A, codificada por el gen MT1A y que se expresa en todos los tejidos oculares humanos, se observó a mayores niveles de

concentración en la lágrima de pacientes con DMAE, destacando la alta variabilidad en este grupo en contraste con los sujetos control (Figura 27F). Por el contrario, estudios previos mostraron que los niveles de metalotioneínas disminuyeron con la edad en células pigmentadas de la retina aisladas de donantes *post mortem* con signos de DMAE, pero sin determinar subisoformas individuales<sup>66</sup>. Resultan llamativos los estudios llevados a cabo utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* de daño retiniano, mostrando una sobreexpresión de las isoformas MT1 y MT2, lo que sugiere que su desregulación puede proteger contra el daño agudo de la retina<sup>67,68,69</sup>, pudiendo explicar los niveles más altos de MT1A observados en este trabajo en los pacientes con DMAE.

De los diferentes estudios publicados hasta el momento, se han observado cambios en la composición de las lágrimas relacionados con la edad, incluyendo una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias y factores remodeladores de la matriz extracelular<sup>70</sup>, así como niveles más altos de albúmina plasmática<sup>71</sup>. Teniendo en cuenta que el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el inicio de DMAE, también se ha estudiado la posible correlación entre las proteínas seleccionadas y la edad de los sujetos reclutados, sin observar ningún cambio significativo relacionado con la edad en la composición de las lágrimas, con la excepción de la proteína APP. En este caso, se obtuvo una correlación negativa para APP, pero solo en el grupo DMAE (r-value=-0,523, p-value<0,01), lo que indica que los niveles de esta proteína disminuyeron con la edad en pacientes con DMAE, pero no en controles sanos. Esta observación puede estar asociada con el aumento de la actividad de las enzimas que escinden la APP durante el envejecimiento, lo que contribuye a la degradación de la APP y al aumento de la producción y acumulación de depósitos extracelulares<sup>72</sup>, viéndose reducido notablemente en el grupo de pacientes con la DMAE según los resultados obtenidos. Por tanto, resultaría de interés llevar a cabo el seguimiento de esta proteína en la película lagrimal de los pacientes con DMAE durante el desarrollo y las etapas avanzadas de la enfermedad.

La literatura actual no incluye ningún estudio que aborde el análisis multielemental de los elementos seleccionados en este estudio en la película lagrimal de los pacientes con DMAE. Solo se han encontrado algunas publicaciones que

intentaron cuantificar varios elementos en la película lagrimal mediante diferentes estrategias de muestreo y análisis, sin relacionarlo con ninguna enfermedad ocular. Por ejemplo, se cuantificaron los niveles de Zn en lágrimas de voluntarios jóvenes sanos mediante espectrometría de absorción atómica, obteniendo un valor medio de  $1,537 \pm 0,146 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>73</sup>. También se realizó un análisis multielemental de Na, K, Mg y Ca en la película lagrimal de diez humanos sanos empleando ICP-MS o espectroscopia de emisión atómica (ICP-AES), con niveles de concentración de  $104,5 \pm 4,27$ ,  $18,1 \pm 1,04$ ,  $0,49 \pm 0,02$  y  $0,33 \pm 0,03$  mM, respectivamente<sup>74</sup>. Por otro lado, el análisis multielemental de lágrimas de 60 voluntarios procedentes de diferentes orígenes geográficos (áreas urbanas frente a rurales), empleando ICP-MS, proporcionó concentraciones promedio de  $18,40 \pm 16,53 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para Cu y  $29,61 \pm 31,46 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para Zn<sup>42</sup>. Además, la posible relación entre los niveles de Zn en lágrima y la infección parasitaria por helmintos fue evaluada en 81 individuos mediante un ensayo colorimétrico, observándose niveles más altos de este elemento en la población infectada ( $4,78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en comparación con los sujetos control ( $2,42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )<sup>75</sup>. Finalmente, mediante el análisis multielemental de Cu, Zn, Se, Rb, Ba, Pb, Mn y Co por ICP-MS en 47 pacientes diagnosticados de diabetes tipo II y 50 controles sanos, se observaron diferencias significativas para Zn, Cr, Co, Mn, Ba y Pb, alcanzando la concentración media de Zn  $66,00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  en pacientes diabéticos y  $33,25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  en sujetos no diabéticos<sup>Error! Marcador no definido.</sup>.

De los diferentes estudios indicados, cabe destacar la importante variabilidad observada para los resultados cuantitativos de oligoelementos en lágrimas, que difiere de los resultados para Cu y Zn obtenidos en este trabajo (promedio de  $0,16$  y  $0,36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente). Las diferencias experimentales pueden atribuirse al procedimiento de muestreo de lágrimas y/o determinación metodológica. Parece que el muestreo con tiras de Schirmer proporcionó niveles más bajos de Zn y Cu<sup>42,75</sup>,<sup>Error! Marcador no definido.</sup>, en comparación con el uso de microcapilares de vidrio<sup>73,74</sup>. Las tiras de Schirmer se utilizan habitualmente en el área clínica para determinar la producción de lágrimas, donde la fracción acuosa de la lágrima viaja más a lo largo de las tiras que las proteínas no polares, los lípidos o los metabolitos<sup>36</sup>. Este hecho, junto con el requisito de una extracción cuantitativa de los analitos de las tiras para su posterior análisis, puede contribuir a las

diferencias observadas en la composición de la muestra. De hecho, la composición de la lágrima se ve afectada por el método utilizado para la toma de muestras<sup>76</sup>, como se ha comentado para las proteínas<sup>77</sup>, los metabolitos<sup>20</sup> y los lípidos<sup>38</sup>. El uso de tubos microcapilares es menos invasivo, más seguro y evita el lagrimeo reflejo, lo que lleva a la identificación de un enorme número de proteínas extracelulares, en comparación con el uso de tiras de Schirmer,<sup>19</sup> pero se requiere de personal capacitado para ello, lo que podría explicar el bajo número de estudios que utilizan muestreo microcapilar. Además, se debe tener especial cuidado con todas las metodologías empleadas para evitar la contaminación de la muestra durante la recogida y el pretratamiento.

En este estudio, los niveles más bajos observados para Fe, Mg y Cu en los pacientes con DMAE pueden estar relacionados con el inicio y/o la progresión de la enfermedad. El elemento esencial Fe es el metal con actividad redox más abundante en el cuerpo humano<sup>78</sup>, cuya acumulación local se ha implicado en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas, incluida la DMAE<sup>79</sup>. En concreto, se ha detectado un mayor contenido de Fe en los fotorreceptores, el EPR y sus melanosomas, la membrana de Bruch y los depósitos extracelulares de pacientes con DMAE<sup>79-82</sup>, donde su acumulación en la retina puede contribuir a la patogénesis de la DMAE al inducir estrés oxidativo y daño inflamatorio. Curiosamente, en estudios previos el análisis elemental de humor acuoso mostró niveles más altos de Fe en pacientes con DMAE, en comparación con sujetos control<sup>83</sup>. No obstante, según en los resultados obtenidos en este capítulo, la disminución de la concentración de Fe en los pacientes con la forma seca de la DMAE parece estar directamente relacionada con los niveles más bajos LF, una de las principales proteínas de unión al hierro en la película lagrimal, lo que sugiere una interacción subyacente entre ambas variables.

Asimismo, el Cu es un elemento esencial para el ciclo visual y la supervivencia de los fotorreceptores, cuya deficiencia se ha asociado con cambios morfológicos en la retina y con la neuropatía óptica<sup>84</sup>. La menor concentración de Cu determinada en la película lagrimal de los pacientes diagnosticados de DMAE, en comparación con los sujetos control, está en consonancia con los niveles más bajos de Cu observados en el humor acuoso de individuos con DMAE no exudativa.<sup>83</sup> Con el envejecimiento, diversos

estudios han observado un aumento de los niveles sistémicos de Cu (sangre o suero)<sup>85</sup>, mientras que los niveles locales de Cu en el EPR y la coroides se redujeron,<sup>86</sup> específicamente en pacientes con la DMAE<sup>87</sup>, reflejando niveles más bajos de este elemento dentro del ojo afectado. Por otro lado, el Mg es el segundo catión intracelular más abundante, involucrado en el mantenimiento de la función de la membrana celular, la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo energético<sup>88</sup>. En el estudio llevado a cabo Heesterbeek *et al.*<sup>89</sup>, se determinó por ICP-MS que los niveles de Mg eran más elevados en el plasma de pacientes con DMAE, pero sin significación estadística. Recientemente, Agrón *et al.*<sup>90</sup> mostraron que múltiples nutrientes dietéticos, incluido el Mg, se encontraron asociados con un menor riesgo de la forma neovasular de la DMAE. Teniendo en cuenta su papel fisiológico en la restauración de la integridad de la barrera hematoencefálica, la deficiencia de Mg se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, incluida la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), el Alzheimer (AD) o la enfermedad de Parkinson<sup>Error! Marcador no definido.,90</sup>. Específicamente, los niveles de Mg se han encontrado más bajos en la sangre de pacientes con ELA, en comparación con sujetos control, de manera similar a las concentraciones significativamente más bajas de este elemento determinadas en la película lagrimal de los pacientes con DMAE.

Debe resltarse que la mayor prevalencia de pacientes con dislipidemia en el grupo de la DMAE está en consonancia con estudios previos, indicando que la patología macular puede estar relacionada con los niveles de los lípidos circulantes, el transporte local de lípidos o ambos<sup>22,91</sup>. Para descartar posibles factores de confusión de las condiciones demográficas y clínicas, incluido el factor de riesgo de dislipidemia, en los niveles de metales diana y (metalo-)proteínas obtenidos en la película lagrimal de pacientes con DMAE y significativamente alterados, en comparación con sujetos control, se llevó a cabo un análisis estadístico adicional. La exclusión de los sujetos con dislipidemia del análisis multivariado arrojó resultados similares a los previamente obtenidos con el análisis estadístico que incluyó todos los individuos con este factor de riesgo, con excepción del Mg, probablemente debido a la reducción del número de individuos del estudio, lo que indica la baja influencia de este factor de riesgo sobre las diferencias obtenidas. Curiosamente, el análisis de regresión logística multivariado

confirmó que la dislipidemia no contribuyó a las diferencias observadas y, por lo tanto, las alteraciones obtenidas para MT1A, S100A6, LF, Fe y Cu son el resultado de la enfermedad de la DMAE.

Además, también se investigaron las posibles correlaciones entre proteínas y elementos, observándose una tendencia positiva y estadísticamente significativa para el Mg al compararlo con el Na, Cu y P (Figura 29 A, B, C), tanto para sujetos con DMAE como el grupo control. Por el contrario, las correlaciones positivas para Mg y Ca (Figura 29 D), para Ca y Na (Figura 29E) y para LF y Cu se observaron exclusivamente para el grupo DMAE y no para los controles sanos. En particular, la LF fue la única proteína que mostró una alta correlación positiva con Cu (Figura 29D), pero no con Fe, lo que sugiere una posible interdependencia en la enfermedad de la DMAE. Por otro lado, la correlación altamente positiva observada para Mg con Na, P y Ca puede sugerir un comportamiento agonista de Mg<sup>92</sup>, y también para Na y P y para LF y Cu. Sin embargo, es necesario dilucidar la interacción positiva observada específicamente en el grupo DMAE. Debe resaltarse que los datos cuantitativos obtenidos para las trece variables, tanto en el grupo DMAE como en los controles, se usaron para establecer un panel de tres variables (proteínas y metales) constituido por de MT1A, Na y Mg. Este panel se utilizó para generar modelos de aprendizaje automático (Tabla 7), obteniéndose la precisión de la clasificación al comparar pacientes con DMAE frente a sujetos control, pudiendo diagnosticarse la enfermedad en el 73% de los casos. Sin embargo, el poder diagnóstico para diagnosticar la DMAE es bastante bajo utilizando estas variables y parece que sus alteraciones en las lágrimas no están directamente relacionadas entre sí.

A pesar de que se trata de un estudio exhaustivo dirigido al análisis de metales traza y (metalo-)proteínas en pacientes con DMAE seca, este trabajo debe considerarse exploratorio. Este estudio está limitado por el número restringido de muestras utilizadas para el análisis estadístico, siendo necesario reclutar pacientes adicionales para obtener más de 300 muestras de cada grupo con objeto de alcanzar la potencia adecuada de las pruebas. Por lo tanto, el bajo número de muestras utilizadas para clasificar los grupos puede afectar el poder de discriminación del panel estudiado de MT1A, Na y Mg,

utilizando los algoritmos propuestos. Además, la evaluación de la composición de la película lagrimal a lo largo del día y durante un largo periodo de tiempo sería deseable en futuros estudios para determinar las variaciones dentro del mismo día y/o entre días. Finalmente, quedan abiertas las cuestiones relativas a la correlación de la composición de la película lagrimal con las lesiones maculares, considerando que, aunque la película lagrimal no está conectada directamente con la retina, puede verse alterada por la ruptura parcial de la barrera hematorretiniana en el curso de la DMAE.

## **6. Conclusiones**

A pesar del reto que supone analizar el fluido lacrimal, debido al pequeño volumen del que se dispone (1-5  $\mu\text{L}$ ), así como las limitaciones existentes en cuanto a disponibilidad de metodologías con carácter multidisciplinar, en este capítulo de la Tesis Doctoraltrabajo se ha conseguido desarrollar un método multiparamétrico para la cuantificación de proteínas y elementos esenciales en este tipo de fluido. Concretamente, se ha obtenido información cuantitativa para trece variables: LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe y Zn, combinando técnicas analíticas de espectrofotometría y espectrometría de masas.

Además, los resultados obtenidos han mostrado alteraciones atribuibles a la DMAE tanto nivel proteico como a nivel elemental. Concretamente, se han demostrado una regulación positiva de MT1A y S100A6, y una la regulación negativa de LF, Fe, Mg y Cu en la película lagrimal de pacientes con trastorno macular.

---

## Referencias bibliográficas

---

- <sup>1</sup> Jucker, M., Walker, L. C. (2018). Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, *21*(10), 1341–1349.
- <sup>2</sup> Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y., Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Global health*, *2*(2), e106–e116.
- <sup>3</sup> Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001). The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *American journal of ophthalmology*, *132*(5), 668–681.
- <sup>4</sup> Sadda, S. R., Guymer, R., Monés, J. M., Tufail, A., Jaffe, G. J. (2020). Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Use and Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Systematic Literature Review and Expert Opinion. *Ophthalmology*, *127*(5), 648–659.
- <sup>5</sup> Chakravarthy, U., Bailey, C. C., Johnston, R. L., McKibbin, M., Khan, R. S., Mahmood, S., Downey, L., Dhingra, N., Brand, C., Brittain, C. J., Willis, J. R., Rabhi, S., Muthutanthri, A., Cantrell, R. A. (2018). Characterizing Disease Burden and Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, *125*(6), 842–849.
- <sup>6</sup> Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M. E., Salomon, R. G., Hollyfield, J. G. (2002). Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(23), 14682–14687.
- <sup>7</sup> Lengyel, I., Flinn, J. M., Pető, T., Linkous, D. H., Cano, K., Bird, A. C., Lanzirotti, A., Frederickson, C.J., van Kuijk, F. J. G. M. (2007). High concentration of zinc in sub-retinal pigment epithelial deposits. *Experimental eye research*, *84*(4), 772–780.
- <sup>8</sup> Flinn, J. M., Kakalec, P., Tappero, R., Jones, B., Lengyel, I. (2014). Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration. *Metallomics : integrated biometal science*, *6*(7), 1223–1228.
- <sup>9</sup> Thompson, R. B., Reffatto, V., Bundy, J. G., Kortvely, E., Flinn, J. M., Lanzirotti, A., Jones, E. A., McPhail, D. S., Fearn, S., Boldt, K., Ueffing, M., Ratu, S. G., Pauleikhoff, L., Bird, A. C., Lengyel, I. (2015). Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(5), 1565–1570.
- <sup>10</sup> Wang, L., Clark, M. E., Crossman, D. K., Kojima, K., Messinger, J. D., Mobley, J. A., Curcio, C. A. (2010). Abundant lipid and protein components of drusen. *PloS one*, *5*(4), e10329.
- <sup>11</sup> Astrid Sigel, Helmut Sigel RKOS, ed. *Neurodegenerative Diseases and Metal Ions*. Vol 1. John Wiley & Sons, Ltd; 2014. doi:10.1002/0470028114
- <sup>12</sup> Quintanar, L., Lim, M. H. (2019). Metal ions and degenerative diseases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *24*(8), 1137–1139.
- <sup>13</sup> von Thun Und Hohenstein-Blaul, N., Funke, S., Grus, F. H. (2013). Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Experimental eye research*, *117*, 126–137.

- <sup>14</sup> Sullivan, D.A., Stern, M.E., Tsubota, K., Dartt, D.A., Sullivan, R.M., Bromberg B., ed. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*. 3rd ed. Springer, Boston, MA; 2002
- <sup>15</sup> King-Smith, E., Fink, B., Hill, R., Koelling, K., Tiffany, J. (2004). The thickness of the tear film. *Current eye research*, 29(4-5), 357-368.
- <sup>16</sup> Cwiklik, L. (2016). Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(10), 2421-2430.
- <sup>17</sup> Zhan, X., Li, J., Guo, Y., Golubnitschaja, O. (2021). Mass spectrometry analysis of human tear fluid biomarkers specific for ocular and systemic diseases in the context of 3P medicine. *The EPMA journal*, 12(4), 449–475
- <sup>18</sup> Johnson, M. E., Murphy, P. J. (2004). Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Progress in retinal and eye research*, 23(4), 449–474.
- <sup>19</sup> Ponzini, E., Santambrogio, C., De Palma, A., Mauri, P., Tavazzi, S., Grandori, R. (2021). Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery. *Mass spectrometry reviews*, 10.1002/mas.21691. Advance online publication.
- <sup>20</sup> Brown, D., Ryan, K., Daniel, Z., Mareko, M., Talbot, R., Moreton, J., Giles, T. C. B., Emes, R., Hodgman, C., Parr, T., Brameld, J. M. (2019). Author Correction: The Beta-adrenergic agonist, Ractopamine, increases skeletal muscle expression of Asparagine Synthetase as part of an integrated stress response gene program. *Scientific Reports*, 9(1), 1-1.
- <sup>21</sup> Seddon, J. M., Sharma, S., Adelman, R. A. (2006). Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*, 113(2), 260-266.
- <sup>22</sup> Curk T, Demsar J, Xu Q, et al. Microarray data mining with visual programming. *Bioinformatics*. 2005;21(3):396-398. doi:10.1093/bioinformatics/bth474
- <sup>23</sup> Fan, Q., Maranville, J. C., Fritsche, L., Sim, X., Cheung, C. M. G., Chen, L. J., ... & Cheng, C. Y. (2017). HDL-cholesterol levels and risk of age-related macular degeneration: a multiethnic genetic study using Mendelian randomization. *International journal of epidemiology*, 46(6), 1891-1902.
- <sup>24</sup> Fernández-Vega, B., Garcia, M., Olivares, L., Álvarez, L., González-Fernández, A., Artime, E., Fernández-Vega Cueto, A., Cobo, T., Coca-Prados, M., Vega, J. A., González-Iglesias, H. (2020). The association study of lipid metabolism gene polymorphisms with AMD identifies a protective role for APOE-E2 allele in the wet form in a Northern Spanish population. *Acta Ophthalmologica*, 98(3), e282-e291.
- <sup>25</sup> Ponzini, E., Scotti, L., Grandori, R., Tavazzi, S., Zambon, A. (2020). Lactoferrin concentration in human tears and ocular diseases: A meta-analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(12), 9-9.
- <sup>26</sup> Benitez-Del-Castillo, J. M., Soria, J., Acera, A., Muñoz, A. M., Rodríguez, S., Suárez, T. (2021). Quantification of a panel for dry-eye protein biomarkers in tears: A comparative pilot study using standard ELISA and customized microarrays. *Molecular vision*, 27, 243–261.
- <sup>27</sup> Soria, J., Acera, A., Merayo-Llloves, J., Durán, J. A., González, N., Rodríguez, S., Bistolas, N., Schumacher, S., Bier, F.F., Peter, H., Stöcklein, W., Suárez, T. (2017). Tear proteome analysis in ocular surface diseases using label-free LC-MS/MS and multiplexed-microarray biomarker validation. *Scientific Reports*, 7(1), 1-15.
- <sup>28</sup> Yu, V., Bhattacharya, D., Webster, A., Bauskar, A., Flowers, C., Heur, M., ... Fini, M. E. (2018). Clusterin from human clinical tear samples: Positive correlation between tear concentration and Schirmer strip test results. *The ocular surface*, 16(4), 478-486.
- <sup>29</sup> Gachon, A. M., Richard, J., Dastugue, B. (1982). Human tears: normal protein pattern and individual protein determinations in adults. *Current eye research*, 2(5), 301-308.

- <sup>30</sup> Tamás, M. J., Sharma, S. K., Ibstedt, S., Jacobson, T., Christen, P. (2014). Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, 4(1), 252-267.
- <sup>31</sup> Lee, J. C., Kim, J. E., Pletneva, E. V., Faraone-Mennella, J., Gray, H. B., Winkler, J. R. (2006). *Protein folding, misfolding, and disease* (pp. 9-60). Wiley, Chichester.
- <sup>32</sup> Pflugfelder, S. C., Stern, M. E. (2020). Biological functions of tear film. *Experimental eye research*, 197, 108115.
- <sup>33</sup> Forrester J, Dick A, McMenamin P, Roberts F, Pearlman E. *The Eye. Basic Science in Practice*. 4th ed. Saunders Ltd. Elsevier; 2015. <https://www.elsevier.com/books/the-eye/forrester/978-0-7020-5554-6>
- <sup>34</sup> Dartt, D. A., Willcox, M. D. (2013). Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Experimental eye research*, 117, 1–3.
- <sup>35</sup> Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., Li, X. R., Beuerman, R. W. (2012). In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics*, 75(13), 3877–3885.
- <sup>36</sup> Grus, F. H., Joachim, S. C., Pfeiffer, N. (2007). Proteomics in ocular fluids. *Proteomics. Clinical applications*, 1(8), 876–888.
- <sup>37</sup> Karnati, R., Laurie, D. E., Laurie, G. W. (2013). Lacritin and the tear proteome as natural replacement therapy for dry eye. *Experimental eye research*, 117, 39–52.
- <sup>38</sup> Lam, S. M., Tong, L., Duan, X., Petznick, A., Wenk, M. R., Shui, G. (2014). Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *Journal of lipid research*, 55(2), 289–298.
- <sup>39</sup> Rantamäki, A. H., Seppänen-Laakso, T., Oresic, M., Jauhiainen, M., Holopainen, J. M. (2011). Human tear fluid lipidome: from composition to function. *PloS one*, 6(5), e19553.
- <sup>40</sup> Butovich, I. A. (2013). Tear film lipids. *Experimental eye research*, 117, 4-27.
- <sup>41</sup> Chen, L., Zhou, L., Chan, E. C., Neo, J., Beuerman, R. W. (2011). Characterization of the human tear metabolome by LC–MS/MS. *Journal of proteome research*, 10(10), 4876-4882.
- <sup>42</sup> Semeraro, F., Costagliola, C., Cancarini, A., Gilberti, E., Tosco, E., Apostoli, P. (2012). Defining reference values of trace elements in the tear film: Diagnostic methods and possible applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 190-194.
- <sup>43</sup> Yu, L., Chen, Y., Xu, X., Dong, Q., Xiu, W., Chen, Q., Wang, J., He, C., Ye, J., Lu, F. (2021). Alterations in Peripheral B Cell Subsets Correlate with the Disease Severity of Human Glaucoma. *Journal of inflammation research*, 14, 4827–4838. <https://doi.org/10.2147/JIR.S329084>
- <sup>44</sup> Winiarczyk, M., Kaarniranta, K., Winiarczyk, S., Adaszek, Ł., Winiarczyk, D., Mackiewicz, J. (2018). Tear film proteome in age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 256(6), 1127–1139.
- <sup>45</sup> Winiarczyk, M., Winiarczyk, D., Michalak, K., Kaarniranta, K., Adaszek, Ł., Winiarczyk, S., Mackiewicz, J. (2021). Dysregulated Tear Film Proteins in Macular Edema Due to the Neovascular Age-Related Macular Degeneration Are Involved in the Regulation of Protein Clearance, Inflammation, and Neovascularization. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3060.

- <sup>46</sup> Xi, Y., Ju, R., Wang, Y. (2020). Roles of Annexin A protein family in autophagy regulation and therapy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 130, 110591. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110591>
- <sup>47</sup> Donato, R., R cannon, B., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., J Weber, D., L Geczy, C. (2013). Functions of S100 proteins. *Current molecular medicine*, 13(1), 24-57.
- <sup>48</sup> Chen, Y., Huang, K., Nakatsu, M. N., Xue, Z., Deng, S. X., Fan, G. (2013). Identification of novel molecular markers through transcriptomic analysis in human fetal and adult corneal endothelial cells. *Human molecular genetics*, 22(7), 1271–1279.
- <sup>49</sup> Soria, J., Durán, J. A., Etxebarria, J., Merayo, J., González, N., Reigada, R., García, I., Acera, A., Suárez, T. (2013). Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. *Journal of proteomics*, 78, 94–112.
- <sup>50</sup> Recalde, J. I., Duran, J. A., Rodriguez-Agirretxe, I., Soria, J., Sanchez-Tena, M. A., Pereiro, X., Suarez, T., Acera, A. (2019). Changes in tear biomarker levels in keratoconus after corneal collagen crosslinking. *Molecular vision*, 25, 12–21.
- <sup>51</sup> Li, C., Zhang, F., Wang, Y. (2010). S100A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularization. *Molecular vision*, 16, 2225–2235.
- <sup>52</sup> Riau, A. K., Wong, T. T., Beuerman, R. W., Tong, L. (2009). Calcium-binding S100 protein expression in pterygium. *Molecular vision*, 15, 335–342.
- <sup>53</sup> Jaworski, C. J., Aryankalayil-John, M., Campos, M. M., Fariss, R. N., Rowsey, J., Agarwalla, N., Reid, T. W., Dushku, N., Cox, C. A., Carper, D., Wistow, G. (2009). Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Molecular vision*, 15, 2421–2434.
- <sup>54</sup> Baker, E. N., Baker, H. M. (2005). Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(22), 2531–2539.
- <sup>55</sup> Flanagan, J. L., Willcox, M. D. (2009). Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie*, 91(1), 35–43.
- <sup>56</sup> Clausen, R., Weller, M., Wiedemann, P., Heimann, K., Hilgers, R. D., Zilles, K. (1991). An immunochemical quantitative analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous. *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 229(2), 186–190.
- <sup>57</sup> Lawen, A., Lane, D. J. (2013). Mammalian iron homeostasis in health and disease: uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants & redox signaling*, 18(18), 2473–2507.
- <sup>58</sup> Li, Y.-Q., Guo, C. (2021). A Review on Lactoferrin and Central Nervous System Diseases. *Cells*, 10(7), 1810.
- <sup>59</sup> Grus, F. H., Podust, V. N., Bruns, K., Lackner, K., Fu, S., Dalmaso, E. A., Wirthlin, A., Pfeiffer, N. (2005). SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(3), 863-876.
- <sup>60</sup> Kawashima M, Kawakita T, Inaba T, Okada N, Ito M, Shimmura, S., Watanabe, M., Shinmura, K., Tsubota, K. (2012) Dietary Lactoferrin Alleviates Age-Related Lacrimal Gland Dysfunction in Mice. *PLOS ONE* 7(3): e33148.
- <sup>61</sup> Ibuki, M., Shoda, C., Miwa, Y., Ishida, A., Tsubota, K., Kurihara, T. (2020). Lactoferrin has a therapeutic effect via HIF inhibition in a murine model of choroidal neovascularization. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 174.

- <sup>62</sup> Kijlstra, A., Jeurissen, S. H., Koning, K. M. (1983). Lactoferrin levels in normal human tears. *British Journal of Ophthalmology*, 67(3), 199-202.
- <sup>63</sup> Gonzalez-Iglesias, H., Alvarez, L., García, M., Petrash, C., Sanz-Medel, A., Coca-Prados, M. (2014). Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(2), 201–208.
- <sup>64</sup> Álvarez-Barrios, A., Álvarez, L., García, M., Artime, E., Pereiro, R., González-Iglesias, H. (2021). Antioxidant Defenses in the Human Eye: A Focus on Metallothioneins. *Antioxidants*, 10(1), 89.
- <sup>65</sup> Vasák, M., Hasler, D. W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current opinion in chemical biology*, 4(2), 177–183. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00082-x](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00082-x)
- <sup>66</sup> Tate, D. J., Jr, Newsome, D. A., Oliver, P. D. (1993). Metallothionein shows an age-related decrease in human macular retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(7), 2348–2351.
- <sup>67</sup> Rodríguez-Menéndez, S., García, M., Fernández, B., Álvarez, L., Fernández-Vega-Cueto, A., Coca-Prados, M., Pereiro, R., González-Iglesias, H. (2018). The Zinc-Metallothionein Redox System Reduces Oxidative Stress in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Nutrients*, 10(12), 1874.
- <sup>68</sup> Chen, L., Wu, W., Dentchev, T., Zeng, Y., Wang, J., Tsui, I., Tobias, J. W., Bennett, J., Baldwin, D., Dunaief, J. L. (2004). Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Experimental eye research*, 79(2), 239–247.
- <sup>69</sup> Biswal, M. R., Ahmed, C. M., Ildefonso, C. J., Han, P., Li, H., Jivanji, H., Mao, H., Lewin, A. S. (2015). Systemic treatment with a 5HT1a agonist induces anti-oxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress. *Experimental eye research*, 140, 94-105.
- <sup>70</sup> Micera, A., Di Zazzo, A., Esposito, G., Longo, R., Foulsham, W., Sacco, R., Sgrulletta, R., Bonini, S. (2018). Age-related changes to human tear composition. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(5), 2024-2031.
- <sup>71</sup> Kondkar, A. A., Azad, T. A., Almobarak, F. A., Kalantan, H., Al-Obeidan, S. A., Abu-Amero, K. K. (2018). Elevated levels of plasma tumor necrosis factor alpha in patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, 12, 153.
- <sup>72</sup> Fukumoto, H., Rosene, D. L., Moss, M. B., Raju, S., Hyman, B. T., Irizarry, M. C. (2004).  $\beta$ -secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *The American journal of pathology*, 164(2), 719-725.
- <sup>73</sup> Saatci, A. O., Irkeç, M., Özgüneş, H. (1991). Zinc in tears. *Ophthalmic research*, 23(1), 31-32.
- <sup>74</sup> Wei, X. E., Markoulli, M., Millar, T. J., Willcox, M. D., Zhao, Z. (2012). Divalent cations in tears, and their influence on tear film stability in humans and rabbits. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(7), 3280-3285
- <sup>75</sup> Framroze, Z., Conroy, C. (2016). Measuring the Change in Zinc Ion Concentration in Eye Tear Fluid between Healthy and Parasite Infected Individuals: Relationship between Zinc Ions in Tear Fluid and Parasitic Infection by Soil-Transmitted Helminths. *J Med Diagnostic Methods*. 05(04):8-11.
- <sup>76</sup> Rentka, A., Koroskenyi, K., Harsfalvi, J., Szekanecz, Z., Szucs, G., Szodoray, P., Kemeny-Beke, A. (2017). Evaluation of commonly used tear sampling methods and their relevance in subsequent biochemical analysis. *Annals of clinical biochemistry*, 54(5), 521-529.

- <sup>77</sup> Green-Church, K. B., Nichols, K. K., Kleinholz, N. M., Zhang, L., Nichols, J. J. (2008). Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Molecular vision*, *14*, 456.
- <sup>78</sup> Hirayama, T. (2019). Fluorescent probes for the detection of catalytic Fe (II) ion. *Free Radical Biology and Medicine*, *133*, 38-45.
- <sup>79</sup> Biesemeier, A., Yoeruek, E., Eibl, O., Schraermeyer, U. (2015). Iron accumulation in Bruch's membrane and melanosomes of donor eyes with age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, *137*, 39-49.
- <sup>80</sup> Wong, R. W., D CHIMENE, R. I. C. H. A., Hahn, P., Green, W. R., Dunaief, J. L. (2007). Iron toxicity as a potential factor in AMD. *Retina*, *27*(8), 997-1003.
- <sup>81</sup> Dunaief, J. L. (2006). Iron induced oxidative damage as a potential factor in age-related macular degeneration: the Cogan Lecture. *Investigative ophthalmology visual science*, *47*(11), 4660-4664.
- <sup>82</sup> Hahn, P., Milam, A. H., Dunaief, J. L. (2003). Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, *121*(8), 1099–1105.
- <sup>83</sup> Jünemann, A. G., Stopa, P., Michalke, B., Chaudhri, A., Reulbach, U., Huchzermeyer, C., Schlötzer-Schrehardt, U., Kruse, F. E., Zrenner, E., Rejdak, R. (2013). Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exudative age-related macular degeneration: a case-control study. *PloS one*, *8*(2), e56734.
- <sup>84</sup> Pineles, S. L., Wilson, C. A., Balcer, L. J., Slater, R., Galetta, S. L. (2010). Combined optic neuropathy and myelopathy secondary to copper deficiency. *Survey of ophthalmology*, *55*(4), 386–392.
- <sup>85</sup> Belbraouet, S., Biaudet, H., Tébi, A., Chau, N., Gray-Donald, K., Debry, G. (2007). Serum zinc and copper status in hospitalized vs. healthy elderly subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, *26*(6), 650–654.
- <sup>86</sup> Wills, N. K., Ramanujam, V. M., Kalariya, N., Lewis, J. R., van Kuijk, F. J. (2008). Copper and zinc distribution in the human retina: relationship to cadmium accumulation, age, and gender. *Experimental eye research*, *87*(2), 80–88.
- <sup>87</sup> Erie, J. C., Good, J. A., Butz, J. A., Pulido, J. S. (2009). Reduced zinc and copper in the retinal pigment epithelium and choroid in age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*, *147*(2), 276–282.e1.
- <sup>88</sup> Saris, N. E., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A., Lewenstam, A. (2000). Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *294*(1-2), 1–26.
- <sup>89</sup> Heesterbeek, T. J., Rouhi-Parkouhi, M., Church, S. J., Lechanteur, Y. T., Lorés-Motta, L., Kouvatso, N., Clark, S. J., Bishop, P. N., Hoyng, C. B., den Hollander, A. I., Unwin, R. D., Day, A. J. (2020). Association of plasma trace element levels with neovascular age-related macular degeneration. *Experimental eye research*, *201*, 108324.
- <sup>90</sup> Chang, J. J., Mack, W. J., Saver, J. L., Sanossian, N. (2014). Magnesium: potential roles in neurovascular disease. *Frontiers in neurology*, *5*, 52.
- <sup>91</sup> van Leeuwen, E. M., Emri, E., Merle, B. M. J., Colijn, J. M., Kersten, E., Cougnard-Gregoire, A., Dammeier, S., Meester-Smoor, M., Pool, F. M., de Jong, E., Delcourt, C., Rodriguez-Bocanegra, E., Biarnés, M., Luthert, P.J., Ueffing, M., Klaver, C.C.W., Nogoceke, E., den Hollander, A. I., Lengyel, I. (2018). A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Progress in retinal and eye research*, *67*, 56-86.

<sup>92</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Vandenbroucke, R. E., Vanhaecke, F. (2020). High-precision isotopic analysis of Mg and Ca in biological samples using multi-collector ICP-mass spectrometry after their sequential chromatographic isolation - Application to the characterization of the body distribution of Mg and Ca isotopes in mice. *Analytica chimica acta*, 1130, 137–145.

# **CAPÍTULO 2**

# Nanoclústeres fluorescentes de plata como marcas de anticuerpos en un inmunoensayo competitivo para la proteína factor H del complemento

## 1. Introducción

La proteína factor H del complemento (CFH), un componente constitutivo de las drusas<sup>1,2</sup>, está codificada por el gen *CFH*, cuyas variantes genéticas han sido identificadas fuertemente asociada con mayor riesgo del desarrollo de la DMAE<sup>3,4</sup>. La proteína CFH se secreta al torrente sanguíneo y tiene un papel esencial en la regulación del sistema del complemento. Por lo tanto, la CFH alterada o disfuncional podría conducir a una inflamación local crónica que puede estar asociada con la formación de drusas y, por lo tanto, con el inicio y la progresión de la DMAE<sup>5,6</sup>. En consecuencia, los niveles séricos de CFH podrían ser de interés para evaluar el inicio o progresión de la DMAE, aunque hasta la fecha no se hay consenso sobre su aplicabilidad como biomarcador molecular<sup>7,8,9</sup>. Para poder confirmar la existencia de alteraciones de esta proteína en el suero de pacientes con DMAE es necesario un método altamente sensible para la determinación de CFH en suero humano, así como en muestras procedentes de depósitos extracelulares (drusas), fluidos oculares, o también para estudiar modelos celulares *in vitro* que secretan CFH<sup>1,10,11</sup>.

Los colorantes orgánicos y los puntos cuánticos semiconductores o *quantum dots* (QDs) se encuentran entre las marcas fluorescentes más utilizadas para aplicaciones analíticas en el campo biomédico. Sin embargo, los fluoróforos orgánicos suelen ser muy susceptibles al fotoblanqueo o *photobleaching*, aunque son destacables los esfuerzos por desarrollar compuestos luminiscentes más fotoestables, como los complejos de iridio (III)<sup>12</sup>. Por otro lado, los QDs suelen contener especies metálicas altamente tóxicas (por ejemplo, CdSe) y sufren destellos intermitentes de fotoluminiscencia, lo que restringe su uso. A esas marcas, se deben incluir los nanoclústeres (NCs) de metales luminiscentes solubles en agua<sup>13</sup>. La investigación sobre

esta última clase de etiquetas fluorescentes ha sido impulsada por las propiedades de los NCs metálicos, como una fuerte fotoluminiscencia, grandes desplazamientos de Stokes, buena fotoestabilidad y baja toxicidad<sup>14, 15</sup>. Los NCs fotoluminiscentes sintetizados y utilizados con mayor frecuencia están constituidos por oro<sup>16,17</sup>. No obstante, se ha demostrado que los NCs de plata (AgNCs)<sup>18,19,20</sup> emiten una alta fotoluminiscencia y su aplicabilidad puede ser altamente prometedora.

Los AgNCs sintetizados con moldes de ADN ofrecen aplicaciones interesantes<sup>21</sup>, incluido el uso de ADN-AgNCs para la detección de ácidos nucleicos<sup>22</sup> y factores de transcripción<sup>23</sup>. Además, otros moldes o agentes estabilizadores como proteínas, polímeros y dendrímeros también se han utilizado para la síntesis de NCs metálicos<sup>24</sup>. Desafortunadamente, un inconveniente relacionado con el uso de moldes de grandes dimensiones para la formación de NCs, es la dificultad de eliminar el exceso de moldes que han quedado libres en disolución. Además, se ha observado que los blancos de la reacción de síntesis de algunos moldes, como aquellos que constituidos por polímeros de poli(etilenimina) y dendrímeros de poliamidoamina, emiten una alta fluorescencia. Por otro lado, los ligandos de tiolato son una opción habitual para sintetizar NCs metálicos<sup>25</sup>. En particular, se ha descrito que el uso de pequeños agentes estabilizantes como el ácido lipoico puede dar lugar a NCs metálicos estables y altamente luminiscentes<sup>17-29</sup> facilitando también su proceso de purificación.

## **2. Objetivos**

Con objeto de analizar en suero una de las principales proteínas relacionadas con la DMAE, el CFH, que está presente en los depósitos extracelulares observados en pacientes con DMAE, cuya oligomerización se ve afectada por metales y cuyos niveles séricos pueden verse alterados durante el transcurso de la enfermedad macular, se desarrollará un método de cuantificación absoluta, reproducible, multimodal y con menor límite de detección que los existentes en la actualidad.

Aunque los niveles de esta proteína presentes en la lágrima de pacientes con DMAE no son estadísticamente diferentes de los sujetos control, sí que se han

observado niveles alterados de CFH en el suero de pacientes de otras poblaciones, así como de otras proteínas relacionadas con CFH en el suero de sujetos con la enfermedad tal y como se discutió en el Capítulo 1 de esta tesis doctoral. Las irreproducibilidades inherentes a los ensayos ELISA pueden contribuir a una mayor dispersión en las medidas, dificultando validar las posibles diferencias entre pacientes con DMAE e individuos sanos.

Con este fin, los nanoclústeres de plata (AgNCs) se evaluarán como marcas para el desarrollo de un fluoroinmunoensayo para el análisis de CFH en suero. La síntesis reductora de AgNCs usando ácido lipoico como ligando se optimizará variando diferentes parámetros. El diámetro promedio y la estructura de los AgNC se determinarán por HR-TEM y la concentración de plata se cuantificará por ICP-MS. Seguidamente, se optimizará el marcaje del anticuerpo CFH con AgNC. Posteriormente se desarrollará un fluoroinmunoensayo competitivo y se compararán los resultados con los obtenidos por un kit ELISA comercial. Finalmente, el método se aplicará a la determinación de CFH en suero humano.

### **3. Procedimiento Experimental**

#### **3.1. Materiales y reactivos**

- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (99.9% pureza; Alfa Aesar, Thermo Fisher, Kandel, Germany)
- Ácido lipoico (en polvo, > 98% pureza; Across Organics, Geel, Bélgica)
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WIS, USA)
- Tetrahidrobórato de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) (en polvo, > 98% pureza, Sigma-Aldrich).
- Estándar de proteína CFH (MyBioSource, San Diego, USA)
- Anticuerpo Anti-human CFH producido en cabra (LSBio, Seattle, USA)
- 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (en polvo, 98% pureza, Across Organics)
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (en polvo, > 98% pureza; Sigma-Aldrich), Tris base (> 99% pureza; Sigma-Aldrich)

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Panreac, Barcelona, Spain)
- L-glutati3n reducido (>98% pureza; Sigma-Aldrich)
- Amicones de 3 y 100 kDa de tama1o de poro para ultracentrifugaci3n (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de r3bano picante (HRP) (mol3cula producida en conejo; Sigma-Aldrich)
- Kit de sustrato TMB (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.)
- Placas ELISA (Sterilin Limited, Newport UK)
- Portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.) con adhesivo aislador de silicona
- Alb3mina de suero bovino (BSA) (en polvo,  $\geq 99\%$  pureza; Sigma-Aldrich)
- Reactivos para preparaci3n de PBS: cloruro de sodio (Scharlab, Barcelona, Espa1a), cloruro de potasio (Panreac), fosfato de sodio dib3sico ( $\geq 98\%$ , Acros Organics) y fosfato de potasio monob3sico (Sigma- Aldrich).
- 3cido n3trico ( $\text{HNO}_3$ ), (65 % pureza, VWR International, Pensilvania, EE. UU.)
- 3cido clorh3drico (HCl) (37 % pureza, VWR International)
- Agua ultrapura desionizada, resistividad  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$  (Purelab Flex 3&4, ELGA-Veolia, Reino Unido)

### 3.2. Muestras

Se utilizaron muestras cl3nicas de suero humano de diferentes sujetos control obtenidas por personal especializado del Instituto Oftalmol3gico Fern3ndez-Vega (Oviedo, Espa1a) para investigar la aplicabilidad del inmunoensayo. La sangre se recogi3 en tubos Z Serum Sep Clot Activator de 5 mL recubiertos con part3culas microsc3picas de s3lice (Vacuette, Madrid, Espa1a). Los tubos se centrifugaron a  $1.800 \text{ g}$  durante 18 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y el sobrenadante (suero) se alicuot3 y almacen3 a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. El estudio se adhiere a los principios de la Declaraci3n de Helsinki sobre la investigaci3n biom3dica en seres humanos. Adem3s, se obtuvo la aprobaci3n 3tica total del Comit3 3tico de Investigaci3n Cl3nica del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Espa1a). Todos los sujetos incluidos en este estudio firmaron un consentimiento

informado. El método desarrollado para la cuantificación de CFH se verificó empleando un kit ELISA comercial para CFH, Ref 90635Hu (USCN Life Science Inc., Wuhan, China;) (96 pruebas).

### 3.3. Instrumentación

- Espectrofluorímetro (LS-50-B, Perkin Elmer, EE. UU.)
- Cubetas de fluorescencia Hellma®, cuarzo semi Micro Suprasil® (Sigma-Aldrich).
- Microscopio confocal (DM IRE2; Leica, Alemania; <https://www.leica-microsystems.com>) con un objetivo de inmersión en aceite del 63 %, utilizando una longitud de onda de excitación láser de 405 nm e integrando la fluorescencia para toda la superficie del pocillo.
- ICP-MS, modelo 7500ce (Agilent, EE. UU.)
- Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) (JEOL JEM-2100, Tokio, Japón)
- Lector de microplacas de absorbancia (ELX800; Bio-Tek, EE. UU.)
- Estufa (Mettler, Moscú, Rusia)
- Baño de ultrasonidos (JP Selecta, Barcelona, España)
- Minicentrífuga (Gyrozen, Daejeon, Corea del Sur)
- El procesamiento de datos de fluorescencia y la representación de gráficos del inmunoensayo se llevaron a cabo utilizando el software Image J y la web MyAssay (<https://www.myassays.com>), respectivamente.
- Espectrofluorómetro FS5 (Edinburgh Instruments, Livingston, Reino Unido)

### 3.4. Síntesis de AgNCs y determinación del rendimiento cuántico

En un vial protegido de la luz, se disolvieron 81,06 mg de ácido lipoico en 20 mL de agua ultrapura junto con 240  $\mu$ L de NaOH 2 M y 1 mL de una solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> 25 mM. Después de mezclar durante 5 min, se añadieron 2 mL de una solución de NaBH<sub>4</sub> 150 mM. Finalmente, la reacción se mantuvo a 9 °C bajo agitación durante 21

h. Posteriormente, el exceso de ligando y de agente reductor se eliminó por ultrafiltración (amicones de ultracentrifugación de tamaño de poro de 3 kDa) utilizando la siguiente secuencia: el primer ciclo a 2300 rpm durante 10 min y tres pasos de lavado con agua ultrapura a 2300 rpm durante 10 min. Los AgNCs se llevaron a un volumen igual al inicial. Los AgNCs purificados se almacenaron en nevera hasta su uso.

El rendimiento cuántico (QY) de la fluorescencia de los AgNCs se determinó con un método absoluto. Para tal fin, se utilizó una esfera integradora compuesta por un material fluoropolimérico de alta reflectancia.

### **3.5. Bioconjugación del anticuerpo anti-CFH con AgNCs e investigación de la capacidad de reconocimiento**

El marcaje del anticuerpo anti-CFH se realizó en un tubo Eppendorf, cubierto con papel de aluminio, donde se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-CFH ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) seguido de 188  $\mu\text{L}$  de AgNC en disolución Tris-EDTA con glutatión 3 mM (Ab:AgNCs, relación molar 1:3). A pesar de su naturaleza reductora, el glutatión no afecta a los puentes disulfuro que mantienen la estructura de los anticuerpos<sup>30</sup>. Seguidamente, se agregó una disolución de EDC y NHS (0,01 M) en un tampón Tris-EDTA con una relación 1:1. Después de 2 h de agitación constante a temperatura ambiente, se procedió a la purificación por ultracentrifugación (con amicones de tamaño de poro de 100 kDa): un primer ciclo de 5500 rpm durante 10 min y dos ciclos de lavado con agua ultrapura a 5500 rpm durante 5 min. El anticuerpo marcado se diluyó en 1 ml de PBS y se almacenó en el frigorífico.

Se realizó un inmunoensayo con detección espectrofotométrica (utilizando un anticuerpo secundario marcado con HRP) para investigar si las capacidades de reconocimiento del anticuerpo anti-CFH se mantienen después de ser marcado con los AgNCs. Para tal fin, se inmovilizó el patrón CFH sobre la superficie del pocillo ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) agregando 100  $\mu\text{L}$ /pocillo en una placa ELISA y se incubó a 38 °C durante 6 h. Posteriormente, se realizó un paso de bloqueo agregando BSA al 2 % en una disolución

de PBS 10 mM (pH = 7,6; 200  $\mu$ L/pocillo) y se mantuvo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se llevaron a cabo tres pasos de lavado con PBS 10 mM (pH = 7,6) y solución de Tween 20 al 0,05 % (200  $\mu$ L/pocillo). Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de anti-CFH marcado con AgNCs (1  $\mu$ g. $\text{mL}^{-1}$ ) y se mantuvieron a 38 °C durante 2 h. A continuación, se realizaron tres lavados (mismas condiciones que las detalladas al principio del párrafo). El anticuerpo marcado con peroxidasa, IgG-HRP anti-cabra (100  $\mu$ L/pocillo), se añadió con una dilución de 1:10000 en un tampón PBS-BSA-Tween 20. A continuación, la placa se incubó con las mismas condiciones descritas anteriormente. Se añadió el kit de sustrato TMB (TMB/peróxido de hidrógeno en una proporción de 1:1, 100  $\mu$ L/pocillo) después de lavar la placa. Finalmente, se agregaron 100  $\mu$ L/pocillo de ácido sulfúrico 2 M, lo que provocó un cambio de color de azul a amarillo. La medida de la señal se realizó con un lector de placas de absorbancia Elix 800 a 450 nm.

### 3.6. Fluoroimmunoensayo con AgNCs como marcas

Los pocillos de un portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina fueron tapizados con un estándar de proteína CFH (100  $\mu$ L, 5  $\mu$ g. $\text{mL}^{-1}$ ). El CFH se inmovilizó por reacción química con EDC (100  $\mu$ L de EDC, 0,0001 M) y se llevó a cabo la incubación a 38 °C durante 2 h. A continuación, se realizó la etapa de bloqueo, para lo cual se añadieron a cada pocillo 200  $\mu$ L de BSA (1% en PBS 10 mM, pH = 7,6). Se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Después, se realizaron tres pasos de lavado con una solución que contenía PBS 10 mM (pH = 7,6) y Tween 20 al 0,05 % (200  $\mu$ L/pocillo).

Por otro lado, los estándares de CFH diluidos en PBS (100  $\mu$ L) y el anticuerpo marcado (100  $\mu$ L de 10  $\mu$ g. $\text{mL}^{-1}$ ) se mezclaron en tubos Eppendorf con agitación mecánica durante 30 min. Seguidamente, la mezcla se agregó al pocillo correspondiente y se mantuvo a 38 °C durante 2 h en la oscuridad. Finalmente, se realizó el último paso de lavado y se midió la emisión de fluorescencia mediante microscopía láser confocal.

### **3.7. Determinación de CFH en suero**

Se investigó la aplicación del inmunoensayo desarrollado utilizando AgNCs como marcas para el análisis cuantitativo de la proteína CFH en suero humano (se analizaron tres muestras clínicas de suero, indicadas como SA, SB, SC). Fue necesaria una dilución del suero 1:200000 con PBS para ajustar los niveles basales de CFH en el rango lineal de la curva de calibración.

La determinación de CFH se verificó utilizando el kit ELISA comercial específico para CFH humano, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se agregaron 100  $\mu$ L de las muestras de suero diluidas 1:5000 con PBS o bien, 100  $\mu$ L de disoluciones estándar de CFH para la curva de calibración, a cada pocillo de la placa recubierta previamente con un anticuerpo monoclonal de CFH. La incubación se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C. Después, se añadió una preparación del anticuerpo policlonal conjugado con biotina específica para CFH (1 h, 37 °C), seguido de una incubación con avidina conjugada con HRP (30 min, 37 °C). A continuación, se añadió el sustrato TMB (TMB/peróxido de hidrógeno en proporción 1:1; 20 min, 37 °C). Finalmente, se detuvo la reacción enzima-sustrato mediante la adición de solución de ácido sulfúrico y se midió el cambio de color por espectrofotometría a 450 nm.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Optimización de la síntesis de AgNCs y caracterización**

En determinados estudios, se ha mencionado que la desaceleración de la cinética de la reacción disminuye la polidispersidad de los NCs<sup>25, 31</sup>. En este contexto, se investigaron en detalle los efectos de la concentración de NaBH<sub>4</sub>, el tiempo de reacción y la temperatura con el objetivo de sintetizar AgNCs con alta intensidad de fluorescencia y baja dispersión. En ciertos experimentos previos, con ácido lipoico como agente estabilizante, se evaluaron las temperaturas de incubación en el intervalo 20-40 °C y las relaciones NaBH<sub>4</sub>:ácido lipoico entre 1:1 y 5:1, siendo seleccionadas las condiciones a 25

°C y una relación  $\text{NaBH}_4$ :ácido lipoico 4:1. El tiempo de reacción fue de 90 min en tales condiciones. También se investigaron proporciones menores de  $\text{NaBH}_4$ :ácido lipoico y una temperatura más baja.

La Figura 30 muestra los espectros de fluorescencia obtenidos para los AgNCs sintetizados usando diferentes concentraciones de  $\text{NaBH}_4$  y manteniendo constantes el resto de los parámetros de síntesis. En todos los casos, los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos presentaron un máximo en torno a los 660 nm. Como se puede observar, la señal de fluorescencia aumenta cuando se emplean concentraciones más altas de  $\text{NaBH}_4$ . Sin embargo, para concentraciones superiores a 150 mM  $\text{NaBH}_4$  el aumento no es tan intenso. Por otro lado, se sabe que altas concentraciones de  $\text{NaBH}_4$  aumentan la polidispersidad de las AgNCs<sup>24</sup>. Por lo tanto, se seleccionó 150 mM de  $\text{NaBH}_4$  (correspondiente a una proporción de  $\text{NaBH}_4$ :ácido lipoico cercana a 1:1) como compromiso para experimentos adicionales.

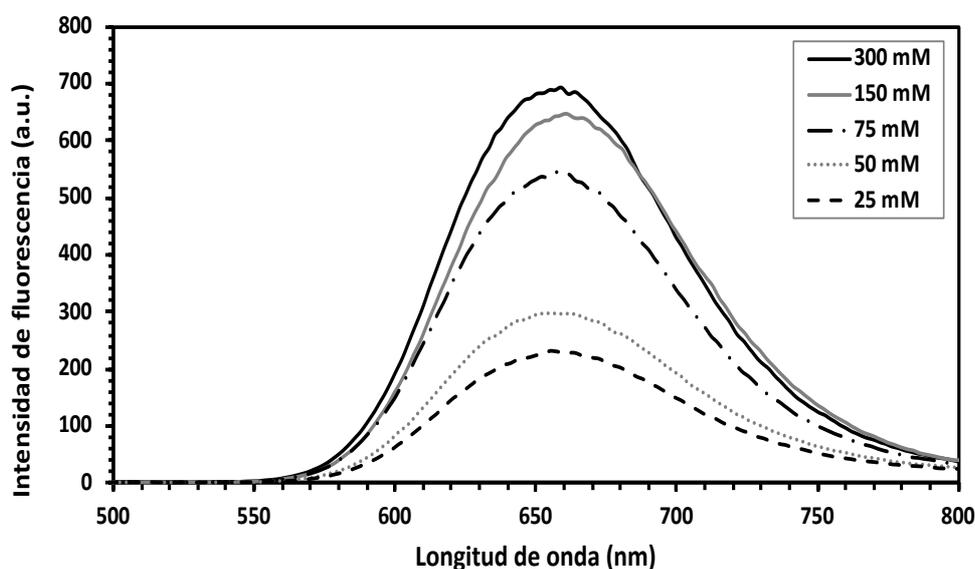


Figura 30. Efecto de la concentración de  $\text{NaBH}_4$  sobre la intensidad de fluorescencia de los AgNCs sintetizados. Las concentraciones del resto de reactivos precursores se mantuvieron constantes (longitud de onda de excitación: 430 nm). La síntesis se llevó a cabo durante 15 h a 9 °C.

En cuanto a la optimización del tiempo de reacción de la síntesis, la Figura 31 muestra las señales de fluorescencia medidas para AgNCs cada dos horas a lo largo de la reacción de síntesis a 9 °C. Como puede verse, la señal de fluorescencia aumenta con

el tiempo hasta alrededor de las 19 h y luego tiende a permanecer constante, por lo que el tiempo finalmente seleccionado para el proceso de síntesis fue de 21 h.

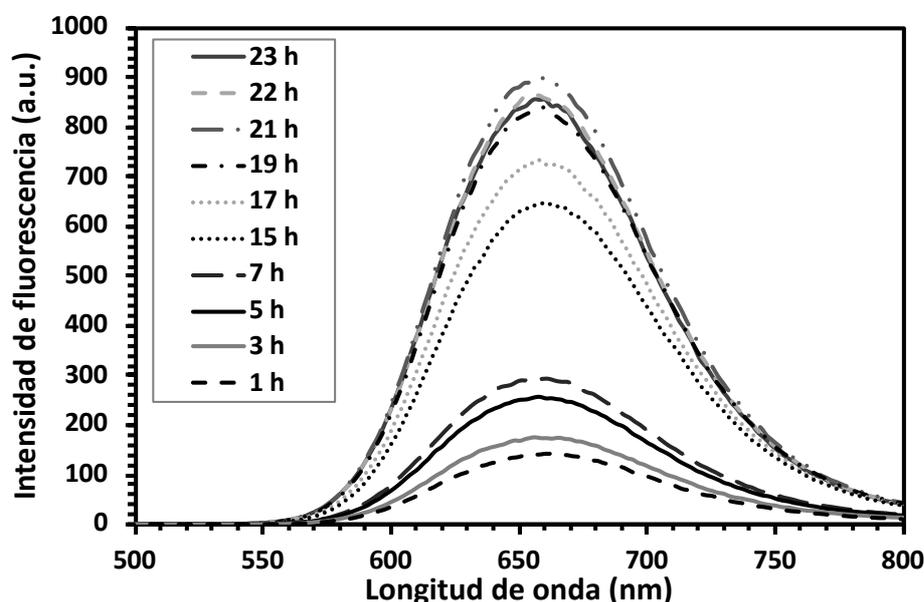


Figura 31. Influencia del tiempo de reacción de síntesis en los espectros de emisión de AgNCs (longitud de onda de excitación: 430 nm). Las concentraciones de todos los reactivos precursores se mantuvieron constantes. La síntesis se llevó a cabo a 9 °C.

Para evaluar el efecto de la temperatura de síntesis, se investigaron dos condiciones: 9 °C (experimentos anteriores) y 22 °C. Para esta comparación, con el fin de detener la reacción antes de alcanzar el equilibrio, las síntesis se realizaron con 50 mM de NaBH<sub>4</sub> y durante un tiempo de 15 h. La Figura 32 muestra que, debido a la mayor velocidad de reacción a alta temperatura, la intensidad de fluorescencia alcanzó valores más altos para la síntesis a 22 °C en comparación con la de 9 °C para el mismo tiempo de síntesis corto. El tamaño promedio de los AgNCs se calculó utilizando las imágenes obtenidas por HR-TEM. Para tal fin, se tomaron aleatoriamente medidas de diámetros de AgNCs a partir de las imágenes capturadas. Se obtuvo una mayor dispersión de AgNCs ( $3,73 \pm 0,3$  nm para 270 medidas individuales, intervalo de confianza del 99% obtenido con la distribución normal estándar) para la síntesis a 22 °C en comparación con la realizada a 9 °C. En este último caso, se obtuvieron AgNCs con un diámetro medio de  $2,64 \pm 0,1$  nm para 270 medidas individuales (intervalo de confianza del 99% obtenido con la distribución normal estándar). Esto confirma el papel positivo de emplear

velocidades de reacción más bajas (es decir, temperatura más baja) en la síntesis de AgNCs con menor polidispersidad.

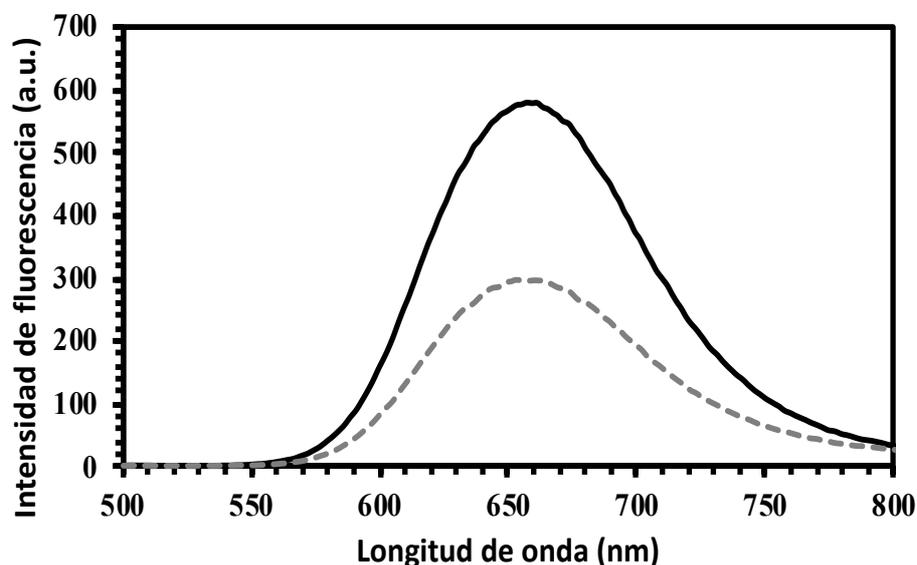


Figura 32. Comparación de la fluorescencia de AgNCs sintetizados a 9 °C (línea gris de discontinua) y 22 °C (línea negra). Las síntesis se llevaron a cabo con NaBH<sub>4</sub> 50 mM y las reacciones se detuvieron después de 15 h.

El diámetro de los AgNCs sintetizados con el procedimiento seleccionado (es decir, 9 °C, 21 h y NaBH<sub>4</sub> 150 mM) se determinó mediante HR-TEM. La Figura 33a muestra una imagen representativa, obteniendo un valor de  $2,9 \pm 0,1$  nm (intervalo de confianza del 99 % obtenido con la distribución normal estándar) mediante la medida de 270 AgNCs individuales. Esto corresponde a un volumen de AgNCs de  $12,90$  nm<sup>3</sup> (considerando que la nanoestructura es esférica). Además, se observó una estructura cristalina cúbica centrada en la cara del material (Figura 33 b) mediante el patrón de difracción de electrones de área seleccionada (SAED). La plata fue encontrada como el elemento principal por EDX. También se observaron oxígeno, carbono y azufre (atribuidos al ácido lipoico utilizado como ligando). El rendimiento del procedimiento seleccionado para la síntesis de AgNCs fue del  $84,3 \pm 3\%$ . Este valor se obtuvo mediante ICP-MS, comparando la concentración de plata elemental en la fase acuosa que contenía los AgNCs purificados (digeridos con agua regia) y la concentración de plata elemental antes de iniciar la síntesis. Por otro lado, se obtuvo un rendimiento cuántico del 14%.

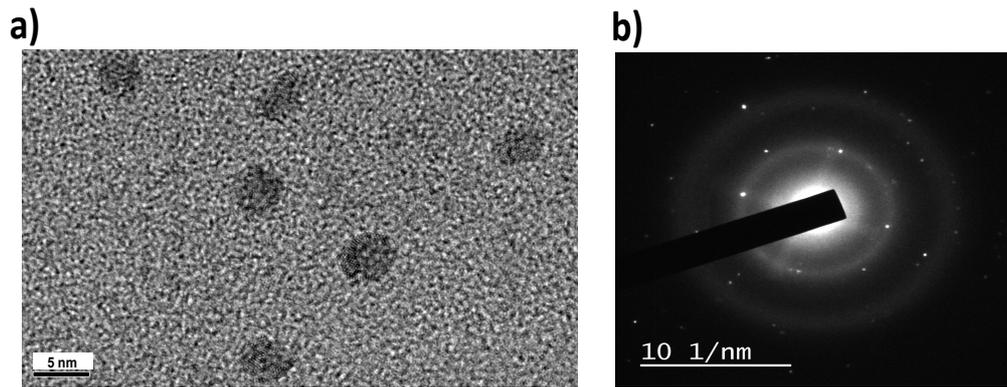


Figura 33. Caracterización morfológica de los AgNCs (obtenidas tras 21 h de síntesis a 9 °C, utilizando NaBH<sub>4</sub> 150 mM). a) imagen HR-TEM de AgNCs, y b) patrón SAED de un AgNC.

Como se puede ver en la Figura 34, la emisión de fluorescencia mostró intensidades más altas para medios neutros ligeramente básicos. La emisión de fluorescencia de los AgNCs purificados fue constante en condiciones de oscuridad durante al menos una semana (a temperatura ambiente o en el frigorífico) cuando se almacenaron en agua ultrapura. Sin embargo, cuando se expuso a la luz solar (los experimentos se realizaron a temperatura ambiente), la señal de fluorescencia después de 1 h de exposición fue aproximadamente el 90% de la inicial, mientras que después de 6 h fue aproximadamente del 50% (Figura 35). Curiosamente, se ha observado que cuando los AgNCs purificados estaban en una disolución que contenía un eliminador eficiente de oxígeno disuelto, como sulfito de sodio  $6 \times 10^{-3} \text{ M}^{32}$ , la emisión de AgNC se mantuvo constante. Por lo tanto, es posible confirmar el papel de la fotooxidación en la disminución de la fluorescencia de las AgNCs<sup>33</sup>. Finalmente, es interesante señalar que las suspensiones con AgNCs no purificadas (es decir, en la solución de síntesis) tienen una mayor estabilidad. La emisión observada para esos AgNCs después de tres meses de almacenamiento en el refrigerador está en el mismo orden de magnitud que su fluorescencia inicial.

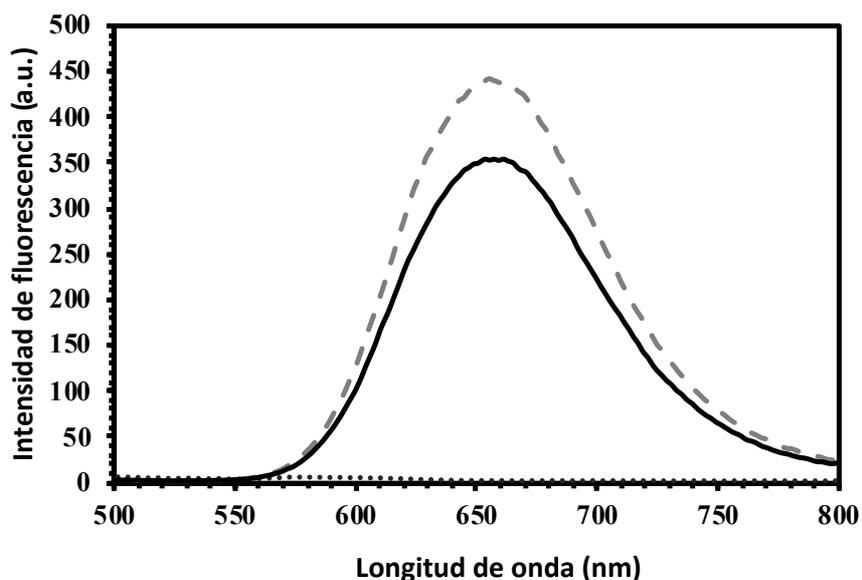


Figura 34. Espectros de emisión de AgNCs a diferentes pHs: pH 12 (línea gris discontinua), pH 7,5 (línea negra continua) y pH 4,8 (línea negra a puntos).

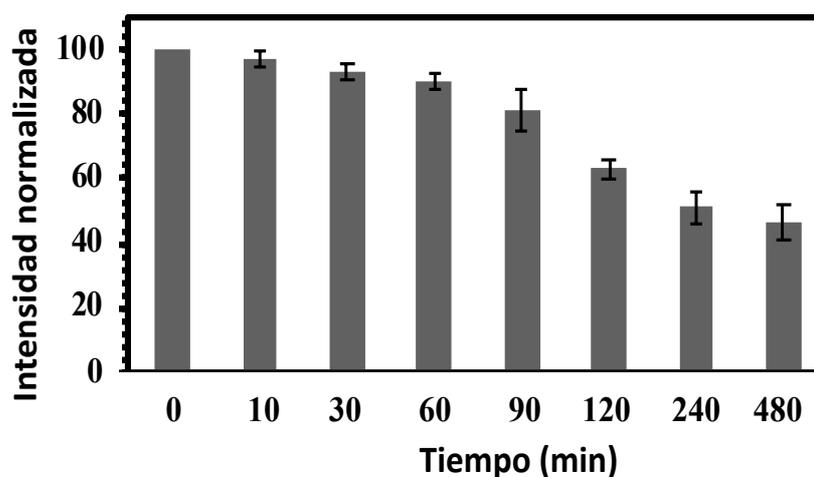


Figura 35. Estudio de la fotoestabilidad de AgNCs en agua ultrapura expuesta a luz ambiental diurna y temperatura ambiente.

Para una mayor aplicación de los AgNCs como marcas en el desarrollo de inmunoensayos reproducibles, se requiere conocer la concentración de AgNCs en medio acuoso. Con este objetivo, inicialmente se calculó la masa de cada celda unitaria. Se obtuvo un valor de  $7,16 \times 10^{-22}$  g/celda teniendo en cuenta que cada celda unidad contiene cuatro átomos de plata. Esto corresponde a un volumen de celda unitaria de  $6,82 \times 10^{-23}$  cm<sup>3</sup>/celda ( $10,5$  g cm<sup>-3</sup> es la densidad de plata). Posteriormente, al dividir el

volumen de AgNC por el volumen de la celda unitaria, se obtiene un valor promedio de 188 redes cristalinas por AgNCs, lo que corresponde a un promedio de 753 átomos de plata por NC.

Considerando la concentración molar de plata elemental en el líquido purificado de AgNCs medido por ICP-MS, así como el número de átomos de plata por NC, se determinó una concentración de AgNCs de  $6,40 \times 10^{14}$  NCs.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.2. Marcaje del anticuerpo anti-CFH con AgNC**

Se optimizó el marcaje del anticuerpo anti-CFH con los AgNCs fluorescentes con el objetivo de obtener una alta emisión de la inmunosonda manteniendo, en la mayor medida posible, los sitios de unión del anticuerpo al antígeno. Para tal fin, se investigaron relaciones molares 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10 de Ab:AgNCs en la disolución de marcaje (1:3 fue la relación más baja ensayada para tener una señal fluorescente alta).

Se realizó un estudio por detección espectrofotométrica para comprobar las capacidades de reconocimiento de los Ab después de ser marcados con las diferentes ratios de AgNCs. Los resultados, recopilados en la Tabla 8, muestran que para la relación 1:3 la absorbancia fue ligeramente menor que para el anticuerpo sin marcar (2,31 frente a 2,54, respectivamente). Sin embargo, las señales de absorbancia para bioconjugados con proporciones más altas de AgNCs son mucho más bajas (por ejemplo, 1,69 con una proporción molar de 1:10), lo que indica que un porcentaje importante de epítomos ya no están disponibles. Por lo tanto, se seleccionó una relación molar Ab:AgNCs de 1:3 para la síntesis del Ab marcado. El espectro fluorescente de esta inmunosonda mostró una señal de emisión máxima a una longitud de onda similar a la de los AgNCs en solución (Figura 36).

Tabla 7. Absorbancia medida con el inmunoensayo ELISA para estudiar la influencia de la relación molar Ab:AgNCs en las capacidades de reconocimiento

Ratio Ab:AgNC	Absorbancia
Blanco	0,211 ± 0,014
Ab sin AgNCs	2,538 ± 0,114
1:3	2,306 ± 0,102
1:5	1,784 ± 0,057
1:7	1,752 ± 0,071
1:10	1,689 ± 0,076

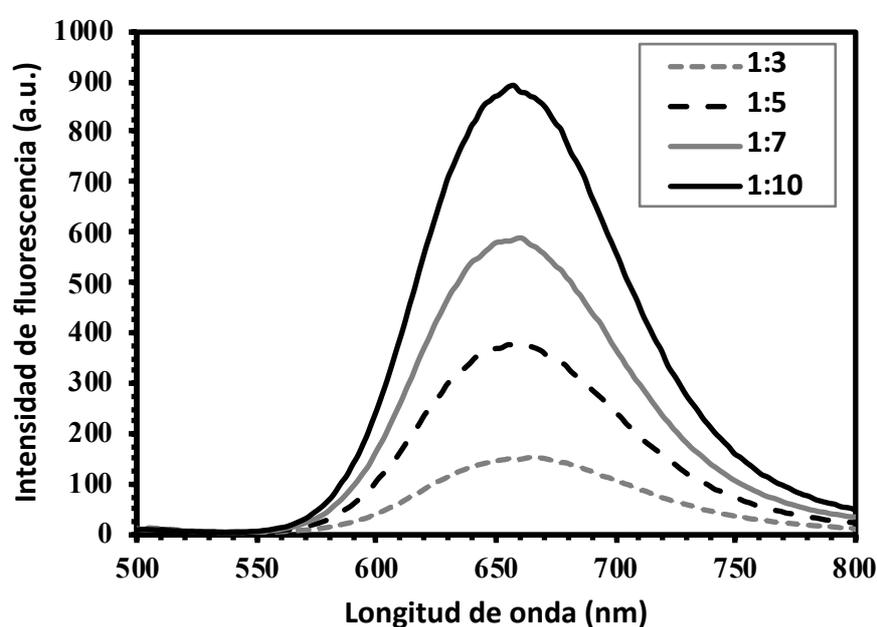


Figura 36. Espectros de emisión obtenidos para ratios 1:3, 1:5, 1:7 y 1:10 de "anti-CFH Ab:AgNCs" añadidos a la solución para la preparación del bioconjugado.

### 4.3. Inmunoensayo para la determinación de CFH en suero humano

Para la determinación de CFH usando la fluoroinmunosonda desarrollada se investigó un formato competitivo donde la proteína CFH presente en las muestras y la CFH previamente inmovilizada y de concentración conocida compiten por el anticuerpo anti-CFH marcado con AgNCs. En la optimización del inmunoensayo se tuvo especial

cuidado con la concentración de CFH utilizada para la inmovilización en los pocillos del portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina (primer paso del procedimiento de inmunoensayo, como se describe en la sección *Procedimientos Experimentales*). Se evaluaron tres concentraciones de soluciones de CFH para la inmovilización ( $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  y  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y se obtuvieron rectas de calibración para cada una de ellas utilizando estándares de CFH preparados a diferentes concentraciones en PBS. El límite de detección (LD) más bajo fue de  $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$  y se obtuvo al utilizar  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de CFH para la inmovilización (Figura 37 muestra el gráfico de calibración correspondiente). Bajo tales condiciones experimentales, el rango lineal (IC20-IC80) se extendió de 1,16 a  $23,0 \text{ ng.mL}^{-1}$ . Los LD y los rangos lineales para las otras condiciones analizadas se recopilan en la Tabla 9. El LD logrado con el método actual (utilizando  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de CFH para la inmovilización) compite favorablemente con los LD publicados anteriormente para la determinación de CFH: se estableció un LD de  $4,86 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para un ensayo inmunonefelométrico<sup>34</sup>, LD de  $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  y  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  para dos inmunoensayos ELISA<sup>35,36</sup>, mientras que el LD del kit comercial es de  $2.15 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

Tabla 8. Comparación de los límites de detección y rangos lineales obtenidos usando diferentes concentraciones de CFH para la inmovilización en portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina.

Concentración de CFH inmovilizada ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Límite de detección ( $\text{ng.mL}^{-1}$ )	Rango lineal IC20-IC80 ( $\text{ng.mL}^{-1}$ )
5	0,4	1,16 – 23,0
10	5,3	11,8 – 180,2
20	13,2	30,2 – 194,4

Se evaluó el fluoroinmunoensayo basado en AgNCs para la determinación de CFH en suero humano. Se llevó a cabo una dilución 1:200000 de los sueros con PBS para ajustar los niveles de CFH en las muestras de suero dentro del rango lineal. Para evaluar el efecto de la matriz del suero, se añadieron concentraciones conocidas de CFH a la muestra de suero diluido denominada SA. La Figura 37 recopila los datos (marcados como cuadrados en el gráfico de calibración) obtenidos para la muestra de SA diluida y

para las alícuotas enriquecidas en las que se añadió CFH en diferentes concentraciones al suero humano de SA diluido. Como se muestra, dichas alícuotas de suero enriquecidas encajan en el gráfico de calibración obtenido para los estándares de CFH. Por lo tanto, es posible cuantificar CFH en muestras de suero diluido utilizando un gráfico de calibración realizado en PBS. Además, se calculó el porcentaje de recuperación, obteniendo un valor de 80,9%.

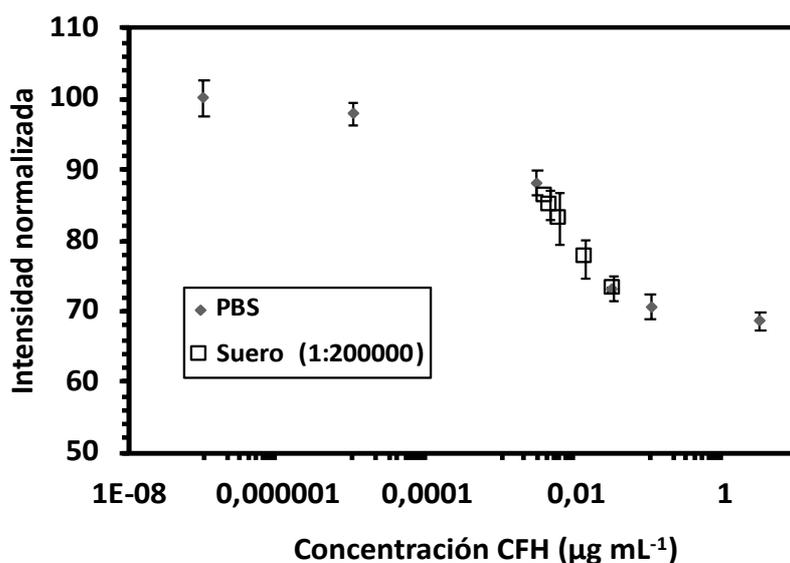


Figura 37. Gráfico de calibración del fluoroinmunoensayo para estándares de CFH y para una muestra de suero enriquecida con diferentes concentraciones de CFH (dilución de suero 1:200000), usando 430 nm como longitud de onda de excitación y midiendo la emisión a 660 nm.

Las concentraciones de CFH en muestras de suero humano obtenidas con el fluoroinmunoensayo utilizando AgNCs como marcas se presentan en la Tabla 10. Además, la Tabla 10 muestra las concentraciones de CFH obtenidas para las mismas muestras de suero analizadas con un kit comercial para la determinación de CFH, lo que demuestra la aplicabilidad de la metodología aquí desarrollada al obtenerse valores similares y reproducibles.

Tabla 9. Determinación de CFH en sueros humanos mediante el procedimiento de inmunoensayo AgNCs. Los resultados se comparan con los obtenidos con un kit ELISA comercial. En ambos métodos, las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de tres medidas independientes.

Referencia de la muestra	Inmunoensayo competitivo con AgNCs ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Kit comercial ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
SA	608 $\pm$ 52	702 $\pm$ 76
SB	1494 $\pm$ 90	1374 $\pm$ 53
SC	944 $\pm$ 64	935 $\pm$ 91

## 5. Conclusiones

Los AgNCs fluorescentes sintetizados en este capítulo han sido evaluados en términos de rendimiento de síntesis, dispersidad, átomos de plata por NC y concentración de AgNC en medios acuosos, y se han utilizado como marcas del anticuerpo anti-CFH. Se investigó el procedimiento de marcaje de anticuerpo con AgNCs para encontrar una relación Ab:AgNC óptima en términos de fluorescencia y capacidades de reconocimiento del Ab. El uso de la carbodiimida para el marcaje de Ab podría permitir utilizar los AgNCs como marcas para otros anticuerpos.

Las prestaciones analíticas del inmunoensayo con marcas de AgNCs mostró un mejor límite de detección ( $0,4 \text{ ng mL}^{-1}$ ) que el alcanzado por los kits ELISA comerciales actuales ( $2,15 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Se demostró con éxito su aplicabilidad para la determinación de CFH en suero humano como prueba de concepto. El bajo límite de detección obtenido apunta a un mayor uso de esta inmunosonda para el análisis de otro tipo de muestras biológicas con concentraciones más bajas de CFH o volúmenes de muestra más pequeños (p. ej., drusas, fluidos oculares y células).

Además, cabe destacar que el desarrollo de este tipo de pequeñas etiquetas metálicas y su bioconjugación resulta de gran interés para lograr determinaciones altamente sensibles y multiplexadas de proteínas empleando detección basada ICP-MS.

Este hecho se puede atribuir principalmente al pequeño tamaño de los AgNCs (2,9 nm) y a la alta amplificación proporcionada (se encontraron en promedio 753 átomos de plata por NC). Además, tanto la sensibilidad como las capacidades de multiplexación del ICP-MS se pueden mejorar mediante el uso de NCs enriquecidos isotópicamente. En el siguiente capítulo se detallarán los experimentos realizados en este sentido.

---

### Referencias bibliográficas

---

- <sup>1</sup> Crabb, J.W. (2014) The proteomics of drusen. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4:a017194.
- <sup>2</sup> Wang, L., Clark, M.E., Crossman, D.K., Kojima, K., Messinger, J.D., Mobley, J.A., Curcio, C.A. (2010) Abundant lipid and protein components of drusen. *PLoS One*, 5:e10329.
- <sup>3</sup> Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., San Giovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., Bracken, M.B., Ferris, F.L., Ott, J., Barnstable, C., Hoh, J. (2005) Complement factor H polymorphism in age related macular degeneration. *Science*, 308:385–389.
- <sup>4</sup> Geerlings, M.J., de Jong, E.K., den Hollander, A.I. (2017) The complement system in age-related macular degeneration: a review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Molecular Immunology*, 84:65–76.
- <sup>5</sup> Triebwasser, M.P., Roberson, E.D., Yu, Y., Schramm, E.C., Wagner, E.K., Raychaudhuri, S., Seddon, J.M., Atkinson, J.P. (2015) Rare variants in the functional domains of complement factor H are associated with age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56:6873–6878.
- <sup>6</sup> Geerlings, M.J., Kremlitzka, M., Bakker, B., Nilsson, S.C., Saksens, N.T., Lechanteur, Y.T., Pauper, M., Corominas, J., Fauser, S., Hoyng, C.B., Blom, A.M., de Jong, E.K., den Hollander, A.I. (2017) The functional effect of rare variants in complement genes on C3b degradation in patients with age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmology*, 135:39–46.
- <sup>7</sup> Gemenetzi, M., Lotery, A.J. (2016) Complement pathway biomarkers and age-related macular degeneration. *Eye*, 30:1–14.
- <sup>8</sup> Sharma, N. K., Gupta, A., Prabhakar, S., Singh, R., Sharma, S. K., Chen, W., Anand, A. (2013). Association between CFH Y402H polymorphism and age-related macular degeneration in North Indian cohort. *PLoS one*, 8(7), e70193.
- <sup>9</sup> Lorés-Motta, L., van Beek, A.E., Willems, E., Zandstra, J., van Mierlo, G., Einhaus, A., Mary, J.L., Stucki, C., Bakker, B., Hoyng, C. B., Fauser, S., Clark, S. J., de Jonge, M.I., Nogoceke, E., Koertvely, E., Jongerius, I., Kuijpers, T. W., den Hollander, A. I. (2021). Common haplotypes at the CFH locus and low-frequency variants in CFHR2 and CFHR5 associate with systemic FHR concentrations and age-related macular degeneration. *The American Journal of Human Genetics*, 108(8), 1367-1384.
- <sup>10</sup> Kim, Y.H., He, S., Kase, S., Kitamura, M., Ryan, S.J., Hinton, D.R. (2009) Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes Archive for Clinical Experimental Ophthalmology*, 247:651–659.
- <sup>11</sup> Chen, M., Forrester, J.V., Xu, H. (2007) Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Experimental Eye Research*, 84:635–645.
- <sup>12</sup> Vellaisamy, K., Li, G., Ko, C.N., Zhong, H.J., Fatima, S., Kwan, H.Y., Wong, C.Y., Kwong, W.J., Tan, W., Leung, C.H., Ma, D.L. (2018) Cell imaging of dopamine receptor using agonist labeling iridium (III) complex. *Chemical Science*, 9:1119–1125.
- <sup>13</sup> Zhan, J.J., Cheng, F.F., Li, J.J., Zhu, J.J., Lu, Y. (2016) Fluorescent nanoprobes for sensing and imaging of metal ions: Recent advances and future perspectives. *Nano Today*, 11:309–329.
- <sup>14</sup> Zhang, L., Wang, E. (2014) Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9:132–157.

- <sup>15</sup> Song, X.-R., Goswami, N., Yang, H.-H., Xie, J. (2016) Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications. *Analyst* 141:3126–3140.
- <sup>16</sup> Chen, L.-Y., Wang, C.-W., Yuan, Z., Chang, H.-T. (2015) Fluorescent gold nanoclusters: Recent advances in sensing and imaging. *Analytical Chemistry*, 87:216–229.
- <sup>17</sup> Alonso, M.C., Trapiella-Alfonso, L., Fernández, J.M.C., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2016) Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: Application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosensors & Bioelectronics*, 77:1055–1061.
- <sup>18</sup> Xu, H., Suslick, K.S. (2010) Water-soluble fluorescent silver nanoclusters. *Advanced Materials*, 22:1078–1082.
- <sup>19</sup> Diez, I., Ras, R.H.A. (2011) Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale* 3:1963–1970.
- <sup>20</sup> Luo, Z., Zheng, K., Xie, J. (2014) Engineering ultrasmall water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications. *Chemical Communications*, 50:5143–5155.
- <sup>21</sup> Chen, Y., Phipps, M.L., Werner, J.H., Chakraborty, S., Martinez, J.S. (2018) DNA templated metal nanoclusters: From emergent properties to unique applications. *Accounts of Chemical Research*, 51:2756–2763.
- <sup>22</sup> Yeh, H.-C., Sharma, J., Han, J.J., Martinez, J.S., Werner, J.H. (2010) A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization. *Nano Letters*, 10:3106–3110.
- <sup>23</sup> Li, B., Xu, L., Chen, Y., Zhu, W., Shen, X., Zhu, C., Luo, J., Li, X., Hong, J., Zhou, X. (2017). Sensitive and label-free fluorescent detection of transcription factors based on DNA-Ag nanoclusters molecular beacons and exonuclease III-assisted signal amplification. *Analytical Chemistry*, 89:7316–7323.
- <sup>24</sup> Li, J., Zhu, J.-J., Xu, K. (2014) Fluorescent metal nanoclusters: From synthesis to applications. *Trends Analytical Chemistry*, 58:90–98.
- <sup>25</sup> 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 Advances*, 4:60581–60596.
- <sup>26</sup> Adhikari, B., Banerjee, A. (2010) Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing. *Chemistry of Materials*, 22:4364–4371.
- <sup>27</sup> Shang, L., Dörllich, R.M., Trouillet, V., Bruns, M., Nienhaus, G.U. (2012) Ultrasmall fluorescent silver nanoclusters: Protein adsorption and its effects on cellular responses. *Nano Research*, 5:531–542.
- <sup>28</sup> Ren, S.H., Liu, S.G., Ling, Y., Li, N.B., Luo, H.Q. (2018) Fluorescence detection of melamine based on inhibiting Cu<sup>2+</sup>-induced disaggregation of red-emitting silver nanoclusters, *Spectrochimica Acta A*, 201:112–118.
- <sup>29</sup> Shu, T., Lin, X., Zhou, Z., Zhao, D., Xue, F., Zeng, F., Wang, J., Wang, C., Su, L., Zhang, X. (2019) Understanding stimuli-responsive oligomer shell of silver nanoclusters with aggregation-induced emission via chemical etching and their use as sensors. *Sensor and Actuators B: Chemical Journals*, 286:198–205.
- <sup>30</sup> Rogers, A.B., Cormier, K.S., Fox, J.G. (2006) Thiol-reactive compounds prevent nonspecific antibody binding in immunohistochemistry. *Laboratory Investigation*, 86:526–533.
- <sup>31</sup> Yu, Y., Yao, Q., Luo, Z., Yuan, X., Lee, J.Y., Xie, J. (2013) Precursor engineering and controlled conversion for the synthesis of monodisperse thiolate-protected metal nanoclusters. *Nanoscale*, 5:4606–4620.
- <sup>32</sup> Garcia, M.E.D., Sanz-Medel, A. (1986) Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence. *Analytical Chemistry*, 58:1436–1440.

<sup>33</sup> Trapiella-Alfonso, L., Menéndez-Miranda, M., Costa-Fernández, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2014) Nanostructural transformations of silver nanoclusters occurring during their synthesis and after interaction with UV-light. *Materials Research Express*, 1:015039.

<sup>34</sup> Sofat, R., Mangione, P.P., Gallimore, J.R., Hakobyan, S., Hughes, T.R., Shah, T., Goodship, T., D'Aiuto, F., Langenberg, C., Wareham, N., Morgan, B.P., Pepys, M.B., Hingorani, A.D. (2013) Distribution and determinants of circulating complement factor H concentration determined by a high-throughput immunonephelometric assay. *Journal of Immunological Methods*, 390:63–73.

<sup>35</sup> Hakobyan, S., Harris, C.L., Tortajada, A., Goicochea de Jorge, E., García-Layana, A., Fernández-Robredo, P., Rodríguez de Córdoba, S., Morgan, B.P. (2008) Measurement of factor H variants in plasma using variant-specific monoclonal antibodies: Application to assessing risk of age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49:1983–1990.

<sup>36</sup> Hakobyan, S., Tortajada, A., Harris, C.L., Rodríguez de Córdoba, S., Morgan, B.P. (2010) Variant-specific quantification of factor H in plasma reveals null alleles associated with a typical hemolytic uremic syndrome. *Kidney International Reports*, 78:782–788.

# **CAPÍTULO 3**

# Imágenes multiplexadas de proteínas en tejidos biológicos mediante microscopía de fluorescencia y ablación láser-ICP-MS utilizando nanoclústeres de plata enriquecidos isotópicamente

## 1. Introducción

En los últimos años, las NPs de metales nobles con diámetros entre 5 y 100 nm han sido objeto de una intensa investigación para su uso en diversos campos, como las ciencias de los materiales, ambientales o biológicas<sup>1,2</sup>. En cuanto a las aplicaciones biológicas, se ha prestado especial atención a su aplicación al desarrollo de ensayos capaces de analizar biomoléculas específicas<sup>3</sup>. En particular, las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen propiedades interesantes y se han estudiado en gran medida para ser utilizadas como herramientas prometedoras y con alta aplicabilidad en estudios clínicos<sup>1</sup>. Existe menos información acerca del uso de marcas basadas en plata, pero diversos estudios han explorado las NP de plata (AgNPs) o de Ag en combinación con Au como NP bimetalicas<sup>4,5,6</sup>. Sin embargo, como se ha desgranado en la introducción, los NCs metálicos han experimentado un notable interés debido a sus posibles aplicaciones como marcas fluorescentes<sup>7,8,9</sup>.

Adicionalmente a sus propiedades ópticas, las NPs y los NCs se han estudiado como etiquetas elementales para el análisis de biomoléculas mediante detección por ICP-MS<sup>10-13</sup>. Las marcas con muchos átomos de un metal determinado permiten una alta amplificación de la señal para la detección específica de la biomolécula correspondiente. Recientemente, en el estudio realizado por Lores-Padin *et al.*<sup>13</sup> se ha publicado la aplicación de PtNCs como marcas bimodales para inmunoensayos cuantitativos con detección por fluorescencia e ICP-MS. La gran amplificación lograda por la combinación de PtNCs con detección por ICP-MS permitió alcanzar un límite de detección (LOD) de 0,08 ng.mL<sup>-1</sup> para la cuantificación de inmunoglobulina E en suero humano.

La técnica de LA acoplada a ICP-MS ofrece capacidades interesantes para el análisis elemental de sólidos, incluida la elevada resolución espacial en el rango de las pocas micras y bajos límites de detección de hasta el rango de los  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>14</sup>. El *bioimaging* de biomoléculas específicas se puede lograr combinando anticuerpos marcados con elementos y su detección mediante LA-ICP-MS<sup>15,16</sup>. La mayoría de los trabajos realizados en esta área están relacionados con el uso de quelatos monometálicos coordinados con lantánidos (p. ej., utilizando reactivos quelantes DOTA o DTPA) o el uso de etiquetas poliméricas comerciales que contienen varios quelatos metálicos (p. ej., MAXPAR™)<sup>15</sup>. El *bioimaging* con LA-ICP-MS ha mostrado un creciente interés en el área de las ciencias de la vida contribuyendo a lograr una comprensión más profunda del papel de los metales y las biomoléculas en los procesos biológicos. El uso de NPs como etiquetas elementales para el análisis de biomarcadores candidatos de cáncer por LA-ICP-MS, en secciones de tejido, fue realizado por primera vez por Seuma *et al.*<sup>17</sup> Se desarrolló un método basado en un inmunoensayo tipo sándwich para detectar y localizar dos proteínas relacionadas con el cáncer de mama (MUC-1 y HER2), utilizando un Ab secundario marcado con AuNPs (5 nm). En el estudio, se propuso la tinción con Ag para mejorar la sensibilidad, sumergiendo las secciones en una solución de Ag durante 5 min antes de montarlas en el portaobjetos. De este modo, se analizó la distribución de Au y Ag a lo largo del tejido observándose una buena correlación entre ambos metales.

A partir de este trabajo pionero, se han propuesto diversas estrategias para la amplificación de señales y detección sensible de proteínas en tejidos biológicos utilizando AuNPs<sup>18-21</sup>. En Tvrdonova *et al.*<sup>21</sup>, se describió el marcaje de un anticuerpo (Ab) por AuNPs (10 nm y 60 nm) en experimentos dot blot. Aunque la sensibilidad con el etiquetado de AuNPs fue por encima de hasta 4 órdenes de magnitud en comparación con MeCAT, esta aproximación mostró un nivel de fondo más alto debido a interacciones inespecíficas de AuNPs.

Por otro lado, recientemente se ha propuesto el uso de AuNCs (2,7 nm o 2,2 nm)<sup>22, 23</sup> como etiquetas elementales para la obtención mediante LA-ICP-MS de imágenes cuantitativas de proteínas en secciones de tejidos humanos. Se realizaron procedimientos de IHC basados en el uso de AuNCs bioconjugados a un Ab primario

específico a través del entrecruzamiento con carbodiimida para la localización específica en secciones de tejido de metalotioneínas 1 y 2 (MT1/2) en la retina humana<sup>22</sup> y ferroportina en la región del hipocampo del cerebro humano<sup>23</sup>. Las ventajas que ofrece el uso de NCs metálicos pequeños frente a las NPs metálicas incluyen un menor riesgo de bloquear los epítomos del Ab durante el proceso de marcaje, así como la posibilidad de llevar a cabo una detección bimodal (fluorescencia y MS).

La combinación de IHC con la técnica de LA-ICP-MS tiene un gran potencial para el *bioimaging* simultáneo de varias proteínas gracias a la excelente resolución espectral isotópica del espectrómetro de masas. Aquí, debe destacarse la alta capacidad de multiplexación mediante la combinación del sistema LA a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF)<sup>24</sup> con etiquetas metálicas en marcas poliméricas, lo que permite el análisis simultáneo de más de 30 biomoléculas en una sola muestra. Las principales limitaciones de la técnica basadas en LA-ICP-TOF MS (aparte del alto coste de esta instrumentación) son las dificultades para obtener suficiente amplificación con las etiquetas poliméricas, los altos fondos de señal debido a la absorción no específica y las dificultades para obtener información cuantitativa.

Se puede esperar una mayor amplificación mediante el uso de marcas de NPs y NCs debido a la gran cantidad de átomos detectables en cada etiqueta. Además, se espera un etiquetado más eficiente debido al tamaño más pequeño de las NPs y los NCs en comparación con los quelatos de un solo metal o las marcas poliméricas. Sin embargo, aún son escasos los estudios que aborden el análisis simultáneo de biomoléculas con dichas etiquetas. En Paul *et al.*<sup>18</sup> se emplearon anticuerpos de tirosina hidroxilasa marcados con AuNPs y Yb para evaluar la localización de dopamina en secciones de cerebro de ratón; sin embargo, se investigaron diferentes secciones de tejido con cada marca lo que imposibilitó la obtención simultánea de bioimágenes de varias proteínas en una misma sección.

## 2. Objetivos

Se desarrollará una metodología altamente sensible que utiliza AgNCs bioconjugados con anticuerpos para la obtención de bioimágenes simultáneas de proteínas en retina humana mediante LA-ICP-MS.

Las proteínas que unen cobre y zinc, la superóxido dismutasa 1 (SOD1) y las metalotioneínas 1 y 2 (MT1/2) serán seleccionadas para su estudio por su posible relación con el desarrollo de enfermedades oculares neurodegenerativas asociadas a la edad, más aún considerando que los niveles de Cu y MT1A se han observado alterados en la lágrima de pacientes con DMAE durante el desarrollo del Capítulo 1.

Con este objeto, los nanoclústeres de plata solubles en agua (AgNCs) se sintetizarán utilizando plata de abundancia natural o enriquecida isotópicamente ( $^{nat}\text{AgNCs}$  y  $^{109}\text{AgNCs}$ ), y se emplearán como marcas para obtener bioimágenes de las proteínas seleccionadas.

Como prueba de concepto, las distribuciones individuales y simultáneas de la MT1/2 y la SOD1 se determinarán en secciones de tejido ocular de 5  $\mu\text{m}$  de espesor de donantes post mortem, específicamente en las diversas capas de la retina. Los anticuerpos anti-MT1/2 y anti-SOD1 se marcarán con  $^{nat}\text{AgNCs}$  y  $^{109}\text{AgNCs}$ , respectivamente, y se desarrollará un protocolo inmunohistoquímico para su análisis. La detección se llevará a cabo mediante microscopía de fluorescencia y LA-ICP-MS.

Se utilizará la herramienta matemática de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) para la obtención de bioimágenes simultáneas de las dos proteínas en la misma sección de tejido tras el análisis mediante LA-ICP-MS, utilizando ambos tipos de AgNCs.

### 3. Procedimiento Experimental

#### 3.1. Materiales y reactivos

- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (en polvo, 99.9% pureza; Alfa Aesar, Thermo Fisher, Kandel, Germany),
- Ácido lipoico (en polvo, >98% pureza; Across Organics, Geel, Belgium)
- Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA)
- Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) (en polvo, > 98% pureza, Sigma-Aldrich)
- Nitrato de plata enriquecido en el isótopo  $^{109}\text{Ag}$  con una abundancia del 99.9% (sólido, ISC Science SL, Oviedo, Spain).
- Anticuerpo Ab monoclonal de ratón anti-MT1/2 humana (Abcam, Cambridge, Reino Unido)
- Anticuerpo Ab policlonal de conejo anti-SOD1 humana (Abcam)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (en polvo, 98 % pureza; Across Organics)
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (en polvo, >98 % pureza; Sigma-Aldrich)
- Tris base (en polvo, >99 % pureza; Sigma-Aldrich)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Panreac, Barcelona, España)
- L-glutatión reducido (en polvo, >98% pureza; Sigma-Aldrich)
- Amicones para ultracentrifugación de tamaño de poro de 3 y 100 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Cloruro de hidroxilamonio (en polvo,  $\geq 99$  % pureza; Sigma-Aldrich)
- Resina Chelex 100 (forma Na, malla seca 100–200) de Bio-Rad Laboratories (California, EE. UU.). La resina se convirtió primero en su forma ácida mediante tratamiento con ácido clorhídrico 2 M (bajo agitación mecánica durante 2 h) y posteriormente, se sometió a una etapa de lavado con agua ultrapura para eliminar el exceso de ácido y se secó al aire.
- Microplacas ELISA (96 pocillos; Thermo Fisher Scientific)
- Inmunoglobulina IgG anti-cabra policlonal marcada con peroxidasa de rábano picante (molécula entera, producida en conejo; Sigma-Aldrich)

- Sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific).
- Cloruro de amonio (99 %, Panreac) para reducir la autofluorescencia
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich) para permeabilizar el tejido y ayudar a la penetración del Ab
- Suero de cabra (Sigma-Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (en polvo, 99 % pureza; Sigma-Aldrich) como agentes bloqueantes.
- Disolución salina tamponada con fosfato (PBS 10 mM) de Sigma-Aldrich.
- Diclorhidrato de 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher) para teñir el núcleo celular
- Medios de montaje específicos para la detección de fluorescencia (Agilent Technologies) para proteger el tejido y mantener la señal durante la visualización microscópica.
- Ácido clorhídrico (HNO<sub>3</sub>) (65 % VWR International, Pensilvania, EE. UU.)
- Soluciones estándar puras de Ag (Fluka, Merck Millipore, Massachusetts, EE. UU.) y Rh (Certipur, Merck Millipore)
- Normalización de medidas de LA-ICP-MS mediante la preparación de estándares de laboratorio a partir de soluciones estándar puras de Ag (1000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y gelatina (Merck)
- Agua ultrapura desionizada, resistividad 18,2 M $\Omega$ ·cm (Purelab Flex 3&4, ELGA-Veolia, Reino Unido)

### **3.2. Secciones de tejidos oculares procedentes de donantes post-mortem**

Para el análisis por *bioimaging*, se obtuvieron globos oculares humanos de donantes adultos sin signos de patologías oculares relevantes tras 24 h post mortem a través del “*National Disease Research Interchange*” (Filadelfia, EE. UU.). Las muestras se fijaron en formaldehído y se embebieron en parafina siguiendo los protocolos convencionales. Los procedimientos realizados se adhirieron a los principios de la Declaración de Helsinki. Las medidas de fluorescencia y LA-ICP-MS se llevaron a cabo

con secciones de tejido ocular de 5  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidas con un microtomo, que se colocaron en portaobjetos de microscopio recubiertos con FLEX (portaobjetos de microscopio IHC, Agilent Technologies, EE. UU.). La desparafinización se realizó con xilol y etanol (Sigma-Aldrich).

### 3.3. Instrumentación

- ICP-MS de sector magnético de doble enfoque ICP-MS (Element 2, Thermo Fisher Scientific) para el análisis mediante nebulización convencional y LA-ICP-MS, operando en modo de baja resolución.
- Sistema de ablación láser LSX-213 de Teledyne Cetac Technologies (Omaha, EE. UU.)
- Celda criogénica de ablación desarrollada en la Universidad de Oviedo que permite trabajar en condiciones de baja temperatura (-20 °C).
- Estándar de vidrio SRM NIST 612
- Espectrofluorímetro (LS-50-B, Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.)
- Cubetas de fluorescencia Hellma® semi Micro con cuarzo Suprasil® (Sigma-Aldrich)
- Minicentrífuga (Gyrozen, Daejeon, Corea del Sur)
- Microscopio Leica DM600 con cámara digital a color DFC 310 Fx (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania)
- Microscopio confocal láser (modelo DM IRE2; Leica, Wetzlar, Alemania) con objetivos de inmersión en aceite de 20x y 40x. La línea de excitación láser seleccionada para las medidas de bioconjugado y DAPI fue de 405 nm.
- El procesamiento de imágenes tanto para microscopía de fluorescencia como para LA-ICP-MS se realizó con el software ImageJ-Fiji (Instituto Nacional de Salud, EE. UU.). Para las imágenes de LA-ICP-MS, la contribución del blanco de gas se restó de las señales de intensidad sin procesar para trabajar con recuentos de iones de intensidades netas por segundo (cps).

### 3.4. Síntesis y bioconjugación de AgNCs de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente

La síntesis de  $^{nat}\text{AgNCs}$  se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la sección experimental del Capítulo 2. El protocolo de síntesis para los  $^{109}\text{AgNCs}$  enriquecidos isotópicamente fue exactamente el mismo, pero utilizando  $^{109}\text{AgNO}_3$  como precursor metálico. En concreto, se disolvieron 81 mg de ácido lipoico en 20 mL de agua ultrapura junto con 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  2 M y 1 mL de una solución acuosa de  $\sim 25$  mM  $^{109}\text{AgNO}_3$  en un vial protegido de la luz. Posteriormente, se agregaron 2 mL de una solución de  $\text{NaBH}_4$  150 mM y la reacción se mantuvo en agitación a 9 °C durante 21 h. La purificación de los AgNCs se llevó a cabo mediante ultrafiltración (amicones de tamaño de poro de 3 kDa) para eliminar el exceso de ligando y agente reductor. Para tal efecto, se realizó la siguiente secuencia: (i) ciclo a 6500 rpm por 10 min, (ii) tres pasos de lavado con agua ultrapura a 6500 rpm por 10 min, y (iii) ciclo de reducción de volumen a 6500 rpm por 5 min. Finalmente, los  $^{nat}\text{AgNCs}$  o  $^{109}\text{AgNCs}$  se llevaron a un volumen igual al inicial y dichas disoluciones purificadas se almacenaron por separado en la nevera (4 °C).

El anticuerpo correspondiente fue marcado con AgNCs ( $^{nat}\text{AgNCs}$  y  $^{109}\text{AgNCs}$ ) mediante el método de entrecruzamiento con carbodiimida utilizado en el Capítulo 2. Brevemente, en un tubo Eppendorf con agitación constante y a temperatura ambiente, 100  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-MT1/2 (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) o 100  $\mu\text{L}$  de anti-SOD1 Ab (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fueron mezclados, por separado, con 188  $\mu\text{L}$  de  $^{nat}\text{AgNCs}$  o  $^{109}\text{AgNCs}$ , respectivamente, en disolución de Tris-EDTA con 3 mM de glutatión para obtener anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  y anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$  bioconjugados. De este modo, se encontró que las relaciones molares resultantes de Ab:AgNC eran 1:3. A continuación, se añadió una solución de EDC y NHS (0,01 M) en un tampón Tris-EDTA en la relación molar 1:1. Finalmente, la superficie de los AgNCs se bloqueó con hidroxilamina para evitar interacciones no específicas de  $^{nat}\text{AgNC}$  y  $^{109}\text{AgNC}$  con el tejido. Los bioconjugados anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  y anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$  se incubaron por separado con hidroxilamina (se investigaron relaciones molares 1:20, 1:50 y 1:100). A continuación, después de 2 h de agitación a

temperatura ambiente, se llevó a cabo la purificación de los bioconjugados (concentraciones de Ab de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mediante ultracentrifugación utilizando amicones de tamaño de poro de 100 kDa. Las disoluciones de bioconjugados purificados se almacenaron por separado a baja temperatura en condiciones de oscuridad hasta su uso.

La ratio entre los AgNCs y el Ab (anti-MT1/2) en la inmunosonda se optimizó mediante un inmunoensayo espectrofotométrico, utilizando un Ab secundario marcado con HRP. Además, se investigó si las capacidades de reconocimiento del bioconjugado Ab:AgNCs se mantienen después del tratamiento con hidroxilamina. Para ello, se inmovilizó MT1/2 ( $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$  de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  MT1/2) en una placa ELISA y se incubó durante 6 h a  $38^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se eliminó el exceso de disolución de proteína y se agregaron  $200 \mu\text{L}/\text{pocillo}$  de solución de BSA al 2 % en PBS 10 mM (pH 7,4) para bloquear los espacios vacíos en los pocillos (la placa se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche). A continuación, se añadieron  $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$  del anti-MT1/2 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se mantuvo durante 2 h a  $38^\circ\text{C}$ . En este paso, se empleó el Ab marcado con diferentes relaciones molares de  $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  (con y sin tratamiento con hidroxilamina, en una relación molar 1:20 bioconjugado:hidroxilamina). Después de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05 %, se añadieron  $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$  del Ab anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa (diluido 1:10000 en un tampón que contenía PBS-BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 %) y se incubó como se indicó anteriormente. Finalmente, la placa fue sometida a etapas de lavado y tratada con  $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$  del kit TMB. La reacción enzimática se detuvo con ácido sulfúrico 2 M ( $100 \mu\text{L}/\text{pocillo}$ ) y se detectó en un lector de placas de absorbancia ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ).

### **3.5. Protocolo del inmunoensayo para detección por fluorescencia y *bioimaging* por LA-ICP-MS**

El procedimiento de IHC para el *bioimaging* de las proteínas MT1/2 y SOD1 se desarrolló en secciones de tejidos oculares humano ( $5 \mu\text{m}$  de espesor) a partir de las secciones embebidas en parafina depositadas en portaobjetos de microscopio

recubiertos con FLEX. Cada portaobjetos se introdujo en xilol para eliminar la parafina y luego se rehidrató con etanol en una serie de alcoholes de graduación decreciente hasta finalizar en agua. A continuación, se llevaron a cabo los pasos de lavado con agua Milli-Q y PBS (10 mM, pH 7,3). Se añadió cloruro de amonio (0,5 M) en PBS (BSA al 0,1 %) durante 15 min, seguido de otro paso de lavado con PBS. Posteriormente se realizó la incubación con triton X-100 (0,1%) en PBS durante 5 min. Fue necesario un paso de lavado adicional con PBS y luego se realizó un paso de bloqueo del tejido usando PBS y 0,1% de BSA + 10% de suero de cabra durante 30 min.

Después de estos pasos de lavado y bloqueo, se añadió el Ab marcado con  $^{nat}\text{AgNC}$  o  $^{109}\text{AgNC}$  (anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  o anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$  bioconjugados,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) al tejido y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante la noche. Dicha etapa del protocolo se llevó a cabo en la oscuridad debido a la sensibilidad a la luz de los AgNCs. Posteriormente a la incubación del tejido con los bioconjugados de  $^{nat}\text{AgNCs}$  o  $^{109}\text{AgNCs}$ , se realizó un paso de lavado con PBS y se llevó a cabo la tinción de los núcleos celulares con una disolución de DAPI ( $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (10 min a temperatura ambiente en oscuridad). Finalmente, el portaobjetos se lavó con PBS y se añadió el medio de montaje y un cubreobjetos. Las secciones de tejido se secaron durante 1 h a temperatura ambiente y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Después de la medida de la fluorescencia, se retiró el cubreobjetos y posteriormente se llevó a cabo el análisis por LA-ICP-MS en la misma sección de tejido. La posible deriva de sensibilidad del sistema LA-ICP-MS se corrigió midiendo un estándar de Ag preparado en gelatina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Ag) antes y después de cada sección de tejido.

Para el análisis simultáneo de MT1/2 y SOD1 en la misma sección de tejido, se mezcló el mismo volumen de los dos bioconjugados ( $\sim 100 \mu\text{L}$ ) y posteriormente se añadieron al tejido siguiendo el protocolo de IHC descrito anteriormente.

Las secciones de tejido ocular se ablacionaron completamente línea por línea en las condiciones de LA-ICP-MS resumidas en la Tabla 11. Se utilizó un estándar de vidrio SRM NIST 612 para la optimización instrumental en términos de sensibilidad, señal de fondo y relación de señal  $^{238}\text{U}^+ / ^{232}\text{Th}^+$ . Además, se monitorizó la relación de señal

$^{248}\text{ThO}^+ / ^{232}\text{Th}^+$  para controlar la formación de óxidos, estando siempre por debajo del 0,5% en las condiciones optimizadas. Asimismo, se realizó una optimización cuidadosa de los parámetros del láser (es decir, fluencia, tasa de repetición, diámetro del haz láser y velocidad de escaneo), así como de las tasas de flujo de He y Ar en términos de resolución lateral, sensibilidad y estabilidad de las señales.

Tabla 10. Condiciones instrumentales de ablación láser e ICP-MS para el análisis de secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS.

<b>ICP-MS</b>	<b>Thermo Fisher Scientific (Element 2)</b>
Potencia RF	1280 W
Gas de plasma	15 L min <sup>-1</sup>
Gas auxiliar	1.1 L min <sup>-1</sup>
Gas de nebulización (disolución)	1.1 L·min <sup>-1</sup>
Isótopos (disolución)	<sup>103</sup> Rh, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag
Isótopos (imaging)	<sup>103</sup> Rh, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag
Tiempo de integración	0.01 s
Modo de resolución	Baja (m/Δm~300)
Puntos por picos	30
<b>LA System</b>	<b>Teledyne Cetac Technologies (LSX-213)</b>
Fluencia	30 J cm <sup>-2</sup>
Frecuencia de repetición	20 Hz
Diámetro haz láser	10 μm
Velocidad de barrido	5 μm s <sup>-1</sup>
Modo de ablación	Barrido lineal
Gas portador:	
He (cámara de ablación)	1.0 L min <sup>-1</sup>
Ar	0.7 L min <sup>-1</sup>
Temperatura del análisis (Cámara refrigerada Peltier)	- 20 °C

Para el análisis de los datos obtenidos por LA-ICP-MS, se utilizó la herramienta matemática de IPD para obtener información simultánea sobre la distribución de las proteínas en la misma sección de tejido. De este modo, empleando esta herramienta matemática se puede determinar la contribución individual de cada isótopo en una

mezcla. La ecuación para el cálculo de las fracciones molares se muestra en la ecuación 2:

$$\begin{bmatrix} A_s^1 \\ A_s^2 \\ A_s^3 \\ \dots \\ A_s^m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{Nat}^1 & A_{t,1}^1 & \dots & A_{t,n}^1 \\ A_{Nat}^2 & A_{t,1}^2 & \dots & A_{t,n}^2 \\ A_{Nat}^3 & A_{t,1}^3 & \dots & A_{t,n}^3 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_{Nat}^m & A_{t,1}^m & \dots & A_{t,n}^m \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_{Nat} \\ X_{t,1} \\ \dots \\ X_{t,n} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde  $A_s^m$  representa las abundancias isotópicas presentes en la muestra,  $A_{Nat}^m$  serían las abundancias naturales,  $A_{t,n}^m$  correspondería a las abundancias isotópicas de los trazadores utilizados para la cuantificación,  $X_{x,x}$  serían las distintas fracciones molares correspondientes a las formas isotópicas utilizadas y que son halladas mediante el programa Microsoft Excel a partir de la función estimación lineal y finalmente, el valor de incertidumbre asociado viene representado por  $e^n$  <sup>25</sup>.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Síntesis de AgNCs enriquecidos isotópicamente

En el capítulo anterior, se ha descrito la síntesis de AgNCs fluorescentes (máximos de excitación/emisión a 430/660 nm) y su uso como marcas para el análisis del factor H del complemento en muestras líquidas (suero humano) mediante un fluoroinmunoensayo. En este capítulo, los AgNCs de abundancia natural se han estudiado como etiquetas potenciales para el bioimaging de proteínas por fluorescencia y detección LA-ICP-MS en secciones de tejido ocular. Además, también se investigó la síntesis de AgNCs sintetizados con isótopos estables enriquecidos de Ag ( $^{109}\text{AgNCs}$ ). De esta forma, sería posible aumentar el número de marcas disponibles para un análisis simultáneo utilizando un procedimiento de preparación similar, lo cual presentaría gran interés considerando que la síntesis de NCs de metálicos nuevos y aptos para dicho propósito, así como su caracterización, son procesos tediosos y lentos. La Figura 38 muestra el espectro de fluorescencia obtenido para los  $^{109}\text{AgNC}$  enriquecidos isotópicamente y los  $^{\text{nat}}\text{AgNC}$ . Como se puede observar en la Figura 38, los espectros de

emisión presentan un máximo a 660 nm y la intensidad de fluorescencia fue similar a la obtenida para los  $^{nat}\text{AgNCs}$  (la línea gris muestra los espectros de emisión obtenidos utilizando  $^{nat}\text{AgNO}_3$  para la síntesis).

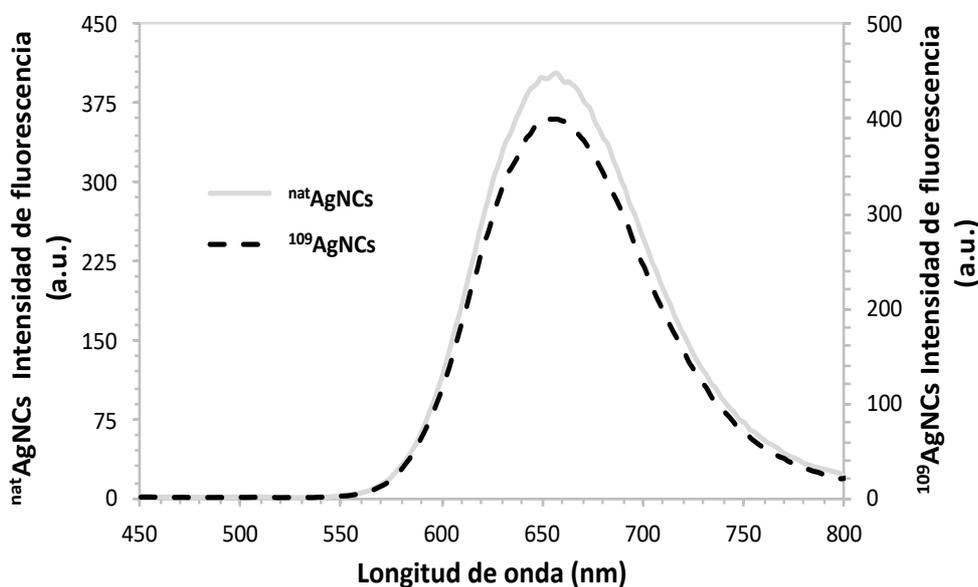


Figura 38. Espectros de fluorescencia de los  $^{nat}\text{AgNC}$  sintetizados (línea gris) y  $^{109}\text{AgNC}$  enriquecidos isotópicamente (línea de puntos en el eje secundario). Longitud de onda de excitación: 430 nm.

La caracterización de los  $^{nat}\text{AgNCs}$  se realizó previamente mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) e ICP-MS. Se determinó, mediante el análisis por HR-TEM, que el diámetro promedio de los AgNC era de  $2,9 \pm 0,10$  nm ( $n = 270$ , intervalo de confianza del 99 % obtenido con la distribución normal estándar). Además, la determinación de la concentración de Ag por ICP-MS combinada con el tamaño, la geometría y la estructura cristalina de los AgNCs mostró que cada NC se compone de 753 átomos de Ag en promedio. Con respecto a los AgNCs enriquecidos isotópicamente, la solución de  $^{109}\text{AgNC}$  se caracterizó tanto por la abundancia isotópica como por la concentración de Ag mediante ICP-MS. Se encontró que las abundancias de isótopos de los  $^{109}\text{AgNC}$  eran del 99,7 % de  $^{109}\text{Ag}$  y del 0,3 % de  $^{107}\text{Ag}$ . Por tanto, se puede afirmar que el enriquecimiento isotópico se mantuvo prácticamente constante respecto al precursor metálico empleado para la síntesis (99,9%  $^{109}\text{AgNO}_3$ ). La concentración de Ag de la disolución de  $^{109}\text{AgNCs}$  (necesaria para la bioconjugación reproducible con el Ab) se obtuvo mediante análisis por dilución isotópica inversa usando una disolución estándar de Ag de abundancia natural y concentración conocida. Se determinó que la

concentración de Ag en la solución de  $^{109}\text{AgNCs}$  era de  $1,54 \pm 0,07$  mM. Como se describe en la sección Procedimientos Experimentales, la proporción molar óptima entre Ab y AgNC fue de 1:3, ratio para la cual se dió una situación de compromiso entre mantener las capacidades de reconocimiento de Ab y lograr una alta intensidad de fluorescencia de la inmunosonda marcada.

#### **4.2. Optimización del protocolo IHC para la detección de proteínas específicas en secciones de tejidos oculares usando AgNCs como marcas**

La tinción con plata (*silver staining*) es un protocolo muy conocido en caracterización histológica, microbiología diagnóstica o en análisis genómico y proteómico de muestras biológicas. Por lo general, es un procedimiento sensible para detectar trazas de biomoléculas en geles, células procedentes de cultivos *in vitro* o secciones de tejido<sup>26,27</sup>. La base de la tinción con plata consiste en la reducción de Ag iónica en medios básicos, produciendo un depósito metálico de Ag en el sitio de reducción. Los AgNCs se proponen en el presente capítulo como etiquetas elementales y de fluorescencia para la detección de proteínas en secciones de tejido biológico y, por lo tanto, se prestó especial atención para evitar interacciones no específicas de los AgNCs con los tejidos. Además, teniendo en cuenta que también se propone el uso de AgNCs de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente como posibles etiquetas de proteínas para la detección por MS, se estudió la posible contaminación de secciones de tejido con Ag de abundancia natural de los reactivos químicos empleados en el marcaje de anticuerpos y en los protocolos de IHC.

Se midieron alícuotas de las diferentes soluciones, requeridas para la bioconjugación de  $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  con anti-MT1/2, así como durante el protocolo IHC en secciones de tejidos oculares humanos (es decir, Tris-EDTA, glutatión, EDC-NHS y PBS), mediante nebulización convencional y detección por ICP-MS. Se detectó una intensidad de señal de  $^{107}\text{Ag}$  para todas las soluciones, con rangos desde 200 cps para 0,01 M EDC-NHS hasta 62000 cps para 1 mM Tris-EDTA. Los resultados experimentales evidenciaron

que tales soluciones contienen Ag y, por lo tanto, pueden interferir severamente en el estudio de la distribución de proteínas en tejidos biológicos utilizando AgNCs como marcas. En el caso de la detección por microscopía de fluorescencia, las imágenes obtenidas para la distribución de proteínas no se verán afectadas por la contaminación de Ag ya que la señal está relacionada con la emisión de fluorescencia de los AgNCs. Sin embargo, la obtención de imágenes de proteínas mediante LA-ICP-MS puede verse obstaculizada debido a un fondo de Ag alto. En este sentido, con el fin de reducir la contaminación de Ag por reactivos químicos, se ha empleado la resina Chelex-100 para la purificación de los reactivos<sup>28</sup>. Los reactivos químicos utilizados para los protocolos de bioconjugación e IHC se trataron con la resina como método de adsorción para eliminar su contenido de Ag. Se añadieron 0,2 g de resina seca a 10 mL de las soluciones y se sometieron a agitación magnética durante 7 h. Posteriormente, la resina se separó por filtración a través de un vidrio poroso y las soluciones se midieron nuevamente por ICP-MS. Los resultados experimentales mostraron que la resina retuvo Ag y su contenido en las soluciones se redujo significativamente hasta en un 80% (se observó una disminución de la señal del 60-80% dependiendo del pH de las soluciones). La contribución de Ag de los productos químicos a las secciones de tejido después del tratamiento con resina y después de los diferentes pasos de lavado realizados con los tejidos puede considerarse insignificante: al usar los reactivos purificados, no se distinguió la intensidad de la señal de <sup>107</sup>Ag del tejido medido por LA-ICP-MS de la señal de <sup>107</sup>Ag del gas portador He o de fondo (en el rango de 300-400 cps).

Por otro lado, para un análisis IHC óptimo con NCs metálicos como marcadores, es necesario considerar que después de la bioconjugación del Ab específico con los nanoclústeres, la superficie de los NCs aún puede contener grupos carboxilo activados que no reaccionaron con el Ab. Por lo tanto, es necesario bloquear los grupos funcionales restantes de los NCs metálicos para evitar la interacción no específica con otras biomoléculas presentes en la sección de tejido, que posteriormente pueden producir una señal de fondo alta después del procedimiento de IHC. Para ello, se investigaron bioconjugados anti-MT1/2:<sup>nat</sup>AgNCs tratados con diferentes proporciones molares de la amina primaria seleccionada. Después del protocolo de IHC, las secciones de tejido ocular se midieron mediante LA-ICP-MS. La Figura 39 muestra los perfiles de

línea obtenidos por LA-ICP-MS para la intensidad de  $^{107}\text{Ag}$  en tres secciones de tejido consecutivas con diferentes proporciones molares de bioconjugado:hidroxilamina (1:20, 1:50 y 1:100). La distribución de MT1/2 a lo largo de la retina humana se localiza específicamente en tres capas: la capa nuclear externa, la capa nuclear interna y la capa de las células ganglionares<sup>22</sup>. Mediante el uso del bioconjugado anti-MT1/2: $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  sin hidroxilamina, las tres capas con MT1/2 apenas se distinguieron del elevado fondo observado para  $^{107}\text{Ag}$  en la sección de tejido debido a interacciones no específicas de  $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$ . Sin embargo, como se puede observar en la Figura 39, es posible determinar la distribución de  $^{107}\text{Ag}$  (es decir, MT1/2) a lo largo de las capas de la retina usando hidroxilamina como agente bloqueante: los tres máximos de los perfiles corresponden a las capas que contienen MT1/2 proteína (células ganglionares, capa nuclear interna y capa nuclear externa, de izquierda a derecha). Las interacciones no específicas de los AgNCs con el tejido se minimizaron usando proporciones molares de bioconjugado:hidroxilamina de 1:20, 1:50 y 1:100, teniendo en cuenta que la señal de  $^{107}\text{Ag}$  alcanzó el nivel del fondo entre las capas que contenían MT1/2. Sin embargo, también se observó que un aumento en la cantidad de hidroxilamina producía una disminución en la intensidad de  $^{107}\text{Ag}$ : la señal de  $^{107}\text{Ag}$  en la capa nuclear externa mostró una reducción de 35000 cps usando una relación molar 1:20 (Figura 39 a) a 9700 cps usando una relación molar 1:50 (Figura 39 b) y 7900 cps usando una relación molar 1:100 (Figura 39 c). Esto se puede atribuir a un exceso en la amina primaria empleada como agente bloqueante, que no solo reduce las interacciones no específicas de los AgNCs con el tejido, sino que también bloquea los Abs y, por lo tanto, limita las capacidades de reconocimiento del anticuerpo marcado. Por lo tanto, se seleccionó la relación molar 1:20 para experimentos posteriores.

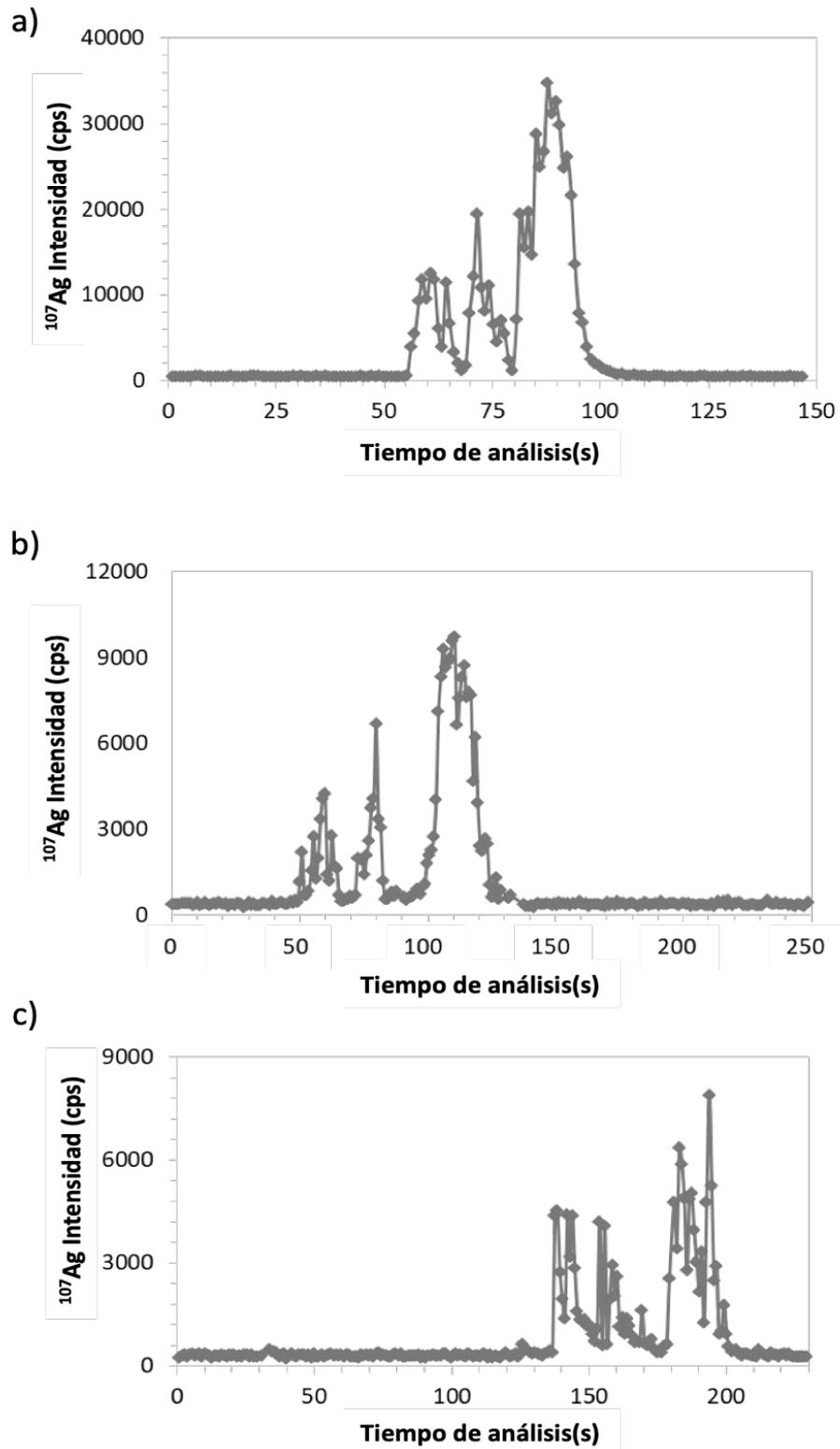


Figura 39. Perfil de línea de  $^{107}\text{Ag}$  obtenido por LA-ICP-MS para el análisis de las capas de retina en secciones de tejido ocular humano después del protocolo IHC con bioconjugado anti-MT1/2: $^{107}\text{Ag}$ NCs y usando diferentes proporciones molares de bioconjugado:hidroxilamina. a) 1:20; b) 1:50; y c) 1:100. El ancho de las líneas de ablación en los tejidos oculares oscila entre  $450\ \mu\text{m}$  y  $950\ \mu\text{m}$  (los 30 s iniciales y finales de los análisis corresponden al fondo del gas portador He).

Como último paso, se optimizó la relación Ab:AgNCs con el objetivo de lograr una alta emisión de fluorescencia del bioconjugado manteniendo las capacidades de reconocimiento de los Abs. Se ensayaron diferentes relaciones molares Ab:<sup>nat</sup>AgNC (1:3, 1:5, 1:7 y 1:10) en la disolución de bioconjugación para marcar el Ab anti-MT1/2. Para comprobar si el Ab mantenía su funcionalidad después de ser etiquetado con <sup>nat</sup>AgNCs, se realizó un estudio para las diferentes proporciones. Además, dado que se usó hidroxilamina para reducir las interacciones no específicas de los AgNCs con las secciones de tejido, se investigaron las proporciones de Ab:<sup>nat</sup>AgNC antes y después de la incubación con la amina primaria (en la proporción molar optimizada de bioconjugado:hidroxilamina de 1:20). Para este estudio, se inmovilizó MT1/2 en una placa ELISA y para la detección se empleó un Ab secundario marcado con HRP. La Tabla 12 recoge la absorbancia en las diferentes relaciones molares Ab:natAgNCs investigadas. Con respecto a los bioconjugados Ab:<sup>nat</sup>AgNCs sin el tratamiento con hidroxilamina, los resultados mostraron que para la relación 1:3 la absorbancia fue ligeramente inferior en comparación con el Ab no marcado (1,43 frente a 1,48, respectivamente). Para las relaciones 1:5, 1:7 y 1:10, las señales de absorbancia exhibieron valores más bajos (hasta 1,03). En el caso de los bioconjugados Ab:<sup>nat</sup>AgNCs tratados con hidroxilamina, se observaron absorbancias más bajas en comparación con los bioconjugados no tratados, lo que indica que la amina primaria también puede inhibir algunos sitios de unión del Ab. Sin embargo, se encontró que la relación molar 1:3 mostraba una absorbancia razonable (1,23 frente a 1,48 para el Ab sin <sup>nat</sup>AgNC) y, por lo tanto, se seleccionó como la relación óptima para el proceso de marcaje.

Tabla 11. Absorbancia medida con el inmunoensayo ELISA para el estudio de la influencia de la relación molar  $Ab^{nat}AgNCs$  en las capacidades de reconocimiento del anticuerpo (MT1/2) antes y después de la incubación con la amina primaria (relación molar de 1:20 bioconjugado:hidroxilamina).

<b>Absorbancia</b>		
<b>Blanco</b>	0,142 ± 0,004	
<b>Ab sin AgNCs</b>	1,478 ± 0,018	
<b>Ab:AgNCs Ratio molar</b>	<b>Ab:AgNCs sin hidroxilamina</b>	<b>Ab:AgNCs con hidroxilamina</b>
<b>1:3</b>	1,427 ± 0,068	1,226 ± 0,089
<b>1:5</b>	1,298 ± 0,053	0,730 ± 0,051
<b>1:7</b>	1,096 ± 0,021	0,727 ± 0,022
<b>1:10</b>	1,032 ± 0,031	0,699 ± 0,029

#### 4.3. **Imaging de MT1/2 y SOD1 en retina humana utilizando AgNCs como marcas mediante detección por microscopía de fluorescencia**

Con el fin de estudiar la distribución de las proteínas seleccionadas en las diferentes capas de la retina humana, monitorizando la emisión de fluorescencia de los AgNCs, se sometieron dos secciones consecutivas de tejido oculares al protocolo IHC usando el Ab marcado con  $^{nat}AgNCs$  (para detección de MT1/2) o con  $^{109}AgNC$  (para detección de SOD1). La Figura 40 muestra la localización de MT1/2 (Figura 40 b) y SOD1 (Figura 40 c) en las capas micrométricas de la retina obtenidas por microscopía confocal láser siguiendo la emisión de  $^{nat}AgNC$  y  $^{109}AgNC$ , respectivamente. Cada imagen corresponde a una región diferente de la retina. Además, debe tenerse en cuenta que pueden producirse algunos cambios morfológicos incontrolados en la estructura del tejido durante la desparafinización y el protocolo de IHC (p. ej., a veces pueden romperse pequeñas regiones del tejido ocular). En ambos casos, se puede encontrar una

señal de alta fluorescencia en los segmentos externos de los fotorreceptores (indicados como capa 1 en las imágenes). Sin embargo, la alta autofluorescencia típica de esta capa debido a la presencia de pigmentos no permite confirmar que las proteínas MT1/2 o SOD1 estén presentes. Aunque con una señal de fluorescencia más baja en comparación con los fotorreceptores, también se puede observar claramente (tanto para los <sup>nat</sup>AgNCs como <sup>109</sup>AgNCs) una emisión de fluorescencia en la capa nuclear externa, la capa nuclear interna y las células ganglionares (indicadas en la Figura 40 como capas 2, 4 y 6, respectivamente). Por lo tanto, se puede concluir que las proteínas MT1/2 y SOD1 tienen una distribución similar en las capas de la retina, distinguiéndose principalmente a lo largo de las capas nucleares externa e interna, así como en las células ganglionares. Las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia ofrecen una mejor resolución que las imágenes por LA-ICP-MS. Sin embargo, teniendo en cuenta que los <sup>nat</sup>AgNC y los <sup>109</sup>AgNC utilizados como marcadores del Ab seleccionado emiten fluorescencia a la misma longitud de onda (660 nm), no fue posible realizar un análisis simultáneo de ambas proteínas o *multiplexing* en la misma sección de tejido.

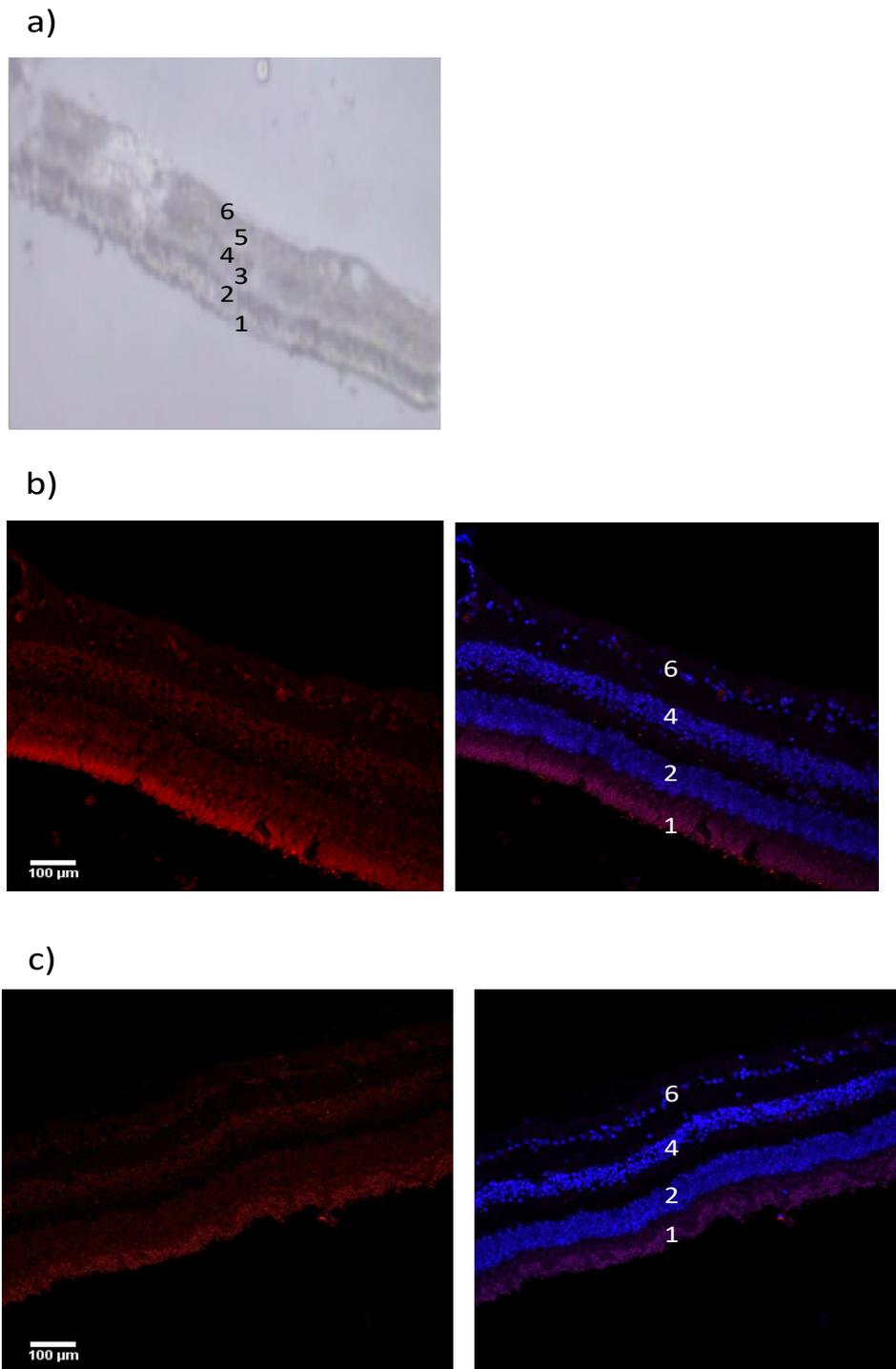


Figura 40. Análisis de la retina neurosensorial en secciones tejidos oculares humanos después del protocolo de IHC con AgNCs por microscopía de fluorescencia. Imágenes obtenidas por microscopía confocal láser (20x). a) Imagen de transmisión de la región seleccionada de la retina humana, incluida la descripción de las distintas capas de la retina: 1. fotorreceptores, 2. capa nuclear externa, 3. capa plexiforme externa, 4. capa nuclear interna, 5. capa plexiforme interna, 6, células ganglionares, y 7. capa de fibras nerviosas; b) detección de MT1/2 con Ab primario anti-MT1/2 marcado con  $^{nat}$ AgNCs; y c) detección de SOD1 con Ab primario anti-SOD1 marcado con  $^{109}$ AgNC. Las imágenes b y c recogen dos imágenes independientes con la emisión de fluorescencia de los bioconjugados en rojo ( $^{nat}$ AgNCs o  $^{109}$ AgNCs, respectivamente) y la emisión de los bioconjugados junto con la emisión de DAPI (esto después en azul).

#### 4.4. *Imaging* simultáneo de MT1/2 y SOD1 en la retina humana mediante LA-ICP-MS

Se llevó a cabo la ablación de secciones de tejidos oculares humanos de 5  $\mu\text{m}$  de espesor sometidos al protocolo IHC con  $^{\text{nat}}\text{AgNC}$  o  $^{109}\text{AgNC}$  bioconjugado con cada anticuerpo específico y utilizando las condiciones experimentales recogidas en la Tabla 11. Se obtuvieron imágenes bidimensionales que cubrían un área de la retina neurosensorial para MT1/2 (Figura 41a, señal de  $^{107}\text{Ag}$  de anti-MT1/2:bioconjugado  $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$ ) y SOD1 (Figura 41b, señal  $^{109}\text{Ag}$  del bioconjugado anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$ ) después del análisis por LA-ICP-MS. Como se puede observar en las Figuras 41a y 41b, las proteínas MT1/2 y SOD1 no se encuentran homogéneamente distribuidas a lo largo de las capas de la retina, mostrando en ambos casos una ubicación preferencial en la capa nuclear externa, la capa nuclear interna y las células ganglionares (concordantes con trabajos previos realizados<sup>29</sup> y los resultados experimentales obtenidos por microscopía de fluorescencia). Además, como puede sospecharse por las imágenes de fluorescencia recogidas en la Figura 40, las imágenes con señales en cps obtenidas por LA-ICP-MS permiten confirmar que el contenido de SOD1 en la retina humana es menor en comparación con los niveles de MT1/2 para esta muestra en particular: considerando que existen diferencias en las abundancias de los isótopos presentes en los dos tipos de AgNCs, se aprecia una mayor intensidad de  $^{107}\text{Ag}$  (51,84 % de abundancia de isótopos) correspondiente a los  $^{\text{nat}}\text{AgNCs}$  bioconjugados con anti-MT1/2 (Figura 41 a) con respecto a la señal de intensidad de  $^{109}\text{Ag}$  (99,7 % de abundancia de isótopos) procedente de los  $^{109}\text{AgNCs}$  bioconjugados con anti-SOD1 (Figura 41 b). Por tanto, esto supone que el nivel de MT1/2 es significativamente más alto que el de SOD1. En cualquier caso, se debe desarrollar un método de calibración adecuado para obtener información cuantitativa precisa sobre las concentraciones de MT1/2 y SOD1 a lo largo de las estructuras tisulares de la retina<sup>22</sup>.

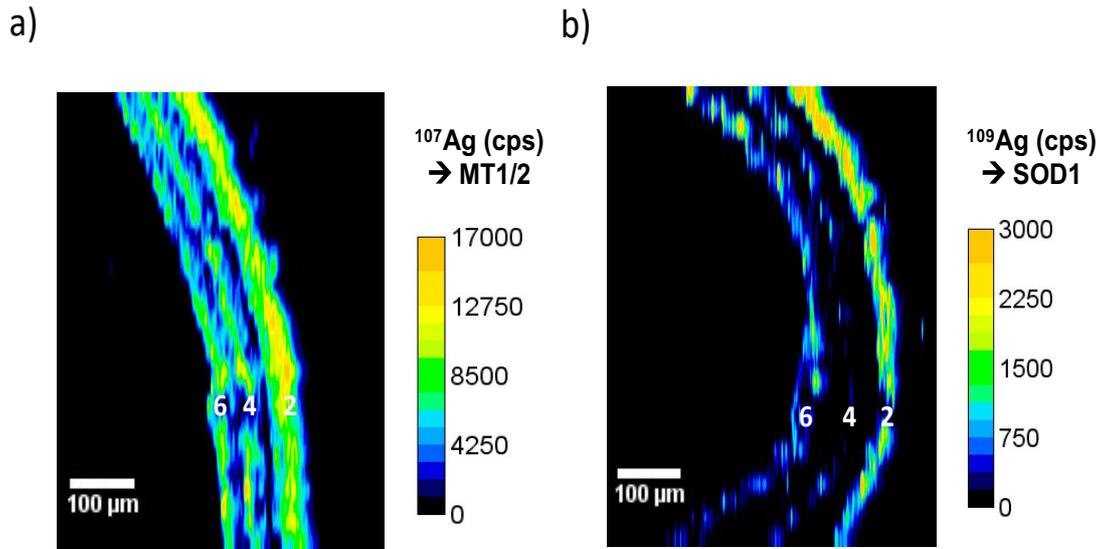


Figura 41. Análisis de la retina neurosensorial en tejidos oculares humanos después del protocolo IHC con AgNCs y detección por LA-ICP-MS. a) Imagen elemental de  $^{107}\text{Ag}$  (en cps) obtenida usando el bioconjugado anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  para la detección de MT1/2; y b) imagen elemental de  $^{109}\text{Ag}$  (en cps) obtenida usando el bioconjugado anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$  para la detección de SOD1.

Finalmente, en este capítulo de la presente tesis doctoral se presenta el primer análisis simultáneo de dos proteínas diferentes en la misma sección de tejido por LA-ICP-MS utilizando NCs metálicos en retina humana, como prueba de concepto. Después de obtener imágenes individuales de MT1/2 y SOD1 utilizando dos secciones de tejido (Figura 41), se agregaron los dos bioconjugados a la misma sección de tejido (anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNC}$  y anti-SOD1: $^{109}\text{AgNC}$ ). En este caso, la señal de  $^{107}\text{Ag}$  medida por LA-ICP-MS corresponde prácticamente en su totalidad a la distribución MT1/2 (51,84% de abundancia isotópica de  $^{107}\text{Ag}$  de  $^{nat}\text{AgNCs}$  y 0,3% de abundancia isotópica de  $^{107}\text{Ag}$  de  $^{109}\text{AgNCs}$ ), mientras que la señal de  $^{109}\text{Ag}$  da información tanto de MT1/2 como de SOD1 (99,7 % de abundancia isotópica de  $^{109}\text{Ag}$  de  $^{109}\text{AgNC}$  junto con 48,16 % de abundancia isotópica de  $^{109}\text{Ag}$  de  $^{nat}\text{AgNC}$ ). Por lo tanto, las imágenes cualitativas obtenidas por LA-ICP-MS después de la ablación del tejido no proporcionarán directamente la distribución simultánea de las dos proteínas ya que para tal fin sería necesario disponer de dos tipos de NCs enriquecidos isotópicamente (p. ej.,  $^{107}\text{AgNCs}$  con una abundancia isotópica del 99,9 % para MT1/2 y  $^{109}\text{AgNCs}$  con una abundancia isotópica del 99,9 % para SOD1. Solo en ese caso mediante LA-ICP-MS sería posible realizar directamente el análisis simultáneo de dos proteínas en una misma sección de tejido, recurriendo en ambos casos a un procedimiento de síntesis de NCs idéntico (con un precursor del metal

enriquecido en un isótopo diferente). En este caso, solo se utilizó un trazador enriquecido isotópicamente para esta prueba de concepto y, por lo tanto, se utilizó la herramienta matemática de IPD para obtener información simultánea sobre la distribución de las dos proteínas en la retina humana. Al usar el análisis LA-ICP-MS junto con IPD, fue posible distinguir la distribución de  $^{nat}\text{AgNCs}$  (MT1/2) de los  $^{109}\text{AgNC}$  enriquecidos isotópicamente (SOD1) a lo largo de las capas de la retina. Aunque la herramienta de IPD ha sido previamente utilizada en MS para determinar la contribución de los espectros de masas individuales en mezclas de diferentes patrones de isótopos<sup>30,31</sup>, no se ha combinado con LA-ICP-MS para el análisis de proteínas.

Aunque no es estrictamente necesario en este caso particular, para mostrar la viabilidad de usar IPD para distinguir entre la contribución de los trazadores naturales y los enriquecidos isotópicamente, se aplicó la regresión lineal múltiple. En este caso, las señales de  $^{107}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  (cps) obtenidas por LA-ICP-MS se transformaron en imágenes de fracciones molares, lo que permitió determinar la distribución de las abundancias naturales y las enriquecidas isotópicamente de los AgNCs bioconjugados. Para tal fin, las señales de  $^{107}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  medidas se corrigieron por sesgo de masa (*mass bias*) utilizando la corrección por *bracketing* de un estándar de Ag de abundancia natural ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  Ag en gelatina). A continuación, los datos de intensidad de masa corregida se transformaron en abundancias isotópicas y las fracciones molares de  $^{nat}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  resueltas en el tiempo se obtuvieron mediante regresión lineal múltiple, siguiendo un protocolo similar al propuesto previamente para el análisis de Zn en células en cultivo<sup>31</sup>. La Figura 42 muestra las imágenes de las fracciones molares de  $^{nat}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  después de los cálculos matemáticos basados en IPD. Como se recoge en la Figura 42a, se obtuvieron fracciones molares de  $^{nat}\text{Ag}$  de alrededor de 1 a lo largo de la imagen cuando la retina humana no estaba presente (contribución natural de Ag del gas portador He). Para localizar claramente el tejido ocular, se han dibujado dos líneas de color marrón claro en las imágenes de fracción molar que señalan la región de la retina ablacionada con el haz láser. Cuando se ablacionó el tejido ocular, también se obtuvieron fracciones molares de  $^{nat}\text{Ag}$  cercanas a 1. Sin embargo, en este caso se puede atribuir tanto a la presencia de MT1/2 en las tres capas donde se identificaron los  $^{nat}\text{AgNC}$  (las capas nucleares externa e interna y las células ganglionares) como al gas portador He durante

la ablación de las capas donde la MT1/2 no estaba presente (es decir, fotorreceptores, capas plexiformes externa e interna y la capa de fibras nerviosas).

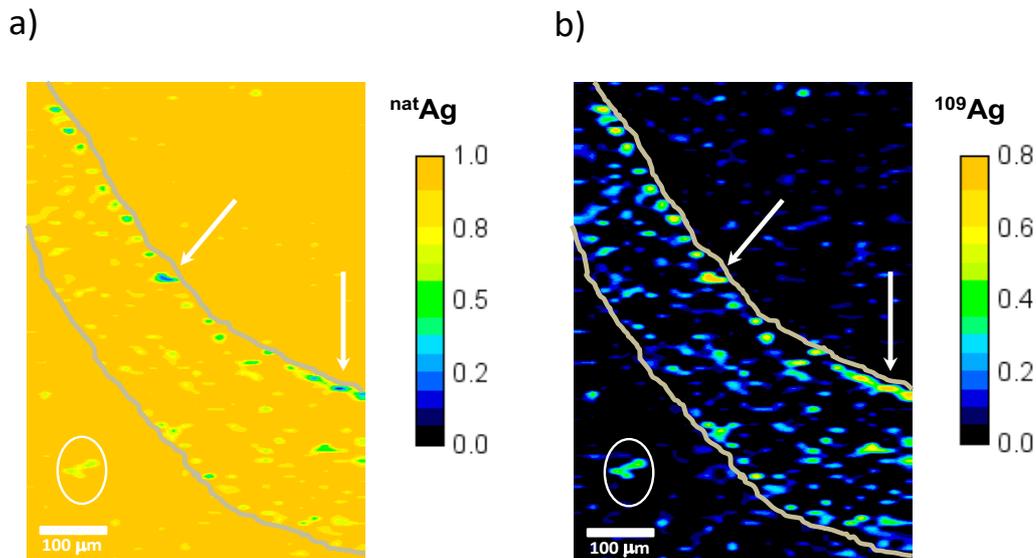


Figura 42. Imágenes de la fracción molar de  $^{nat}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  obtenidas por LA-ICP-MS en la retina humana para una sección de tejido sometida al protocolo IHC con el bioconjugado anti-MT1/2: $^{nat}\text{AgNCs}$  y bioconjugado anti-SOD1: $^{109}\text{AgNCs}$ . El área incluida dentro de las dos líneas de color marrón claro dibujadas en las imágenes señala la zona de la retina ablacionada con el láser. a) fracción molar de  $^{nat}\text{Ag}$ ; y b) fracción molar de  $^{109}\text{Ag}$ .

Por otro lado, las fracciones molares de  $^{109}\text{Ag}$  (Figura 42b) confirmaron que la proteína SOD1 se distribuía principalmente a lo largo de tres de las capas de la retina. Además, las imágenes de las fracciones molares de  $^{nat}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$  permiten saber que, aunque se encontró que las proteínas MT1/2 y SOD1 están distribuidas a lo largo de las mismas capas de la retina, hay algunas regiones del tejido donde ambas proteínas no están ubicadas conjuntamente o no están al mismo nivel de concentración. Por ejemplo, las dos flechas blancas marcadas en las imágenes de fracción molar de la Figura 42a y 42b indican regiones de la capa nuclear externa donde estaba presente la proteína SOD1, mientras que la presencia de MT1/2 fue comparativamente insignificante. Cabe mencionar que algunos valores atípicos (el mayor está marcado en las imágenes con un círculo) se pueden identificar en las imágenes durante la contribución del gas portador He (es decir, cuando la sección de tejido no debería ser ablacionada). Se pueden atribuir a algunos residuos generados por el tejido durante las diferentes etapas requeridas para el protocolo IHC. Finalmente, debe señalarse que mediante el uso de instrumentación de última generación (por ejemplo, que dispongan de pequeños diámetros de láser, cámaras de ablación ultrarrápidas, etc.) se pueden obtener imágenes de distribución de

proteínas de mayor resolución, lo que permitiría una mejor discriminación de las proteínas dentro capas en una escala por debajo de las micras<sup>32-35</sup>.

## 5. Conclusiones

Los NCs metálicos de pequeño tamaño constituidos por unos pocos a cientos de átomos son marcas con una gran proyección y aplicabilidad para el análisis elemental por MS, ya que proporcionan una alta amplificación de señal para la detección de biomoléculas. El uso de NCs de diferentes metales permitirá el análisis multiplexado en combinación con la detección por LA-ICP-MS. Además, la síntesis de NCs metálicos enriquecidos isotópicamente aumentará las opciones y versatilidad de este tipo de marcas.

En este trabajo se ha demostrado la viabilidad de sintetizar y aplicar marcas constituidas por NCs metálicos enriquecidos isotópicamente para la obtención simultánea de imágenes de proteínas en tejidos biológicos. Como prueba de concepto, se sintetizaron y emplearon <sup>nat</sup>AgNC y <sup>109</sup>AgNC fluorescentes, ambos con una emisión máxima de 660 nm y una intensidad similar, para estudios de *bioimaging* en las secciones de retina humana. La fluorescencia de los AgNCs permitió llevar a cabo el *bioimaging* mediante microscopía de fluorescencia; sin embargo, como era de esperar, los beneficios derivados del uso de NCs enriquecidas con isótopos solo se obtuvieron con la detección mediante LA-ICP-MS.

Por último, merece destacarse que una ventaja adicional de sintetizar NCs de metales enriquecidos isotópicamente para la detección por espectrometría de masas elemental es que, como se ha demostrado en este capítulo, el procedimiento de preparación es el mismo que con el correspondiente al utilizado para el metal de composición isotópica natural. Esto es de especial interés teniendo en cuenta que la síntesis de NCs metálicos no es un paso sencillo y su caracterización puede ser tediosa y prolongarse en el tiempo.

## Referencias bibliográficas

- <sup>1</sup> Larginho, M., Baptista, P. V. (2012). Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics—from genomics to proteomics. *Journal of proteomics*, 75(10), 2811-2823
- <sup>2</sup> Beyene, H. D., Werkneh, A. A., Bezabh, H. K., Ambaye, T. G. (2017). Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustainable materials and technologies*, 13, 18-23
- <sup>3</sup> Cheng, Y. H., Cheung, Y. F., Tam, T. S. C., Lok, C. N., Sun, H., Ng, K. M. (2019). Plasmonic metal nanoparticles as efficient mass tags for ion signal amplification and ultrasensitive detection of protein markers. *Analytica Chimica Acta*, 1055, 1-6.
- <sup>4</sup> Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595-601.
- <sup>5</sup> Jalani, G., Lee, S., Jung, C. W., Jang, H., Choo, J., Lim, D. W. (2013). Controlled biohybrid nanoprobe with silver nanoparticle clusters for Raman imaging. *Analyst*, 138(17), 4756-4759.
- <sup>6</sup> Shore, M. S., Wang, J., Johnston-Peck, A. C., Oldenburg, A. L., Tracy, J. B. (2011). Synthesis of Au (Core)/Ag (Shell) nanoparticles and their conversion to AuAg alloy nanoparticles. *Small*, 7(2), 230-234.
- <sup>7</sup> 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 advances*, 4(105), 60581-60596
- <sup>8</sup> 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 advances*, 4(105), 60581-60596
- <sup>9</sup> Yin, M. M., Chen, W. Q., Liu, Y., Jiang, F. L. (2019). Au x Ag1-x nanocomposites with 40-fold emission enhancement formed by the electrostatic assembly of gold nanoclusters and silver nanoclusters for bioimaging and bioanalysis. *ACS Applied Nano Materials*, 2(1), 408-417
- <sup>10</sup> 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. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93, 78-101.
- <sup>11</sup> Meermann, B., Nischwitz, V. (2018). ICP-MS for the analysis at the nanoscale—a tutorial review. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 33(9), 1432-1468.
- <sup>12</sup> Yin, X., Chen, B., He, M., Hu, B. (2019). 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. *Microchimica Acta*, 186(7), 1-8.
- <sup>13</sup> Lores-Padín, A., Cruz-Alonso, M., González-Iglesias, H., Fernández, B., Pereiro, R. (2019). Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay. *Microchimica Acta*, 186(11), 1-10.
- <sup>14</sup> Sajnóg, A., Hanć, A., Barańkiewicz, D. (2018). Metrological approach to quantitative analysis of clinical samples by LA-ICP-MS: A critical review of recent studies. *Talanta*, 182, 92-110
- <sup>15</sup> Cruz-Alonso, M., Lores-Padín, A., Valencia, E., González-Iglesias, H., Fernández, B., Pereiro, R. (2019). 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(3), 549-558

<sup>16</sup>Van Acker, T., Buckle, T., Van Malderen, S. J., van Willigen, D. M., van Unen, V., van Leeuwen, F. W., Vanhaecke, F. (2019). 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. *Analytica chimica acta*, 1074, 43-53

<sup>17</sup> Seuma, J., Bunch, J., Cox, A., McLeod, C., Bell, J., Murray, C. (2008). Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics*, 8(18), 3775-3784.

<sup>18</sup> Paul, B., Hare, D. J., Bishop, D. P., Paton, C., Nguyen, V. T., Cole, N., Niedwiecki, M. M., Andreozzi, E., Vais, A., Billings, J. L., Bray, L., Bush, A. I., McColl, G., Roberts, B. R., Adlard, P. A., Finkelstein, D. I., Hellstrom, J., Hergt, J. M., Woodhead, J. D., Doble, P. A. (2015). Correction: Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. *Chemical science*, 6(11), 6677-6677.

<sup>19</sup> Hare, D.J., Lei, P., Ayton, S., Roberts, B. R., Grimm, R., George, J. L., Bishop, D. P., Beavis, A. D., Donovan, S. J., McColl, G., Volitakis, I., Masters, C. L., Adlard, P. A., Cherny, R. A., Bush, A. I., Finkelstein, D. I., Doble, P. A. (2014). An iron-dopamine index predicts risk of parkinsonian neurodegeneration in the substantia nigra pars compacta. *Chemical Science*, 5(6), 2160-2169.

<sup>20</sup> González de Vega, R., Clases, D., Fernández-Sánchez, M. L., Eiró, N., González, L. O., Vizoso, F. J., Doble, P.A., Sanz-Medel, A. (2019). MMP-11 as a biomarker for metastatic breast cancer by immunohistochemical-assisted imaging mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(3), 639-646.

<sup>21</sup> Tvrdonova, M., Vlcnovska, M., Vanickova, L. P., Kanicky, V., Adam, V., Ascher, L., Jakubowski, N., Vaculovicova, M., Vaculovic, T. (2019). Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(3), 559-564.

<sup>22</sup> Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Garcia, M., González-Iglesias, H., Pereiro, R. (2018). Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels. *Analytical chemistry*, 90(20), 12145-12151.

<sup>23</sup> Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Navarro, A., Junceda, S., Astudillo, A., Pereiro, R. (2019). Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta*, 197, 413-421.

<sup>24</sup> Giesen, C., Wang, H. A., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schöffler, P. J., Grolimund, D., Buhmann, J. M., Brandt, S., Varga, Z., Wild, P.J., Günther, D., Bodenmiller, B. (2014). Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nature methods*, 11(4), 417-422.

<sup>25</sup> Alonso, J., & Gonzalez, P. (2013). *Isotope dilution mass spectrometry*. Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom

<sup>26</sup> Huang, L., Deng, X., Li, R., Xia, Y., Bai, G., Siddique, K. H., & Guo, P. (2018). A fast silver staining protocol enabling simple and efficient detection of SSR markers using a non-denaturing polyacrylamide gel. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (134), e57192.

- <sup>27</sup> Xie, S., Wong, A. Y., Kwok, R. T., Li, Y., Su, H., Lam, J. W., ... & Tang, B. Z. (2018). Fluorogenic Ag<sup>+</sup>-tetrazolate aggregation enables efficient fluorescent biological silver staining. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(20), 5750-5753.
- <sup>28</sup> Valverde, F., Costas, M., Pena, F., Lavilla, I., Bendicho, C. (2008). Determination of total silver and silver species in coastal seawater by inductively-coupled plasma mass spectrometry after batch sorption experiments with Chelex-100 resin. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 20(4), 217-226.
- <sup>29</sup> Cruz-Alonso, M., Fernandez, B., Álvarez, L., González-Iglesias, H., Traub, H., Jakubowski, N., Pereiro, R. (2018). *Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by laser ablation-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags*. *Microchimica Acta*, 185, 1, 64.
- <sup>30</sup> Fernández-Menéndez, S., Peixoto, R. R. A., Fernández-Colomer, B., Romero, M. C., Sanz-Medel, A., & Fernández-Sánchez, M. L. (2018). Searching for enhanced iron fortification of formula milk via nanoparticles and Isotope Pattern Deconvolution. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 148, 165-171.
- <sup>31</sup> Rodríguez-Menéndez, S., Fernández, B., González-Iglesias, H., García, M., Álvarez, L., Garcia Alonso, J. I., & Pereiro, R. (2019). Isotopically Enriched Tracers and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Methodologies to Study Zinc Supplementation in Single-Cells of Retinal Pigment Epithelium in Vitro. *Analytical chemistry*, 91(7), 4488-4495.
- <sup>32</sup> Van Malderen, S. J., Managh, A. J., Sharp, B. L., & Vanhaecke, F. (2016). Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bioimaging applications. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(2), 423-439.
- <sup>33</sup> Van Acker, T., Buckle, T., Van Malderen, S. J., van Willigen, D. M., van Unen, V., van Leeuwen, F. W., & Vanhaecke, F. (2019). 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. *Analytica chimica acta*, 1074, 43-53.
- <sup>34</sup> Pisonero, J., Bouzas-Ramos, D., Traub, H., Cappella, B., Álvarez-Llamas, C., Richter, S., Mayo, J. C., Costa-Fernandez, J. M., Bordel, N., Jakubowski, N. (2019). Critical evaluation of fast and highly resolved elemental distribution in single cells using LA-ICP-SFMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(4), 655-663.
- <sup>35</sup> Theiner, S., Schweikert, A., Van Malderen, S. J., Schoeberl, A., Neumayer, S., Jilma, P., Peyrl, A., Koellensperger, G. (2019). Laser ablation-inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry imaging of trace elements at the single-cell level for clinical practice. *Analytical chemistry*, 91(13), 8207-8212.

# **CAPÍTULO 4**

## **Desarrollo de un método de separación cromatográfico de Ca rápido y para pequeños volúmenes de muestra con el fin de estudiar posibles alteraciones en la composición isotópica de este elemento asociadas al glaucoma**

### **1. Introducción**

Las estrategias de miniaturización, tanto para la extracción como para el análisis de fluidos biológicos, en combinación con un mejor rendimiento de las técnicas analíticas con fines de diagnóstico son tendencias actuales de investigación científico-tecnológica<sup>1</sup>. Debido a los bajos límites de detección que pueden lograrse con los sistemas de espectrometría de masas elemental (ICP-MS), disponer de ya sea un volumen reducido o de una concentración baja de analito no debería ser una limitación importante<sup>2</sup>. La situación se presenta diferente cuando se trata de llevar a cabo análisis isotópico de alta precisión mediante ICP-MS de tipo multicolector (MC), ya que el análisis de concentraciones absolutas de isótopos a niveles bajos ( $< 100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) no es una tarea fácil con la instrumentación disponible en la actualidad<sup>3</sup>. Sin embargo, cada vez más se encuentran trabajos en los que se apuesta por disminuir la cantidad de analito requerido para tal fin. El uso de sistemas de desolvatación de aerosoles, la posibilidad de emplear una interfaz Jet de alta eficiencia, amplificadores de copa de Faraday de alta ganancia ( $10^{13} \Omega$  respecto a los  $10^{11} \Omega$  convencionales) y los contadores de iones, han mejorado el rendimiento en términos de sensibilidad<sup>4,5</sup>. Por otro lado, se pueden emplear estrategias metodológicas tales como, la adición al analito con un estándar de analito no enriquecido de composición isotópica conocida<sup>3</sup>, procedimientos de preconcentración<sup>6</sup> o el uso de pequeñas gotas de suero depositadas sobre silicio (con introducción de muestra por ablación láser)<sup>7</sup>, son algunas de las estrategias propuestas para extender las aplicaciones de MC-ICP-MS dentro de un contexto clínico.

El calcio (Ca) participa en numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos del organismo (por ejemplo, transmisión sináptica, señalización celular, formación ósea, coagulación sanguínea, etc.) y su equilibrio está estrictamente regulado para mantener

niveles de concentración relativamente constantes y así asegurar una homeostasis adecuada.<sup>8</sup> El Ca también juega un papel importante en la fisiología del ojo y el ciclo visual. De hecho, varias patologías oculares, incluidas diferentes formas de degeneración retiniana y el crecimiento anormal de precursores retinianos u otros tipos de células en el ojo, a menudo son causadas por mutaciones en genes implicados en la regulación del Ca.<sup>9</sup> Proteínas de unión a Ca participan además en distintos procesos tales como el control del estrés oxidativo, la apoptosis y en eventos inflamatorios<sup>10</sup>. Por tanto, las medidas del fraccionamiento isotópico de Ca, atribuido a las diferentes reacciones (bio)químicas, podrían proporcionar información importante relacionada con el estado fisiológico del ojo, contribuyendo a arrojar luz sobre las alteraciones existentes relacionadas con la homeostasis de este elemento en el sistema visual y su relación con los procesos neurodegenerativos asociados a la edad.

La desregulación de la homeostasis del Ca se ha relacionado con el inicio y la progresión de glaucoma<sup>11</sup>, una enfermedad ocular neurodegenerativa de origen multifactorial en la que la disfunción del flujo normal del humor acuoso se considera uno de los principales factores de riesgo. Este líquido intraocular se deriva principalmente del plasma sanguíneo y se secreta a una velocidad de 2,0-2,5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Contiene proteínas, metabolitos y elementos esenciales que pueden verse alterados durante la enfermedad del glaucoma<sup>12</sup>. El acceso al humor acuoso (muestreo *in vivo*) requiere de una técnica invasiva para su extracción, y es importante señalar que no todo el humor acuoso puede extraerse de los ojos de los pacientes, siendo los volúmenes obtenidos generalmente inferiores a 250  $\mu\text{L}$ <sup>13</sup>.

Hasta la fecha la mayoría de los artículos que recogen análisis isotópico de alta precisión en clínica y biomedicina (estudios caso-control, i.e., control frente a enfermos), se centran en el análisis de Fe, Cu y Zn fundamentalmente<sup>14</sup>. El Ca, a pesar de ser un elemento muy presente en el cuerpo humano ha sido objeto de menor estudio respecto al análisis de relaciones isotópicas en muestras biológicas de origen humano, estando los estudios disponibles principalmente relacionados con enfermedades relacionadas con el equilibrio mineral óseo<sup>Error! Marcador no definido.</sup> ya sea empleando sangre<sup>15</sup>, suero<sup>16,17</sup> u orina<sup>18-23</sup> como muestra.

En los últimos años, se han publicado varios trabajos en los que se describen procedimientos de purificación de Ca para su posterior análisis isotópico por MC-ICP-MS<sup>Error! Marcador no definido.,24,25</sup>. Estos protocolos generalmente emplean 1-2 mL de resina de intercambio iónico, y los volúmenes de muestra cargados entre 0,5 y 2 mL. Normalmente, se necesitan además grandes volúmenes eluyente (~60 mL o incluso más) para completar el procedimiento de purificación. Por tanto, estos procedimientos pueden considerarse lentos que además en el caso de muestras de las que se dispone de pequeño volumen no brindan ventajas y, de hecho, no hay necesidad de usar una gran cantidad de reactivos químicos.

## 2. Objetivos

Con el objetivo de explorar las posibilidades del análisis isotópico de Ca en el humor acuoso en el contexto de las enfermedades oculares, y más específicamente el glaucoma y dado que los volúmenes de humor acuoso disponibles para el análisis suelen estar en el nivel de los 100-250  $\mu\text{L}$ , en este capítulo se desarrolló un procedimiento de purificación para este elemento, persiguiendo un protocolo que fuese rápido y empleando poca cantidad de muestra y resina.

Para ello, se estudiarán los perfiles de elución de dos protocolos seleccionados y adecuados para la separación de Ca en muestras biológicas. De este modo se podrá determinar las condiciones óptimas en cuanto a volúmenes y concentración de disolventes a fin de minimizar el tiempo requerido para la extracción de Ca.

Posteriormente, se determinará la recuperación de la separación con el fin de comprobar que no se produce ningún efecto de fraccionamiento isotópico debido al proceso de separación. Para ello, se analizará el contenido total elemental de Ca en las muestras antes y después de atravesar la resina.

Finalmente, se determinarán las relaciones isotópicas de Ca mediante ICP-MS de tipo multicolector. De este modo, se podrá evaluar, como prueba de concepto, si existen

diferencias entre un grupo denominado control (individuos sin glaucoma) y otro de pacientes con glaucoma de tipo pseudoexfoliativo.

### **3. Procedimiento Experimental**

#### **3.1. Toma de muestras**

El trabajo recogido en este capítulo se diseñó de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre investigación biomédica en seres humanos obteniéndose la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Principado de Asturias (Oviedo, España). En concreto, las muestras de humor acuoso se tomaron, por personal clínico especializado del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo, España), de 4 donantes control ( $83 \pm 7,26$  años) y 6 pacientes diagnosticados con glaucoma pseudoexfoliativo ( $75,5 \pm 14,46$ ), tras firmar el consentimiento informado. Todos los individuos fueron sometidos a examen oftalmológico completo y los pacientes con glaucoma también fueron sometidos a pruebas oftalmológicas más específicas. Todos padecían cataratas y no presentaban patologías oculares relevantes como retinopatías o maculopatías. Las personas diagnosticadas con glaucoma pseudoexfoliativo tenían depósitos de material fibrililar en la superficie anterior del cristalino y/o en el iris de uno o ambos ojos, como se reveló durante el examen con lámpara de hendidura. Se recogió humor acuoso (30-350  $\mu$ L) para ambos grupos (donantes control y pacientes con glaucoma) al comienzo de la cirugía de cataratas, colocando una aguja de calibre 27 en la cámara anterior del ojo. Una vez extraídas, las muestras se almacenaron a  $-80$  °C hasta su análisis.

La optimización del procedimiento de purificación de Ca se llevó a cabo empleando suero humano de un voluntario sano. Esta muestra se utiliza regularmente como control de calidad en el grupo de investigación y se dispone de un registro de concentraciones elementales para asegurar el correcto desempeño del trabajo experimental.

### 3.2. Materiales y reactivos

- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% (Sigma Aldrich, España)
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (grado tracemetal, Fisher Scientific, EE. UU.)
- Resina AG50W-X8 (malla de 200-400, en forma de hidrógeno, Bio-Rad, España)
- Columnas vacías de polipropileno + polietileno de Triskem International (Francia) con 7 mm de diámetro interno
- Agua ultrapura (dispensador Purelab flex, Elga Lab water, Reino Unido)
- Placa calefactora 230 V -30x20-12 cm con control de temperatura (Analab, Hoemheim, Francia)
- Viales de PFA de capacidad 15 mL con fondo redondeado (ISC Science SL, Oviedo, Spain)
- Ácido clorhídrico (HCl) de grado de pureza proanalysis (VWR, España)

### 3.3. Instrumentación

- ICP-MS 7700 (Agilent, EE. UU.) equipado con una celda de colisión/reacción usando gas He (caudal de 4,3 mL min<sup>-1</sup>) mediante calibración externa.
- Disolución estándar de 10000 mg L<sup>-1</sup> Ca (Lote #1404943, High-Purity Standards, EE. UU.).
- Disolución estándar de 1000 mg L<sup>-1</sup> Ga (Merck, España).
- Disoluciones madre estándar de P, Mg, K, Fe, Cu, Zn (1000 mg L<sup>-1</sup>) y Na (con 10000 mg L<sup>-1</sup>) de Merck.
- ICP-MS de tipo multicolector Neptune MC-ICP-MS (Thermo Scientific, Alemania).

### 3.4. Preparación de las muestras

La digestión de las muestras (suero humano y humor acuoso) se llevó a cabo en viales de PFA Savillex®, previamente limpiados tanto con HNO<sub>3</sub> como con HCl, y

posteriores lavados repetidos con agua ultrapura. Alícuotas de 1 mL de suero fueron mineralizadas en medio ácido a 110 °C durante la noche, utilizando 4 mL de HNO<sub>3</sub> 14 M y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9,8 M. En el caso del humor acuoso (los volúmenes se recogen en la Tabla 14) la digestión llevada a cabo es similar, pero modificando ligeramente la cantidad de HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empleando. En particular, se emplearon 500 µL de HNO<sub>3</sub> 14 M y 125 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9,8 M (es decir, relación v/v 4:1). Una vez cerrados los viales se calentó a 110 °C para a continuación evaporar el disolvente y redissolver en el medio para la purificación de Ca (se empleó 1 M HCl para el protocolo optimizado). Para el suero tras la digestión se reconstituyó en 1 mL y para las muestras de humor acuoso en 300 µL.

### 3.5. Análisis elemental mediante ICP-MS

Las determinaciones elementales y las recuperaciones de Ca después del proceso de purificación se midieron utilizando ICP-MS 7700 (Agilent, EE. UU.) equipado con una celda de colisión/reacción usando He gas (caudal de 4,3 mL.min<sup>-1</sup>) mediante calibración externa. Se seleccionó Ga como estándar interno para la corrección del efecto matriz y la deriva instrumental. Además de Ca, se midieron P, Mg, K, Fe, Cu, Zn para obtener los perfiles de elución de los protocolos probados, así como verificar la ausencia de elementos de la matriz en las fracciones de Ca purificadas obtenidas. El rango de concentraciones de calibrado para Ca fue de 0 a 700 ng.g<sup>-1</sup> y de 0 a 90 ng.g<sup>-1</sup> para el resto de los elementos. El análisis elemental se realizó en HCl 0,12 M.

### 3.6. Medida de relaciones isotópicas de Ca mediante MC-ICP-MS

Los isótopos <sup>42</sup>Ca, <sup>43</sup>Ca y <sup>44</sup>Ca se monitorizaron siguiendo la secuencia de medida estándar- muestra-estándar (*bracketing*) y se midieron en HNO<sub>3</sub> 0,14 M (previamente, las fracciones de Ca purificadas en HCl 0,12 M fueron evaporadas). La Tabla 13 muestra la configuración de copas empleada y los parámetros instrumentales de medida. Se comprobó que no hubiera contribución de <sup>88</sup>Sr<sup>2+</sup> o <sup>84</sup>Sr<sup>2+</sup> a la señal de <sup>44</sup>Ca<sup>+</sup> y <sup>42</sup>Ca<sup>+</sup>, la cual se tuvo en cuenta monitorizando la señal medida a 43,5 de masa (<sup>87</sup>Sr<sup>2+</sup>). De hecho, se midieron niveles de fondo por debajo de 6·10<sup>-5</sup> mV para 43,5 m/z para las muestras

y para el patrón estándar utilizado para la corrección mediante *bracketing*. Las medidas de Ca se realizaron en resolución *pseudo-media* después de seleccionar una posición del campo magnético en la que el  $^{42}\text{Ca}^+$  estaba libre de la interferencia del  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$ , es decir, en el hombro plano izquierdo del pico espectral<sup>25</sup>. La concentración de Ca para muestras y el patrón utilizado para la corrección por *bracketing* se ajustaron a  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En estas condiciones, las señales registradas fueron de aproximadamente 0,19 V, 0,04 V y 0,7 V para los isótopos 42, 43 y 44 de Ca, respectivamente. Debido a la baja señal de  $^{43}\text{Ca}$ , se utilizó únicamente la relación isotópica  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ . Por último y para evitar la corrección del blanco de procedimiento sobre las señales obtenidas en el MC-ICP-MS para cada una de las muestras, el patrón de Ca que se empleó para la corrección de la discriminación de masas también fue sometido al protocolo de purificación seleccionado, evaporado y redisoluelto a una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (igual que para las muestras). Previo al análisis se comprobó que la recuperación de Ca tras la purificación era del 100 %.

Tabla 12. Configuración de la copa y los ajustes instrumentales empleados para la medida de relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS.

<b>Configuración de copas</b>	$^{42}\text{Ca}^+$ : L4; $^{43}\text{Ca}^+$ : L2; 43.5: L1; $^{44}\text{Ca}^+$ : C
<b>Potencia RF (W)</b>	1100
<b>Flujo de Ar (<math>\text{L}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</b>	Gas del plasma: 15 Gas auxiliar: 0,8 Gas de nebulización: 1,03
<b>Modo de resolución</b>	Media
<b>Número de bloques</b>	6
<b>Número de ciclos</b>	8
<b>Tiempo de integración (s)</b>	4,194

La composición isotópica, expresada como  $\delta^{44/42}$  (Ecuación 3), se calculó con respecto a la disolución estándar de Ca que también se sometió al procedimiento de purificación optimizado. Antes del cálculo de los valores de  $\delta$ , se llevo a cabo la eliminación de valores atípicos (*outliers*) basada en una prueba de  $2\sigma$ .

$$\delta^{44/42}Ca = \left[ \frac{(Ca^{44/42})_{muestra} - (Ca^{44/42})_{estándar}}{(Ca^{44/42})_{estándar}} \right] \times 1000 \text{ (Ecuación 3)}$$

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Optimización del proceso de purificación de calcio en suero

Como punto de partida se tomaron 3 trabajos en los que se propone un protocolo de purificación de Ca en muestras biológicas<sup>13,23,25</sup>, todos ellos empleando la resina de intercambio catiónico AGW-X8. Teniendo en cuenta el volumen limitado de humor acuoso disponible, se decidió emplear 0,5 mL de resina únicamente, se adaptaron a esta cantidad de resina los protocolos publicados ya mencionados y se evaluaron empleando suero. El primero correspondía a un procedimiento que usaba 2,5 M HCl como disolvente para la carga de la muestra<sup>23</sup>. Sin embargo, con esta estrategia, se observó que el Ca no se retenía en la resina, siendo eluido directamente de la columna en la carga de la muestra y por tanto descartado.

En la Tabla 15 se ha recopilado un resumen de los diferentes pasos que involucran a los otros dos protocolos considerados (protocolo 1 y protocolo 2). Los perfiles de elución (fracciones de 2 mL) obtenidos para ambos protocolos se muestran en la Figura 43. La Figura 43a corresponde al protocolo adaptado de Tacail *et al*<sup>13</sup>. (protocolo 1). Se puede observar que, en los experimentos llevados a cabo en relación a este capítulo, usando HCl 1 M como eluyente, el Ca eluye entre 9-21 mL después de cargar la muestra, un volumen considerablemente menor en comparación con el empleado previamente<sup>13</sup>, en el que se utilizaban 65 mL de eluyente, 2 mL de carga de muestra y 3 mL de resina. Al reducirse la cantidad de eluyente, la separación es más rápida. Se puede ver que el Ca además eluye libre de todos los elementos estudiados (Na, Mg, P, K, Fe, Cu y Zn); únicamente eluye algo de Zn con Ca, pero esta cantidad resultó ser mucho menor ( $0,09 \text{ ug.g}^{-1}$ ) a la concentración de Ca en la muestra ( $109 \text{ ug.g}^{-1}$ ). En el caso del protocolo 2<sup>25</sup> (Figura 43b), sin embargo, el Ca eluye conjuntamente con Fe y Zn con lo que sería necesaria una segunda etapa de separación para eliminar estos elementos en la fracción de Ca. A la vista de estos resultados se seleccionó el protocolo 1 para su aplicación a las muestras de humor acuoso, no sin antes comprobar que la recuperación de Ca obtenida para el suero fue cuantitativa:  $95 \pm 3. \%$

Tabla 13. Condiciones experimentales del protocolo 1 y 2 evaluadas para la purificación de Ca. Para ambos procedimientos se utilizó 0,5 mL de resina AG50W-x8.

	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2
<b>1. Limpieza de resina</b>	6 M HCl (10 mL) 2,5 M HCl (10 mL) Milli Q (10 mL)	
<b>2. Acondicionamiento de resina</b>	1 M HCl (10 mL)	0,4 M HCl (10 mL)
<b>3. Carga de muestra</b>	1 M HCl (0,25 mL)	0,4 M HCl (0.25 mL)
<b>4. Elución de la matriz</b>	1 M HCl (8 mL)	0,4 M HCl (34 mL) 0,5 M HCl + 12,94 M acetone (10 mL) 0,8 M HCl (7 mL)
<b>5. Elución de Ca</b>	<b>1 M HCl (13 mL)</b>	<b>0,8 M HCl (13 mL)</b>

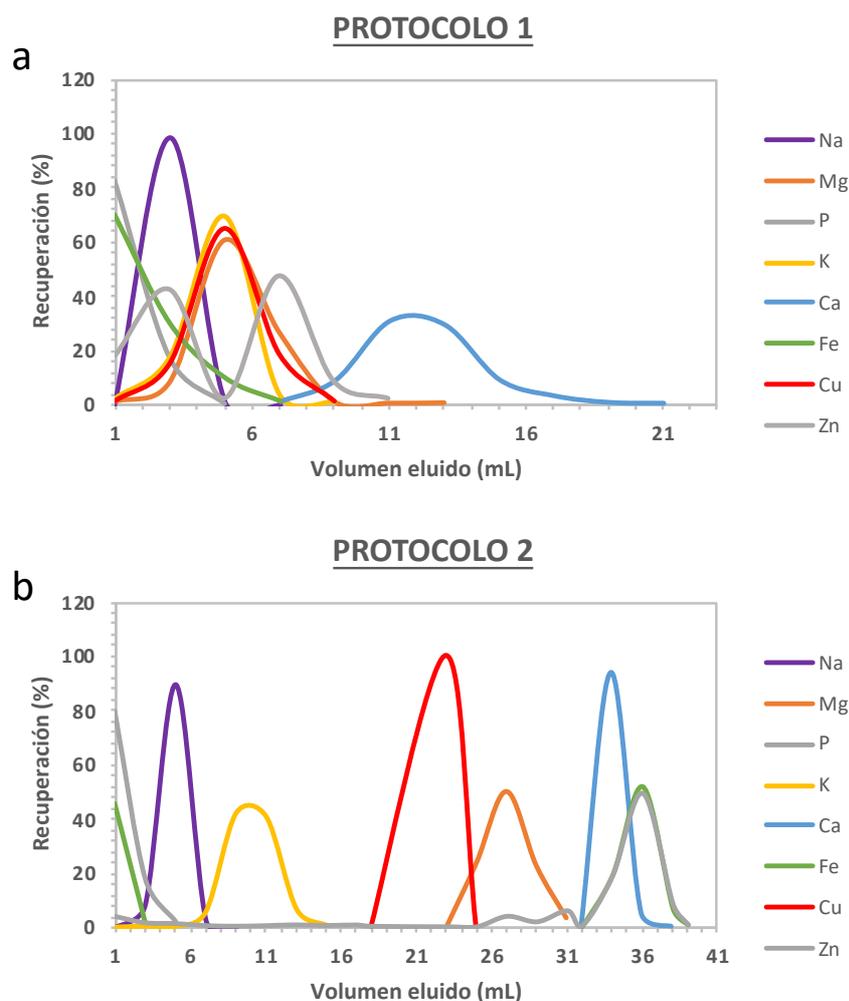


Figura 43. Perfiles de elución obtenidos para los protocolos 1 (a), y protocolo 2 (b) utilizando 0,5 mL de resina AG50W-X8.

Finalmente, y para asegurar la purificación adecuada el protocolo seleccionado se aplicó a cinco réplicas de digestión del suero modelo (junto con tres blancos de procedimiento), recogiendo todo el Ca en una única fracción. Después de la evaporación y reconstitución de dicha fracción en HCl 0,12 M, se determinaron de Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn y P, asegurando la ausencia de dichos elementos (incluido el Zn) en dicha fracción.

## 4.2. Análisis elemental y purificación del Ca en humor acuoso

Antes de aplicar el protocolo 1 a las muestras de humor acuoso, se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer la composición elemental del humor acuoso. Una publicación reciente<sup>26</sup> recoge rangos de concentración en individuos con cataratas

(mismo caso que el grupo control analizado en este grupo) entre 2070-3936 mg·L<sup>-1</sup> para Na; 13-30 mg·L<sup>-1</sup> para P y 5-17 mg·L<sup>-1</sup> para Mg; y niveles de Cu, Fe y Zn en el rango de μg·L<sup>-1</sup>.

Para preservar la mayor cantidad de muestra posible, el Ca y los componentes de la matriz elemental para las muestras investigadas, el digerido únicamente se midió después del procedimiento de purificación (los blancos de procedimiento de Ca referidos a las soluciones sin diluir fueron  $2,3 \pm 0,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ). En la Tabla 14 se recoge el volumen de humor acuoso disponible para cada muestra y las concentraciones de Ca obtenidas (calculadas a partir del digerido para cada una de las muestras investigadas. Como se puede observar, los niveles de concentración de Ca oscilan entre 43 y 220 mg·L<sup>-1</sup> en este fluido ocular. Debido al número limitado de muestras disponibles, no se realizó ningún análisis estadístico para la comparación de grupos. Solo se examinaron los niveles promedio de Ca para cada grupo, lo que aportó resultados similares en ambos casos:  $135 \pm 62 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (controles) y  $114 \pm 66 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (pacientes con glaucoma). Los niveles de Ca en el humor acuoso también han sido examinados en la bibliografía reciente, obteniéndose diferentes resultados. Por ejemplo, Zhou *et al.*<sup>27</sup> encontraron en promedio  $48,8 \pm 5,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ca (n = 24, edad:  $72,46 \pm 11,83$  años, individuos con catarata senil). Estos resultados concuerdan con otras publicaciones que presentan concentraciones de Ca en humor acuoso entre 50-80 mg·L<sup>-1</sup> de Ca.<sup>28</sup> Por otro lado, Dolar-Szczasny *et al.*<sup>29</sup> han publicado un trabajo mostrando niveles de oligoelementos en humor acuoso de pacientes con cataratas y han aportado valores promedio ( $294,5 \pm 162,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ca), con intervalos de concentraciones mínimas y máximas de 98,98 mg·L<sup>-1</sup> Ca y 1162 mg·L<sup>-1</sup> Ca, respectivamente, en un total 115 pacientes con cataratas de una edad promedio de  $74 \pm 7,27$  años. Por tanto, los niveles de Ca obtenidos en el presente trabajo, que oscilan entre 53 y 220 mg·L<sup>-1</sup>, se encuentran dentro del rango de valores. Las concentraciones de este elemento en humor acuoso tampoco difieren con los publicados en otras patologías, entre ellas la diabetes<sup>30</sup>, o la retinitis por citomegalovirus<sup>13</sup>, lo que puede indicar una buena regulación de la homeostasis de este elemento en el organismo en esas circunstancias.

Tras la separación cromatográfica, evaporada la fracción de Ca y reconstituida en 0.12 M HCl, se evaluó el grado de recuperación de Ca. Se puede ver en la Tabla 14 como el grado de recuperación fue entre 94-114 % y por tanto cuantitativo para todas las muestras. En la fracción purificada de Ca se determinaron además Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn y P, estando en todos los casos por debajo de los límites de detección.

*Tabla 14. Concentraciones elementales (incertidumbre estimada de 3%) del Ca medido en muestras de humor acuoso y recuperaciones de Ca obtenidas después del proceso de purificación mediante ICP-MS. Se indica el volumen de muestra de humor acuoso disponible para cada análisis. Los valores de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  obtenidos han sido corregidos. Las Incertidumbres para CT2 y CT4 corresponden a la desviación estándar para la medida de dos réplicas de la misma muestra. Para el resto de las muestras, la incertidumbre corresponde a la RSD (expresada en %) obtenida de la medida de  $^{44/42}\text{Ca}$  para cada estándar realizada entre cada muestra.*

		Volumen de muestra ( $\mu\text{L}$ )	[Ca] ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recuperación (%)	$\delta^{44/42}\text{Ca}$
<b>CONTROLES</b>	CT1	180	67	110	$0,77 \pm 0,52$
	CT2	60	173	114	$0,81 \pm 0,21$
	CT3	80	200	94	$-1,4 \pm 0,4$
	CT4	200	98	106	$0,22 \pm 0,16$
<b>PACIENTES CON GLAUCOMA</b>	GPXE1	60	151	103	$-2,4 \pm 0,5$
	GPXE2	30	220	97	$-0,40 \pm 0,20$
	GPXE3	115	53	98	$0,68 \pm 0,17$
	GPXE4	115	102	102	$0,32 \pm 0,23$
	GPXE5	350	115	99	$-1,6 \pm 0,4$
	GPXE6	160	43	100	$-1,4 \pm 0,5$

### 4.3. Medidas de relaciones isotópicas de Ca por MC-ICP-MS.

El protocolo diseñado nos ha permitido estudiar posibles alteraciones de la homeostasis de Ca en muestras de humor acuoso de controles e individuos que padecen de glaucoma. El análisis isotópico mediante MC-ICP-MS se realizó preparando diluciones de la fracción de Ca purificada con una concentración de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ca. La corrección por *bracketing* se realizó con respecto a un estándar comercial de Ca que, como ya se ha comentado anteriormente, también se sometió al procedimiento de intercambio catiónico. La Figura 44 recoge los valores de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  obtenidos para las muestras investigadas (valores numéricos en la Tabla 14). Se puede observar que los valores de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  obtenidos para el grupo control oscilaron de -1,4 a 0,81 mientras que para los pacientes con glaucoma se obtuvo un rango más amplio, es decir,  $\delta^{44/42}\text{Ca}$ , de -2,4 a 0,68.

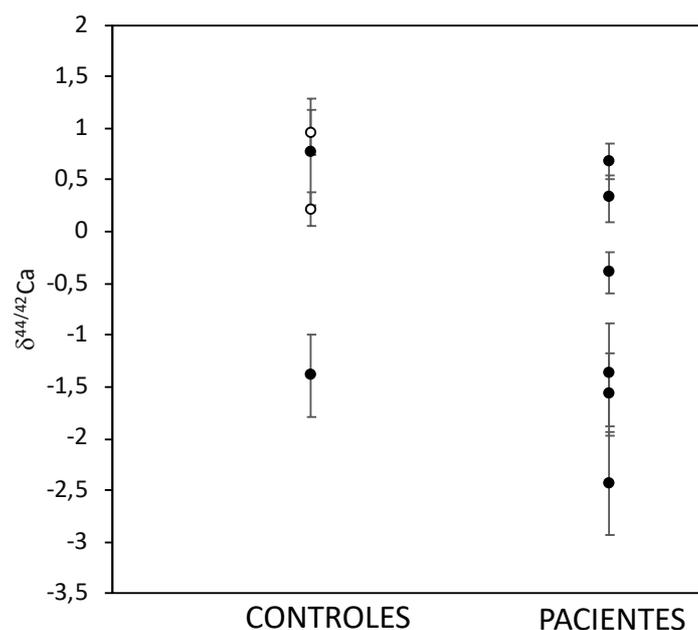


Figura 44. Valores de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  obtenidos para los controles y pacientes con glaucoma después de aplicar la corrección por *bracketing*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de la medida de dos réplicas para las muestras simbolizadas como un círculo blanco. Las barras de error para las muestras en los círculos negros corresponden a la RSD (expresada en %) obtenida durante la medida de  $^{44/42}\text{Ca}$  para cada estándar realizada entre cada muestra.

Los resultados obtenidos en este estudio, que muestran un rango más amplio de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  en el humor acuoso de pacientes con diagnosticados con la enfermedad de glaucoma que en sujetos control, son acordes con el comportamiento encontrado para

el análisis isotópico de Ca en suero de individuos con mieloma activo respecto a mieloma no activo<sup>16</sup>. Si bien el número de muestras analizadas es muy limitado como para extraer conclusiones concluyentes, las alteraciones en la composición isotópica del calcio podrían estar directamente relacionadas con alteraciones en las proteínas S100, que son proteínas Ca-dependientes. Esta familia de proteínas está involucrada en numerosas actividades celulares y, por ejemplo, la proteína S100A8 está asociada con la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la inflamación de la superficie ocular. De hecho, se ha encontrado que los niveles de S100A8 están elevados en el líquido lagrimal de pacientes con glaucoma bajo medicación crónica<sup>10</sup>. Algunas proteínas que contienen calcio adherido a sus estructuras, además de este elemento, también pueden estar reguladas por Zn o Cu<sup>10,31</sup>. Por lo tanto, los resultados obtenidos aquí para el Ca también podrían reflejarse en las composiciones isotópicas de Cu y Zn en humor acuoso para la misma patología tal. De hecho, un trabajo reciente ha revelado diferencias significativas en la composición isotópica de Zn (no de Cu) en el humor acuoso de pacientes con glaucoma en comparación con sujetos control<sup>26</sup>.

## 5. Conclusiones

En este capítulo de tesis se ha desarrollado un procedimiento de purificación de Ca rápido y para pequeños volúmenes de muestra, evitando el uso de un elevado volumen tanto de eluyentes. La cantidad de resina empleada es también inferior en comparación con los protocolos recogidos en la literatura. La recuperación del Ca tras la purificación es cuantitativa y además libre de elementos tales como Na, Mg, P, K, Fe, Cu y Zn.

Si bien no se encontraron diferencias en cuanto al rango de concentraciones encontradas entre el grupo control y glaucoma, los resultados derivados del análisis de la composición isotópica mostraron una mayor variabilidad y hacia valores negativos de  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  en el caso del grupo glaucoma, lo que podría estar relacionado con alteraciones a nivel de proteínas calcio dependientes.

---

## Referencias bibliográficas

---

- <sup>1</sup> Amais, R. S., Donati, G. L., Arruda, M. A. Z. (2020). ICP-MS and trace element analysis as tools for better understanding medical conditions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116094
- <sup>2</sup> Theiner, S., Schoeberl, A., Fischer, L., Neumayer, S., Hann, S., Koellensperger, G. (2019). FI-ICP-TOFMS for quantification of biologically essential trace elements in cerebrospinal fluid—high-throughput at low sample volume. *Analyst*, 144(15), 4653-4660
- <sup>3</sup> Costas-Rodríguez, M., Lobo, L., Vanhaecke, F. (2014). A novel approach to measure isotope ratios via multi-collector—inductively coupled plasma—mass spectrometry based on sample mixing with a non-enriched standard. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(18), 4393-4399
- <sup>4</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Santens, P., Vanhaecke, F. (2020). Multicollector Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry with 1013  $\Omega$  Faraday Cup Amplifiers for Ultrasensitive Mg Isotopic Analysis of Cerebrospinal Fluid Microsamples. *Analytical Chemistry*, 92(24), 15975-15981
- <sup>5</sup> Ma, Q., Yang, M., Zhao, H., Evans, N. J., Chu, Z. Y., Xie, L. W., Huang, C., Zhao, Z.D., Yang, Y. H. (2019). Accurate and precise determination of Lu and Hf contents and Hf isotopic composition at the sub-nanogram level in geological samples using MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(6), 1256-1262
- <sup>6</sup> Zhang, J., Li, J., Zhang, L., Wang, Z. B., Sun, S. L., Luo, Z. Y. (2020). Precise determination of the molybdenum isotopic composition of urine by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(7), e8658
- <sup>7</sup> García-Poyo, M. C., Bérail, S., Ronzani, A. L., Rello, L., García-González, E., Lelièvre, B., Cales, P., Nakadi, F. V., Aramendia, M., Resano, M., Pecheyran, C. (2021). Laser ablation of microdroplets for copper isotopic analysis via MC-ICP-MS. Analysis of serum microsamples for the diagnosis and follow-up treatment of Wilson's disease. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(5), 968-980
- <sup>8</sup> Robertson, W. G. Chemistry and Biochemistry of Calcium (chapter 1) in Calcium in the human biology, Ed. B. E. C. Nordin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988
- <sup>9</sup> Kenealey J.D., Polans A.S., Colley N.J. (2013) Calcium in Vision. In: Kretsinger R.H., Uversky V.N., Permyakov E.A. (eds) Encyclopedia of Metalloproteins. Springer, New York, NY
- <sup>10</sup> Tong, L., Lan, W., Lim, R. R., Chaurasia, S. S. (2014). S100A proteins as molecular targets in the ocular surface inflammatory diseases. *The ocular surface*, 12(1), 23-31
- <sup>11</sup> Crish, S. D., Calkins, D. J. (2011). Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience*, 176, 1-11
- <sup>12</sup> Shahidullah, M., Al-Malki, W. H., Delamere, N. A. (2011). Mechanism of Aqueous Humor Secretion, Its Regulation and Relevance to Glaucoma. In (Ed.), Glaucoma - Basic and Clinical Concepts.
- <sup>13</sup> Tacail, T., Albalat, E., Télouk, P., Balter, V. (2014). A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 29(3), 529-535
- <sup>14</sup> Costas-Rodríguez, M., Delanghe, J., Vanhaecke, F. (2016). High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine: natural isotope ratio variations as

---

potential diagnostic and/or prognostic markers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 182-193

<sup>15</sup> Channon, M. B., Gordon, G. W., Morgan, J. L., Skulan, J. L., Smith, S. M., Anbar, A. D. (2015). Using natural, stable calcium isotopes of human blood to detect and monitor changes in bone mineral balance. *Bone*, 77, 69-74

<sup>16</sup> Y. Yan, M. Ge, R. Ma, H. Zhao, D. Wang, C. Hu, J. Wang, W. Chen and C. Zhang. (2016). A candidate reference method for serum calcium measurement by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 461, 141-145

<sup>17</sup> Gordon, G. W., Monge, J., Channon, M. B., Wu, Q., Skulan, J. L., Anbar, A. D., Fonseca, R. (2014). Predicting multiple myeloma disease activity by analyzing natural calcium isotopic composition. *Leukemia*, 28(10), 2112-2115

<sup>18</sup> Eisenhauer, A., Müller, M., Heuser, A., Kolevica, A., Glüer, C. C., Both, M., Laue, C., Hehn, U., Kloth, S., Shroff, R., Schrezenmeir, J. (2019). *Calcium isotope ratios in blood and urine: a new biomarker for the diagnosis of osteoporosis*. *Bone reports*, 10, 100200

<sup>19</sup> Sturup, S., Hansen, M., Molgaard, C. (1997). Measurements of  $^{44}\text{Ca}$ :  $^{43}\text{Ca}$  and  $^{42}\text{Ca}$ :  $^{43}\text{Ca}$  Isotope Ratios in Urine Using High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *JAAS: Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(9), 919-923

<sup>20</sup> Morgan, J. L., Skulan, J. L., Gordon, G. W., Romaniello, S. J., Smith, S. M., Anbar, A. D. (2012). Rapidly assessing changes in bone mineral balance using natural stable calcium isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), 9989-9994

<sup>21</sup> Heuser, A., Frings-Meuthen, P., Rittweger, J., Galer, S. J. (2019). Calcium isotopes in human urine as a diagnostic tool for bone loss: additional evidence for time delays in bone response to experimental bed rest. *Frontiers in Physiology*, 12

<sup>22</sup> Heuser, A., Eisenhauer, A. (2010). A pilot study on the use of natural calcium isotope ( $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$ ) fractionation in urine as a proxy for the human body calcium balance. *Bone*, 46(4), 889-896

<sup>23</sup> Morgan, J. L., Gordon, G. W., Arrua, R. C., Skulan, J. L., Anbar, A. D., Bullen, T. D. (2011). High-precision measurement of variations in calcium isotope ratios in urine by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83(18), 6956-6962

<sup>24</sup> Tamhane, M., Cabrera-Ghayouri, S., Abelian, G., Viswanath, V. (2019). Review of biomarkers in ocular matrices: challenges and opportunities. *Pharmaceutical research*, 36(3), 1-35

<sup>25</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Vandenbroucke, R. E., Vanhaecke, F. (2020). High-precision isotopic analysis of Mg and Ca in biological samples using multi-collector ICP-mass spectrometry after their sequential chromatographic isolation—application to the characterization of the body distribution of Mg and Ca isotopes in mice. *Analytica Chimica Acta*, 1130, 137-145

<sup>26</sup> Aranaz, M., Costas-Rodríguez, M., Lobo, L., García, M., González-Iglesias, H., Pereiro, R., Vanhaecke, F. (2022). Homeostatic alterations related to total antioxidant capacity, elemental concentrations and isotopic compositions in aqueous humor of glaucoma patients. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 414(1), 515-524

<sup>27</sup> Zhou, Y., Hong, F., Wang, X., Feng, J., Zhu, D., Xu, Y., Tao, Y. (2019). Abnormal levels of aqueous humor trace elements in patients with cytomegalovirus retinitis. *Eye*, 33(10), 1606-1612

<sup>28</sup> Yavuzer, K., Akinay, Y. (2021). Microstructure and chemical analysis in pseudoexfoliation syndrome. *Current Eye Research*, 46(4), 490-495

<sup>29</sup> Dolar-Szczasny, J., Święch, A., Flieger, J., Tatarczak-Michalewska, M., Niedzielski, P., Proch, J., Majerek, D., Kawka, J., Mackiewicz, J. (2019). Levels of trace elements in the aqueous humor of cataract patients measured by the inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Molecules*, 24(22), 4127

<sup>30</sup> Kim, C. J., Choi, S. K. (2007). Analysis of aqueous humor calcium and phosphate from cataract eyes with and without diabetes mellitus. *Korean Journal of Ophthalmology*, 21(2), 90-94

<sup>31</sup> Moroz, O. V., Wilson, K. S., Bronstein, I. B. (2011). The role of zinc in the S100 proteins: insights from the X-ray structures. *Amino acids*, 41(4), 761-772

**CONCLUSIONES**  
**CONCLUSIONS**

## Conclusiones

El trabajo llevado a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha aportado a una serie de conclusiones que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- ◇ El enfoque multiparamétrico dirigido y desarrollado para el análisis de fluido lagrimal permitió obtener información cuantitativa para trece variables, con tan disponiendo únicamente de 1-5  $\mu\text{L}$  de muestra. Concretamente se determinaron LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe y Zn, combinando técnicas analíticas de espectrofotometría y espectrometría de masas. Tras el tratamiento estadístico se puede decir que se encontraron alteraciones en los niveles de metales (Fe, Mg y Cu) y (metalo-)proteínas (MT1A, S100A6, LF) de la película lagrimal de los pacientes con DMAE en comparación con controles sanos. Estos resultados sugieren por tanto una homeostasis de estas especies comprometida que quizás podrían ser explotados como candidatos biomarcadores tempranos de esta patología.
  
- ◇ Utilizando AgNCs como marcas se ha desarrollado un fluoroinmunoensayo para la cuantificación de la proteína CFH en suero humano. A tal fin en primer lugar se optimizó la síntesis de los AgNCs, prestando atención a parámetros como rendimiento de síntesis, dispersidad, átomos de plata por NC y concentración de AgNC en medios acuosos. Tras la síntesis, los AgNCs fueron bioconjugados al anticuerpo anti-CFH mediante el método de la carbodiimida, conservando sus propiedades fluorescentes.

En términos de sensibilidad, a partir del inmunoensayo desarrollado se obtuvo un buen límite de detección ( $0,4 \text{ ng mL}^{-1}$ ), ofreciendo así la posibilidad de emplear esta inmunosonda para futuros estudios que requieran otro tipo de fluidos biológicos distintos al suero, incluyendo aquellos que presentan una mayor limitación en el volumen de muestreo.

- ◇ Debido a la posibilidad de emplear los AgNCs como marcas bimodales debido a sus capacidades de emisión fluorescente y a la alta amplificación proporcionada

estos (se estima un promedio 753 átomos de plata por NC), se han empleado con éxito en el análisis de dos proteínas, SOD1 y MT1/2, en tejido ocular mediante microscopía confocal y detección LA-ICP-MS. Asimismo, se ha conseguido sintetizar AgNCs enriquecidos isotópicamente en uno de los isótopos de Ag ( $^{109}\text{Ag}$ ), presentando propiedades luminiscentes similares a aquellos de abundancia natural. Además, en términos de detección por MS elemental, el uso de ambos tipos de NCs,  $^{\text{nat}}\text{AgNC}$  y  $^{109}\text{AgNC}$ , permitió obtener información de las dos proteínas analizadas en lo que respecta a su distribución a lo largo de las secciones de tejido mediante LA-ICP-MS.

- ◇ Se llevado a cabo el desarrollo de un protocolo de purificación de Ca rápido y con la posibilidad de ser aplicado a pequeños volúmenes de muestra, reduciendo considerablemente además el volumen de eluyente utilizado. Adicionalmente, otros aspectos que se han conseguido mejorar respecto a la bibliografía, ha sido la reducción en la cantidad de resina necesaria para llevar a cabo la extracción de Ca. De este modo, se ha conseguido obtener fracciones de Ca libres de otros elementos que generalmente se encuentran presentes en muestras biológicas (Na, Mg, P, K, Fe, Cu y Zn), con recuperaciones de Ca cuantitativas. El protocolo diseñado se aplicó a muestras reales de humor acuoso de individuos control y con glaucoma para posterior análisis isotópico de Ca mediante MC-ICP-MS. Si bien las concentraciones encontradas en ambas cohortes fueron comparables, el grupo DMAE mostró una mayor variabilidad, con tendencia a valores negativos en su composición isotópica de Ca ( $\delta^{44/42}\text{Ca}$ ) lo que podría estar relacionado con alteraciones de proteínas ligadas a Ca.

## Conclusions

The work carried out during the development of this Doctoral Thesis has contributed to several conclusions that can be summarized in the following points:

- ◇ The direct multiparametric approach developed for the analysis of tear film, allowed to obtain quantitative information for thirteen variables despite the very limited volumen available for analysis (1-5  $\mu\text{L}$ ). Particularly, determination of LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe and Zn combining analytical techniques of spectrophotometry and mass spectrometry. Results obtained after statistical analysis showed altered levels of metals (Fe, Cu and Mg) and (metallo-)proteins (MT1A, S100A6, LF) in the tear film of AMD patients as compared to control population, suggesting a compromised metal homeostasis that could be exploited as candidate biomarkers of this ocular disorder.
  
- ◇ AgNCs have been used as fluorescent labels in a fluoroimmunoassay for the quantification of CFH protein in human serum. First, optimization of the AgNCs was performed attending to different parameters: yield, dispersity, silver atoms per NC and concentration of AgNC in aqueous media. Subsequently, AgNCs were successfully bioconjugated to the anti-CFH antibody following the carbodiimide method, preserving their fluorescent properties.

In terms of sensitivity, a good detection limit ( $0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ ) was obtained for the developed immunoassay, thus offering the possibility of using this immunoassay for future studies carried using other types of biological fluids including those with limited availability as compared to serum.

- ◇ Due to the possibility of using AgNCs as bimodal labels thanks to their fluorescent emission capabilities and high amplification properties (an average of 753 silver atoms per NC is estimated), AgNCs were used in the analysis of two proteins, SOD1 and MT1/ 2, in ocular tissue by confocal microscopy and LA-ICP-MS

detection. Here, AgNCs isotopically enriched in one of the isotopes of Ag ( $^{109}\text{Ag}$ ) presenting similar luminescent properties r to those of natural abundance were synthesized. In terms of detection by elemental MS, the use of both types of NCs,  $^{\text{nat}}\text{AgNC}$  and  $^{109}\text{AgNC}$ , has allowed obtaining information on the two target proteins regarding their distribution throughout the tissue sections by LA-ICP-MS.

- ◇ The development of a fast and miniaturized Ca purification protocol intended for low sample volumes of sample was carried. Respect to literature available, reduced eluent volumes and amount of resin used is proposed. In this way, it has been possible to obtain Ca fractions free of other elements that are generally are present in biological samples (Na, Mg, P, K, Fe, Cu and Zn), together with quantitative recoveries of the analyte. The isolation procedure has been then applied to aqueous humor of glaucoma and control individuals for subsequent Ca isotopic analysis via MC-ICP-MS. Similar Ca levels were obtained for both cohorts, however, a wider variation in the Ca isotopic composition, expressed in  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  was obtained in the glaucoma group, including a trend to lower  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values. Such variations compared to the control group could be related to alterations related to Ca-dependent proteins.

# **TRABAJOS FUTUROS**

De las diferentes conclusiones obtenidas a lo largo de la presente Tesis Doctoral, a continuación, se exponen una serie de posibles trabajos futuros a desarrollar para continuar con esta línea de investigación:

- ◇ Sería interesante llevar a cabo estudios adicionales para el desarrollo de nuevos NCs enriquecidos isotópicamente de otros metales que contengan varios isótopos estables como el platino (isótopos 190, 192, 194, 195, 196 y 198). De este modo, la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral permitiría el análisis multiplexado de varias proteínas (mediante la medida de diferentes PtNCs enriquecidos isotópicamente) en las mismas secciones de tejido mediante LA-ICP-MS combinado con la herramienta matemática de IPD. En ese caso, sería más conveniente el uso de analizadores de masas que permitan la adquisición simultánea de diferentes isótopos (por ejemplo, ICP-tiempo de vuelo MS).
- ◇ Adicionalmente, se podrían emplear distintos tipos de NCs metálicos (AgNCs, AuNCs, PtNCs) para la detección de varias proteínas en una misma región de tejidos oculares o extender el uso de los AgNCs a otro tipo de muestras biológicas, como cultivos celulares.
- ◇ El protocolo optimizado para la purificación de Ca podría aplicarse a otro tipo de muestras biológicas de las que se disponga de pequeños volúmenes, como cultivos celulares. Además, el protocolo evaluado para la separación de Mg y Ca desarrollado en el cuarto capítulo permitiría, en muestras con niveles de Zn despreciables o mínimos, el análisis isotópico de ambos elementos. De este modo, se podría obtener información valiosa del comportamiento de ambos elementos en determinadas condiciones como, por ejemplo, la posible variabilidad en las relaciones isotópicas de Mg y Ca en condiciones de estrés oxidativo

# **RESUMEN DE PUBLICACIONES**

## 1. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Los estudios desarrollados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Valencia, E., García, M., Fernández-Vega, B., Pereiro, R., Lobo, L., González-Iglesias, H. (2022). **“Targeted Analysis of Tears Revealed Specific Altered Metal Homeostasis in Age-Related Macular Degeneration”**, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(4):10. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.63.4.10>.
- 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”**, *Microchimica Acta* 186, 429.
- Valencia, E., Fernández, B., Cruz-Alonso, M., García, M., González-Iglesias, H., Fernández-Abedul, M. T., Pereiro, R. (2020). **“Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters”** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35(9), 1868-1879.
- Valencia, E., López, A., Lobo, L., González-Iglesias, H., Pereiro, R. (2021). **“Exploring the possibilities of calcium isotopic analysis in aqueous humor using a fast and miniaturized calcium isolation procedure”**, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(12), 2573-2578.

## **Targeted Analysis of Tears Revealed Specific Altered Metal Homeostasis in Age-Related Macular Degeneration**

Eva Valencia, Montserrat García, Beatriz Fernández-Vega, Rosario Pereiro, Lara Lobo, Héctor González-Iglesias

Investigative. *Ophthalmology & Visual Science*, 63(4):10. doi:  
<https://doi.org/10.1167/iovs.63.4.10>.

## Targeted Analysis of Tears Revealed Specific Altered Metal Homeostasis in Age-Related Macular Degeneration

Eva Valencia,<sup>1,2</sup> Montserrat García,<sup>1,3</sup> Beatriz Fernández-Vega,<sup>1,3</sup> Rosario Pereiro,<sup>1,2</sup> Lara Lobo,<sup>2</sup> and Héctor González-Iglesias<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Ophthalmological Research Foundation, University Institute Fernández-Vega, University of Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>2</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>3</sup>Ophthalmological Institute Fernández-Vega, Oviedo, Spain

Correspondence: Lara Lobo, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain; lolobara@uniovi.es.

Héctor González-Iglesias, Ophthalmological Institute Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain; h.gonzalez@fio.as.

Current affiliation: \*Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, (IPLA-CSIC) Villaviciosa, Spain.

Received: November 11, 2021

Accepted: March 29, 2022

Published: April 15, 2022

Citation: Valencia E, García M, Fernández-Vega B, Pereiro R, Lobo L, González-Iglesias H. Targeted analysis of tears revealed specific altered metal homeostasis in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022;63(4):10.

<https://doi.org/10.1167/iovs.63.4.10>

**PURPOSE.** Specific altered metal homeostasis has been investigated in the tear film of age-related macular degeneration (AMD) patients considering that metal dyshomeostasis contributes to the production of free radicals, inflammation, and apoptosis and results in conformational changes of proteins.

**METHODS.** A multitargeted approach based on spectrophotometry and mass spectrometry techniques has been implemented to the multiplexed quantitation of lactoferrin (LF), S100 calcium binding protein A6 (S100A6), metallothionein 1A (MT1A), complement factor H (CFH), clusterin (CLU), amyloid precursor protein (APP), Mg, P, Na, Fe, Cu, Zn, and Ca, in the tear film from 60 subjects, 31 patients diagnosed with the dry form of AMD, and 29 healthy individuals

**RESULTS.** Significant up-regulations of MT1A (1.9-fold) and S100A6 (1.4-fold) and down-regulations of LF (0.7-fold), Fe (0.6-fold), Mg (0.7-fold), and Cu (0.7-fold) were observed in AMD patients, when compared to control subjects. Of all the studied variables, only APP showed negative correlation with age in the AMD group. Also, positive correlations were observed for the variables Mg and Na, Cu and Mg, and P and Mg in both the AMD and control groups, whereas positive correlations were exclusively determined in the AMD group for Cu and LF, Na and Ca, and Mg and Ca. The panel constituted of MT1A, Na, and Mg predicts AMD disease in 73% of cases.

**CONCLUSIONS.** The different levels of target metals and (metallo-)proteins in the tear film suggest altered metal homeostasis in AMD patients. These observed pathophysiological changes may be related with the anomalous protein aggregation in the macula.

**Keywords:** age-related macular degeneration, tear, targeted analysis, (metallo-)proteins, metals, dyshomeostasis

Ageing is an irreversible process inevitably associated with disease, being the predominant risk factor for most conditions that limit health span. According to data from the World Population Prospects 2019,<sup>1</sup> one in eleven people in the world was over the age of 65 in 2019 (9%), which is expected to increase to one in six people by 2050 (16%). The greater ageing of the population turns some diseases from occasional to very frequent, with particular impact in neurodegenerative pathologies. Age-related neurodegenerative diseases are a group of disorders sharing common features and molecular patterns characterized by abnormal accumulation of proteins and selective neuronal degeneration and death.<sup>2</sup> Insoluble oligomerized protein deposition has been identified within the eye during the onset of age-related macular degeneration (AMD). Actually, AMD is the leading cause of noninherited irreversible vision loss in developed countries and a very prevalent cause of legal blindness in the elderly.<sup>3</sup> Early AMD initiates with the formation of extracellular deposits, called *drusen*, between the

basal lamina of the retinal pigment epithelium (RPE) and the Bruch's membrane, which progressive degeneration leads to the advanced stages of the disease, the neovascular (or wet) or geographic atrophy (or dry) forms of AMD.<sup>4</sup> Current therapies exist for neovascular AMD, representing 10% to 15% of cases, but there is no approved treatment for dry AMD, accounting for 85% of cases of advanced disease.<sup>5,6</sup>

Drusen composition is highly complex, containing lipids, minerals, and proteins abnormally aggregated,<sup>7-11</sup> the formation molecular mechanisms of which include protein misfolding induced by metals.<sup>12,13</sup> The impairment of intracellular homeostatic control of metals underlies their cytotoxic effects, in the oligomerization of proteins and in the aggregation and consequent loss of functionality of molecules. Also, metal dyshomeostasis contributes to the production of free radicals, inflammation, and apoptosis and results in conformational changes of proteins involved in neurodegeneration.<sup>14-16</sup> Among others, dyshomeostasis of Zn, Fe, Cu, or Ca induces various detrimental intracellu-

Copyright 2022 The Authors  
iovs.arvojournals.org | ISSN: 1552-5783

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



1

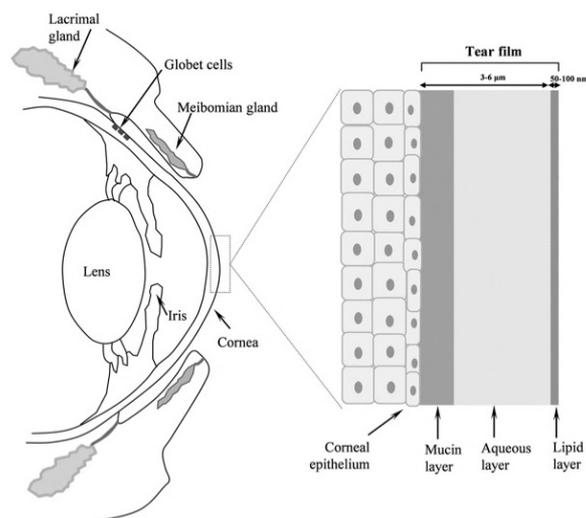


FIGURE 1. Diagram summarizing the lacrimal apparatus and the tear film structure.

lar events, including oxidative stress, DNA fragmentation, protein misfolding, and activation of apoptosis, which leads to neuronal death.<sup>17,18</sup> Therefore specifically altered metal homeostasis may occur in AMD disease, at both the local and systemic levels. Considering that is required a major understanding of the effects of metals changes during neurodegenerative processes, the application of innovative analytical and biochemical approaches, including (metallo-)proteomic analysis, may contribute to shed light on metal-protein interactions and their pathogenic effects in AMD.

Although neurodegeneration during AMD occurs in the RPE and neurosensory retina, possible changes could be observed in the anterior segment of the eye globe, specifically in readily accessible fluids with noninvasive sampling such as tear film.<sup>19</sup> The tear film, produced by Meibomian, lacrimal, and accessory glands, along with goblet cells,<sup>20</sup> is composed of three layers: the inner hydrophilic mucin layer, the middle aqueous layer, and the outer lipid layer (see Fig. 1).<sup>21</sup> This thin fluid layer (up to 6  $\mu\text{m}$  thickness) is very promising for the discovery and implementation of biomarkers or to study local alterations related to eye diseases, because it contains a comparatively simple proteome composed of a variety of molecules and removes local waste products, drugs, and disease-related media.<sup>22</sup> Tear fluid permits a noninvasive procedure for sampling by Schirmer test papers or glass microcapillaries, requiring no incision into the body or tissue removal.<sup>23</sup> However, the conjunctival sac has a capacity of approximately 15 to 30  $\mu\text{L}$ , and the natural tear film volume is 7 to 8  $\mu\text{L}$ , severely limiting the multitargeted analysis. This is most dramatic when studying the elderly population, because tear production or secretion starts to be impaired.<sup>20,24</sup> So far, limited studies have been carried out for the discovery of specific changes in the tear film associated with AMD neurodegenerative progression.<sup>25,26</sup> Nevertheless, a major constraint remains in the lack of powerful methodologies for a multidisciplinary

approach, because conventional biological/biomedical techniques only address a specific part of the problem, and tear film represents a great challenge. Therefore methods for the quantitative multiparametric analysis of molecules and metals in tear film are currently mandatory. In this work, we have implemented a multitargeted approach based on spectrophotometry and mass spectrometry techniques to decipher possible existing changes in the homeostasis of metals, metalloproteins, and protein-related metals in AMD patients. To this end, quantitative analysis of lactoferrin (LF), S100 calcium-binding protein A6 (S100A6), metallothionein 1A (MT1A), complement factor H (CFH), clusterin (CLU), amyloid precursor protein (APP), Mg, P, Na, Fe, Cu, Zn, and Ca have been carried out in low volume of tears from control subjects and patients diagnosed with the dry form of AMD.

## METHODS

### Study Subjects

The present observational, prospective and case-controlled study involved 60 subjects: 31 patients diagnosed with the dry form of AMD and 29 healthy individuals (controls). The study adheres to the tenets of the Declaration of Helsinki on Biomedical Research Involving Human Subjects and was approved by the Clinical Research Ethics Committee at Principality of Asturias (Oviedo, Spain). Study subjects were recruited at the Institute of Ophthalmology Fernández-Vega (Oviedo, Spain) based on the agreed inclusion and exclusion criteria, signed informed consent, and the research was conducted by medically qualified personnel. Complete ophthalmic examinations were performed for patients and controls, including slit-lamp biomicroscopy and funduscopy in both eyes. AMD-diagnosed patients were further examined by fluorescence fundus angiography or optical coherence tomography. Only individuals with dry AMD and

evidence of an active form of geographic atrophy in at least one eye and absence of choroidal neovascularization were included. Control subjects were selected from patients over 60 years old and with absence of AMD or glaucoma. Specifically, controls did not show any sign of drusen, including reticular pseudodrusen, or pigment abnormalities in none of the eyes, being in stage 1 of the Clinical Age-Related Maculopathy Staging classification (i.e., no drusen).<sup>27</sup> The exclusion criteria for both controls and AMD patients was the absence of other relevant ocular pathologies, such as diabetic retinopathy or any ocular surface disease including dry eye syndrome, eye surface disorders, glaucoma, and previous ocular surgery except for cataract extraction. Those patients or healthy subjects using topical medications or contact lens were also discarded to avoid influences in the tear film composition.

#### Sample Collection and Preparation

Tear film was collected from each eye, when possible, using calibrated glass microcapillary tubes with 10  $\mu\text{L}$  of capacity (Blaubrand intraMark, Wertheim, Germany). Sample collection was performed in the morning hours, between 9 AM and 12 PM, using sterile gloves. The microcapillaries were placed into the lower conjunctival sacs of each eye avoiding any contact with the ocular surface to minimize its irritation, obtaining the tear samples from the inferior tear meniscus without anesthesia. Once collected, tear samples from each individual eye were immediately placed in Eppendorf tubes using a plastic syringe and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. The typically collected tear volume reached 1 to 5  $\mu\text{L}$ .

#### Molecular Assays

Quantitation of six proteins of interest was performed using commercial ELISAs following the instructions of the manufacturer. Commercially available sandwich-type ELISA kits from Abcam (Cambridge, UK) were used for the quantification of four of the candidate proteins, the human LF (ab200015), the human CFH (ab252359), the human CLU (ab174447), and the human APP (ab216944). Commercial ELISA kits purchased from Abynetek Biopharma (Vizcaya, Spain) and LS BIO (Seattle, WA, USA) were used for the analysis of human S100A6 (ABK1-E1028) and MT1A (LS-F10296), respectively. For APP, CFH, and S100A6 quantitation the tear samples were diluted 1:200, for MT1A quantitation the tear samples were diluted 1:1,000, for CLU quantitation the tear samples were diluted 1:6,000 and for the LF quantitation tear samples were diluted 1:1,000,000. The concentrations of targeted proteins were expressed in nanograms of the protein per milliliter of tear for APP, CFH, S100A6, MT1 and CLU, and in milligrams of the protein per milliliter of tear for LF. Representative analytical parameters for each of ELISA assays have been included in Supplementary Table S1.

Total protein concentration in tears was determined using the commercial QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma Aldrich, Madrid, Spain). The calibration range was 0 to 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  with BSA as standard. The tear samples were diluted 1:2500. A working solution containing copper compound and bicinchoninic acid was added to the samples. The proteins present in tears, reduced  $\text{Cu}^{2+}$  to  $\text{Cu}^{+}$  and a complex between copper and bicinchoninic acid was formed, the absorbance of which was measured at 562 nm wavelength. All absorbance measurements were monitored using

the spectrophotometer PerkinElmer 2030 Multilabel Reader VICTORTM X5 (Waltham, MA, USA).

#### Multielemental Quantitation Using Flow Injection Analysis (FIA) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Detection

Multi-elemental analysis of Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe and Cu was performed by external calibration using a 7900 ICP-MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with collision/reaction cell pressurized with He gas ( $4.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  flow rate) to minimize polyatomic interferences. As internal standard, Ga was used for matrix effect correction. The FIA system, consisting of a six-channel Rheodyne valve 3125 (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA), with a 5  $\mu\text{L}$  loop, was on line coupled to the ICP-MS. A glass syringe of 100  $\mu\text{L}$  volume (Hamilton, Reno, NV, USA) was used to load samples and standards through the system.

The standard stock solution of Mg, P, Fe, Cu, Zn ( $1,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), Na, Ca ( $10,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and Ga ( $1,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and used for the external calibration curve. The concentration range for calibration was 0 to 200  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for Mg and P, 0 to 500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for Na, Zn, and Fe, 0 to 60  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  for Cu, and 0 to 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  for Ca. Each calibration standard was injected five times. To determine the multielemental concentration in tear film, samples were diluted with 0.14 M  $\text{HNO}_3$  (trace metal grade; Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a 1:20 dilution for most of the elements, with the exception of Na requiring a higher dilution of 1:2000. Thus only 1  $\mu\text{L}$  of tear film from each subject was used to determine their multielemental composition.

#### Statistical Analysis

Demographic characteristics of AMD patients and control subjects were performed with SPSS Statistics version 15.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). In the case of quantitative variables (age), significant differences were analyzed using the Mann-Whitney U test, and qualitative variables (gender and the presence of cataracts, arterial hypertension or cardiovascular disease) were analyzed using the  $\chi^2$  test. Comprehensive studies of all obtained data from both elemental and molecular analysis, reported as mean  $\pm$  standard error of the mean, was carried out using SPSS Statistics version 15.0 and GraphPad Prism version 3 for Windows (San Diego, CA, USA). Normal distribution was evaluated by the Shapiro-Wilk's test, and, subsequently, significant differences between control and AMD groups for proteins and elements were analyzed using the Mann-Whitney U test for those without normal tendency, or Student's *t* test was selected for normal distribution. Correlation analysis was carried out using SPSS Statistics version 15.0. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant. Further stepwise discrimination analysis was carried out with SPSS using the concentrations of the proteins and elements determined by ELISA and FIA-ICP-MS, respectively, in the different sample groups. Additionally, logistic regression analysis using SPSS software was performed for further control of potential confounders using SPSS.

Several statistical tools based on Machine Learning approaches were applied using Orange Canvas software v2.6 (<http://orange.biolab.si>) to assess which method provided the best accuracy for the correct classification of samples

based on the selected panel of proteins or elements. These tools included receiver operating characteristic curve analyses for each of the markers, naive Bayes, k-nearest neighbor, random forest, classification trees, and support vector machine.<sup>26</sup>

## RESULTS

### Patients

Demographic characteristics of AMD patients and control subjects are collected in Table 1. The population origin recruited in the present study was Caucasian and mostly from the northernmost regions of Spain. No statistically significant differences were obtained for age, gender, the presence of cataracts, arterial hypertension, or cardiovascular disease, when compared dry AMD cases with controls ( $P > 0.05$ ). Statistically significant differences were observed for dyslipidemia in AMD patients when compared to control subjects ( $P = 0.002$ ). The dry AMD group consisted of 31 individuals, comprising 18 women and 13 men, with a mean age of  $80.7 \pm 8.0$  years, whereas the control group included 29 subjects, formed by 18 females and 11 males, with a mean age of  $77.2 \pm 8.9$  years. In both groups, the percentage of cataractous subjects was similar, specifically 75.9% for controls and 77.4% for AMD patients. The significantly higher percentage of individuals with dyslipidemia in the AMD group (45.2%), compared to controls (6.9%), indicates a possible causal role of plasma lipid levels in the pathogenesis of AMD.<sup>29,30</sup> Systemic treatments were assessed, including the common oral treatments for both control and AMD subjects (Supplementary Table S2).

### Targeted Molecular Analysis of Tear Film

Total concentrations of LF, S100A6, CFH, CLU, APP and MT1A were individually quantified in 29 control subjects and

31 dry AMD patients, using ELISA assays (Table 2), dot plots of which are shown in Figure 2. Tear samples from both eyes of same individual were pooled, when possible. Because of the low available sample volume, molecular composition was determined in most, but not all, study subjects. Of all the analyzed proteins, only LF, S100A6, and CLU have been previously quantified in tears.<sup>31-34</sup> In our experiments, statistical significant differences were observed for the proteins LF (0.7-fold change,  $P = 0.004$ ), S100A6 (1.4-fold change,  $P = 0.03$ ) and MT1A (1.9-fold change,  $P = 0.006$ ), when comparing AMD patients and control subjects (see Figs. 2A, 2B, 2F). By contrast, no significant differences were observed for CFH, CLU, and APP (Figs. 2C-E;  $P > 0.05$ ). Correlations between the proteins analyzed and the age of the recruited individuals were evaluated using Pearson coefficient, showing only significant negative correlation for APP exclusively in the AMD group (Fig. 2G;  $r = -0.523$ ,  $P = 0.005$ ). Averaged total protein concentration in tears for control individuals reached  $8.87 \pm 4.84 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , whereas for AMD patients it was  $9.26 \pm 5.28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , with no statistically significant differences observed between groups, being in the range of reference published.<sup>35</sup>

### Targeted Multielemental Analysis of Tear Film

Quantitative multiparametric elemental analysis of Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe and Zn was carried out in individual human tears by FIA-ICP-MS (Table 2). Dot plots depicting changes in the concentrations of each element, when comparing AMD and control groups are shown in Figure 3, in which normal distribution and unpaired *t* test was selected to examine possible variations between cohorts. Significant down-regulation was observed for Mg (0.7-fold change,  $P = 0.01$ ,  $9.74 \pm 3.68 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  control group vs.  $6.50 \pm 3.27 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  AMD group), Fe (0.6-fold change,  $P = 0.03$ ,  $3.53 \pm 2.01 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  control group vs.  $2.13 \pm 1.37 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  AMD group) and Cu (0.7-

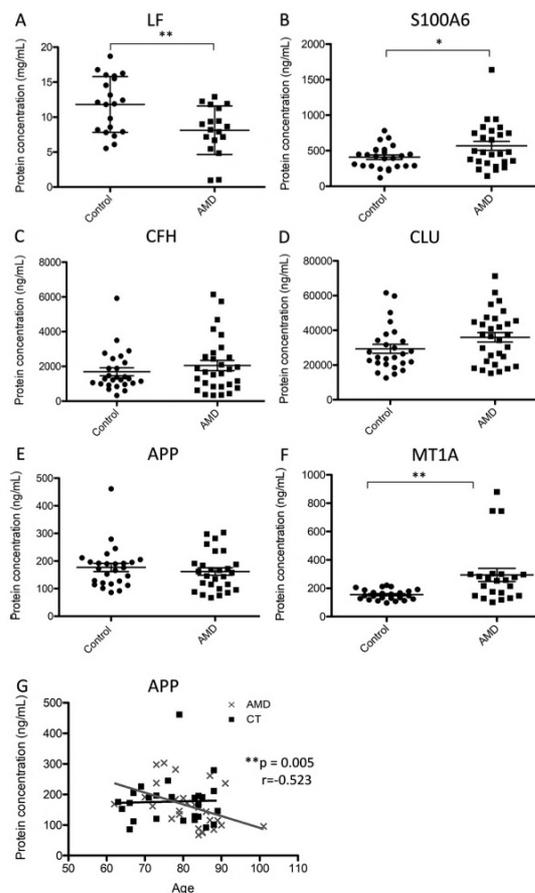
TABLE 1. Demographic Characteristics of AMD Patients and Controls

Study Population (n)	Age (Mean $\pm$ SD)	Age Range	Gender (Female/Male)	Cataracts	AHT	Dyslipidemia	Cardiovascular Disease
Controls (n = 29)	77.2 $\pm$ 8.9	63-89	18 (62.1%)/11	22 (75.9%)	13 (44.8%)	2 (6.9%)	2 (6.9%)
AMD (n = 31)	80.7 $\pm$ 8.0	62-101	18 (58.1%)/13	24 (77.4%)	14 (45.1%)	14 (45.2%)	3 (9.7%)

n, number of subjects; SD, standard deviation; AHT, arterial hypertension.

TABLE 2. Concentrations of Proteins and Elements Determined in the Tear Film of AMD Patients and Control Subjects

	Control	AMD	Fold-change	P Value
Protein concentrations				
Lactoferrin (average $\pm$ SD, mg/mL)	11.81 $\pm$ 3.98	8.11 $\pm$ 3.47	0.7	0.004
S100A6 (average $\pm$ SD, ng/mL)	409.8 $\pm$ 158.9	568.59 $\pm$ 321.9	1.4	0.03
CFH (average $\pm$ SD, ng/mL)	1692 $\pm$ 1167	2051 $\pm$ 1573	1.2	0.3
Clusterin (average $\pm$ SD, mg/mL $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	29.33 $\pm$ 13.01	35.99 $\pm$ 14.94	1.2	0.09
APP (average $\pm$ SD, ng/mL)	176.71 $\pm$ 76.04	161.88 $\pm$ 69.86	0.9	0.3
MT1A (average $\pm$ SD, ng/mL)	154.45 $\pm$ 36.56	293.55 $\pm$ 214.00	1.9	0.006
Element concentrations				
Na (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	2125 $\pm$ 524	1783 $\pm$ 678	0.8	0.09
Mg (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	9.74 $\pm$ 3.68	6.50 $\pm$ 3.27	0.7	0.01
P (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	3.95 $\pm$ 2.25	2.94 $\pm$ 2.14	0.7	0.2
Ca (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	23.98 $\pm$ 9.15	22.46 $\pm$ 12.91	0.9	0.7
Fe (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	3.53 $\pm$ 2.01	2.13 $\pm$ 1.37	0.6	0.03
Cu (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.17 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.04	0.7	0.009
Zn (average $\pm$ SD, $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.36 $\pm$ 0.26	0.27 $\pm$ 0.21	0.7	0.3



**FIGURE 2.** Dot plots of (A) LF, (B) S100A6, (C) CFH, (D) CLU, (E) APP, and (F) MT1A protein concentrations determined in the tear film of dry AMD patients and control subjects. (G) Correlation between APP concentrations of AMD patients and control individuals and aging.  $r$  value, Pearson correlation coefficient. \* $P$  value < 0.05; \*\* $P$  value < 0.01; \*\*\* $P$  value < 0.001.

fold change,  $P = 0.009$ ,  $0.17 \pm 0.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  control group vs.  $0.11 \pm 0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  AMD group), when comparing AMD patients and control subjects (see Figs. 3B, 3F, and 3G). Correlations between all the elements analyzed and the age of the recruited individuals were also evaluated using Pearson coefficient, showing no statistically significant correlation for none of the variables.

#### Study of Variable Associations

A correlation study among elements and proteins was carried out in AMD patients and control subjects using the Pearson coefficient, shown in Figure 4 the obtained signifi-

cant associations. Higher negative or positive  $r$  values indicate the grade of correlation between variables. Positive correlations were observed for both AMD and control groups when association of the variables Mg and Na ( $r = 0.716$ ,  $P = 0.003$  in the AMD group;  $r = 0.711$ ,  $P = 0.0002$  in the control group), Cu and Mg ( $r = 0.556$ ,  $P = 0.038$  in the AMD group;  $r = 0.706$ ,  $P = 0.0003$  in the control group), and P and Mg ( $r = 0.705$ ,  $P = 0.007$  in the AMD group;  $r = 0.756$ ,  $P = 0.00007$  in the control group) were studied (see Figs. 4A–C). Highly significant positive correlations were observed for the AMD group when association of the variables Cu and LF ( $r = 0.839$ ,  $P = 0.002$ ), Na and Ca ( $r = 0.710$ ,  $P = 0.006$ ), and Mg and Ca ( $r = 0.835$ ,  $P = 0.0003$ ) were evaluated (Figs. 4D–F).

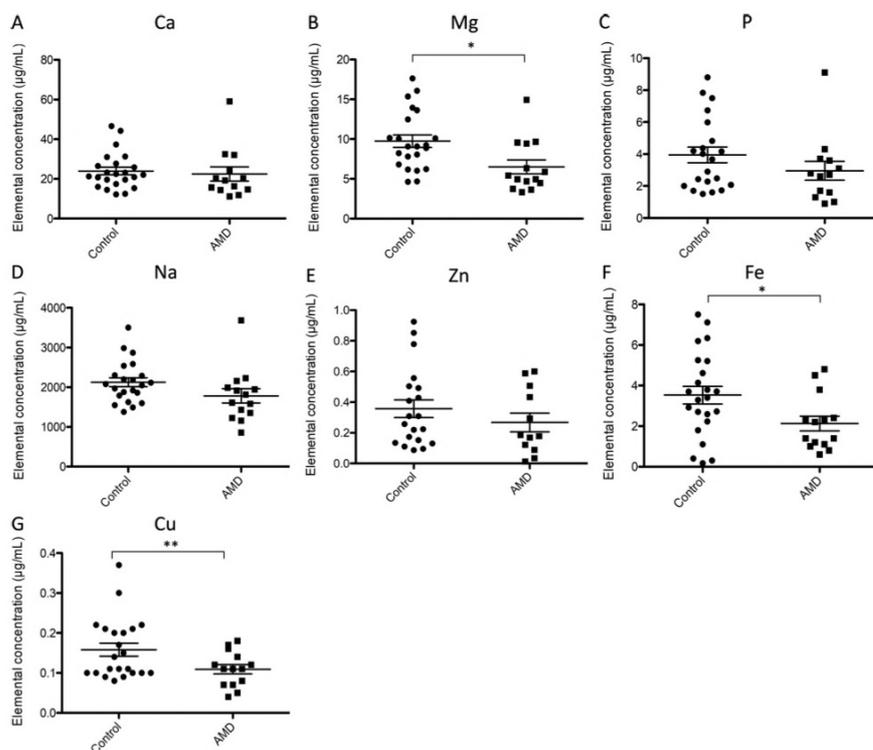


FIGURE 3. Dot plots of (A) Ca, (B) Mg, (C) P, (D) Na, (E) Zn, (F) Fe, and (G) Cu elemental concentrations determined in the tear film of dry AMD patients and control subjects. \* $P$  value < 0.05; \*\* $P$  value < 0.01; \*\*\* $P$  value < 0.001.

#### Data Filtering and Logistic Regression

The observed significant differences between AMD and control groups including individuals with dyslipidemia were further explored in a two-step comprehensive statistical analysis to evaluate the influence of this systemic risk factor in the multitargeted results obtained. First, the dyslipidemic patients were excluded and filtered data and parameters were re-analyzed. Total concentrations of LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A, Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe and Zn obtained for control subjects ( $n = 27$ ) and AMD patients ( $n = 17$ ), all of them without dyslipidemia, are shown in Supplementary Table S3. Overall, comparable results to those considering all subjects (Table 2) were obtained, with the exception of Mg. When considering all patients, MT1A, S100A6, LF, Fe, and Cu showed similar fold change (1.9-, 1.4-, 0.7-, 0.6-, 0.7-fold, respectively) to when dyslipidemic subjects were excluded (2.1-, 1.4-, 0.5-, 0.5-, 0.6-fold, respectively), with even smaller  $P$  values in the latter case (see Supplementary Table S3). Only Mg lost the significant differences when dyslipidemic subjects were excluded (0.7-fold,  $P = 0.07$ ), as compared

with unfiltered data (0.7-fold,  $P = 0.01$ ), although the fold-change was the same. This difference in Mg may be related to the lower number on individuals resulted after filtering subjects with of dyslipidemia as a risk factor.

Second, a multivariate logistic regression was carried out in all recruited subjects (31 AMD patients and 29 control subjects), using SPSS with the unfiltered data, to evaluate the role of several confounders, including dyslipidemia, in the differences observed between the AMD group in comparison to control subjects. This analysis confirmed that the risk factor dyslipidemia ( $P = 0.989$ ) did not contribute to the statistically significant differences observed between groups, discarding possible confounders among the demographic conditions and the studied proteins and elements, and therefore the altered levels of MT1A, S100A6, LF, Fe, and Cu in the tear film between both cohorts are result of AMD disease.

#### Machine Learning Models

The concentrations determined for the six proteins and the seven elements in tear samples from AMD patients and

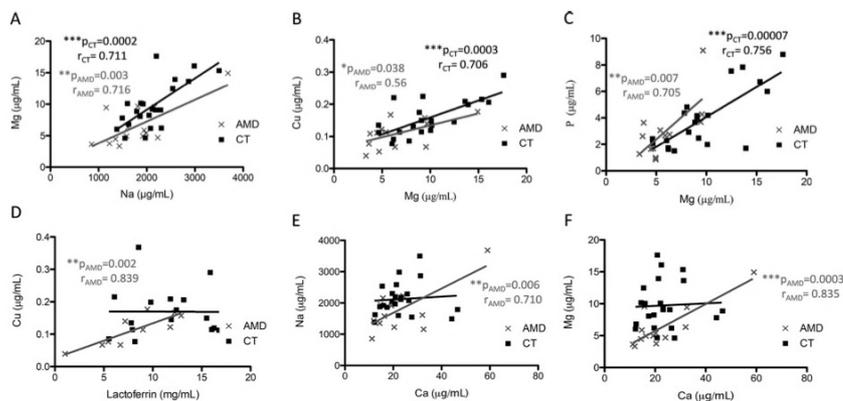


FIGURE 4. Correlation analysis between (A) Na and Mg, (B) Mg and Cu, (C) Mg and P, (D) LF and Cu, (E) Ca and Na, and (F) Ca and Mg, respectively.  $r$  value, Pearson correlation coefficient. \* $P$  value < 0.05; \*\* $P$  value < 0.01; \*\*\* $P$  value < 0.001.

TABLE 3. Best Classifying Machine-Learning Models Using the Variables MT1A, Na, and Mg, When Comparing AMD Patients and Control Subjects

Method	CA	AUC	Sensitivity	Specificity	Precision
Random forest	0.63	0.73	0.82	0.41	0.61
Naive Bayes	0.73	0.86	0.58	0.90	0.87
k-Nearest	0.54	0.59	0.39	0.71	0.60
Neighbors					
Classification tree	0.68	0.70	0.69	0.67	0.70
Support vector machine	0.64	0.71	0.77	0.50	0.73

AUC, area under the curve; CA, correct assignment.

control subjects were used to perform a stepwise discriminant analysis by SPSS to determine the best variables classifying both groups. The panel consisting of MT1A, Na, and Mg correctly assigns the 89% of the samples group and consequently was used to generate multivariate predictive models. The whole data set (test on train data) was used for training and then for testing with distinct machine learning algorithms, including random forest, naive Bayes, k-nearest neighbor, classification tree, and support vector machine. Later, the classification method was validated using the remaining 30% of data to make predictions on future cases for which the target answer is unknown, providing the correct assignment (CA), sensitivity, specificity, area under the curve, and precision of the model (see Table 3). The best classification efficiency was obtained when using the MT1A, Na, and Mg panel and training the data with classification tree and naive Bayes, providing values of correct assignment of 68% and 73%, respectively, when comparing AMD and control groups, the percentage of which represents the correctly classified predictions. The obtained area under the curve reached 0.70 to 0.86 when using classification tree and naive Bayes, respectively.

## DISCUSSION

This study revealed evidences of a specific altered metal homeostasis in the course of AMD disease, including up-regulation of MT1A and S100A6, and down-regulation of LF, Fe, Mg, and Cu in the tear film of individuals with macular disorder. AMD is characterized by a progressive loss of central vision caused by age-related neurodegenerative changes in the highly specialized region of the central retina responsible for fine and color vision, the macula. During aging, the systemic metabolism of metals, including Fe, Cu, Zn, and Ca, changes, and their homeostatic deregulation may play an important role in the progressive neurodegeneration. Proteins/peptides identified in extracellular deposits characteristic of AMD undergo pathogenic aggregation promoted by metals.<sup>36,37</sup> The anomalous protein aggregation observed in AMD may be related to the existence of metal dyshomeostasis, as a cause or consequence.<sup>26</sup> Hence, the understanding of structural and functional interactions between metals and intracellular and extracellular components becoming pathogens may shed light to the etiology of AMD disorder. Therefore the identification of potential altered levels of metals, metalloids, and proteins interacting with metals in the tear film of AMD patients may contribute to the understanding of the pathophysiological changes observed in this irreversible disorder and, at the same time, propose candidate biomarkers for an early diagnosis or better prognosis of the disease.

We consequently designed a multitargeted analysis based on immunoassays and elemental mass spectrometry for the quantitative determination of LF, S100A6, CFH, CLU, APP, Ca, Mg, P, Na, Zn, Fe and Cu in the tear film of dry AMD patients and control subjects. Tears are produced by the lacrimal apparatus to moisten the ocular surface, protecting the cornea against desiccation, facilitating non-friction-bearing movements of the lids on the globe to improve the refractive effect and preserving against irritation caused by the environment.<sup>38</sup> The lacrimal glands are classic exocrine

acinar glands secreting a dilute aqueous solution containing proteins, small molecular mass components and electrolytes, constituting the tear film. Therefore, the target-biofluid tear film is mainly composed of H<sub>2</sub>O (≈98%), with normal pH = 7.5 and Na, Cl, HCO<sub>3</sub>, K, Mg, Ca, glucose, retinol and urea as major solutes. The most abundant tear proteins include immunoglobulin A, LF, tear-specific prealbumin, G protein, and lysozyme. Also, traces of other proteins, enzymes, and inhibitors from serum origin are present. The normal tear turnover occurs at approximately 16%/min at normal blink rate but is highly dependent on temperature and humidity and can be induced by a variety of mechanical and psychophysical stimuli.<sup>39,40</sup> Accordingly, one of the main difficulties of this study deals with the limited sample volume, especially considering the age of the recruited patients. In the case of ELISA assays, tear sample dilution was carried out, permitting the multiparametric quantitation of selected molecules. Also, considering that the multielemental analysis by ICP-MS using conventional nebulization is dramatically limited by high sample volume consumption (up to 200 µL · min<sup>-1</sup>), and even the use of micronebulizers typically permit uptakes of 50 to 100 µL · min<sup>-1</sup>, we decided to optimize and implement the FIA-ICP-MS system, together allowing the quantitation of the 13 selected variables in this biofluid.

Normal composition of human tear has been widely characterized using proteomic,<sup>41–43</sup> lipidomic,<sup>44–46</sup> metabolomic,<sup>47</sup> and metallomic<sup>48</sup> approaches. Proteomic or metabolomic methodologies have been developed for the study of the lacrimal film and the identification of candidate biomarkers in patients diagnosed with glaucoma, dry eye, diabetic retinopathy, keratoconus, or cancer, among others.<sup>19,25,49</sup> However, limited studies addressing the tear film analysis of AMD patients have been published to date. Among them, Yu et al.<sup>50</sup> observed, using ELISA assays, that the tear (along with serum) of AMD patients (n = 20) had increased IgA titers than control subjects (n = 15), which may imply a role of overactive IgA responses in AMD pathogenesis. Winiarczyk et al.<sup>51</sup> attempted to define the AMD tear film proteome by MALDI-TOF/TOF using Schirmer strips for sampling in eight patients with wet AMD, six patients with dry AMD, and eight control individuals. From the identification of 342 proteins, shootin-1, histatin-3, fidgetin-like protein 1, SRC kinase signaling inhibitor, Grave's disease carrier protein, actin cytoplasmic 1, prolactin-inducible protein 1 and protein S100-A7A were found up-regulated in the tear film of dry AMD patients, involving specific pathways related to oxidative stress, inflammation, and proteolysis. Recently, the tear film of 15 patients with wet AMD and 15 age-matched healthy controls was comparatively analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF/TOF, which identified altered proteins belong to pathways involving oxidative stress, protein clearance and chronic inflammation pathways, highlighting annexins A1 and A4 are part of the calcium-dependent phospholipid-binding family that regulate inflammation and autophagy.<sup>52,53</sup> However, none of the identified altered proteins in those works coincide with those evaluated in our study showing significant variations.

The significant up-regulation of S100A6 protein observed in the tear film of our AMD group can be related to its role as Ca homeostasis regulator. The S100A6 belongs to the S100 family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins of the EF-hand type (i.e., with conserved calcium-binding motif).<sup>54</sup> In the eye, S100A6 is expressed in adult corneal endothelial cells but not in the

fetal corneal endothelial cells.<sup>55</sup> The protein levels of S100A6 were previously observed up-regulated in dry eye disease and Meibomian gland dysfunction<sup>32,56</sup> and down-regulated in the tear film of patients diagnosed with keratoconus<sup>57</sup> and were therefore proposed as candidate biomarkers of these ocular surface disorders. Interestingly, S100A6 was found to be up-regulated in experimental corneal neovascularization models<sup>58</sup> and expressed in pterygium tissue removed from patient,<sup>59,60</sup> but no studies related this protein with AMD disease to date.

For the first time, LF down-regulation was observed in AMD, when comparing patients with sex- and age-matched healthy subjects. This glycoprotein is normally presented in most mucosal secretions (i.e. nasal secretion, saliva, etc., in tears, vitreous humor, RPE, and retina).<sup>61–63</sup> LF regulates iron homeostasis<sup>64</sup> and also presents anti-inflammatory, antibacterial, reactive oxygen species modulator, antiviral, and antitumor immunity effects.<sup>65</sup> This protein has been previously proposed as a candidate biomarker of dry eye disease,<sup>66</sup> in which oral LF administration preserves lacrimal gland function in aged mice, reducing the oxidative damage and inflammation.<sup>67</sup> The administration of LF also reduces the choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model that mimics the AMD wet form through the inhibition of hypoxia-inducible factors.<sup>68</sup> Notably, LF concentration in the tear film of control individuals seems to remain invariant through age and independently of sex,<sup>62,69</sup> as the current study shows. Moreover, the lower levels of LF observed in the tear film of AMD patients may be related to lower Fe concentration and increased oxidative stress observed during the course of the disease.

The MT1A subisoform belongs to the superfamily of metallothioneins, cysteine rich and metal-binding low molecular mass proteins (<7 kDa), involved in cellular Cu and Zn homeostasis, metal detoxification, defense against oxidative damage through free radical scavenging and neuroprotection.<sup>70–72</sup> The MT1A, codified by the *MT1A* gene and expressed in all the human ocular tissues, was observed up-regulated in the tear of AMD patients, highlighting the high variability in this group in contrast to the control subjects (see Fig. 2F). Conversely, previous studies showed that levels of metallothioneins decreased with age in isolated retinal pigmented cells from postmortem donors with signs of AMD, but without determining individual subisoforms.<sup>73</sup> Remarkably, studies carried out using in vivo and in vitro models of retinal damage showed overexpression of MT1 and MT2 isoforms, suggesting that their up-regulation may be protective against acute retinal insults,<sup>74–76</sup> which may explain the higher levels of MT1A observed in the AMD patients of this work.

From the different studies published so far, age-related changes of the tear composition have been observed, including increased expression of proinflammatory cytokines and matrix remodeling factors<sup>77</sup> and higher plasma-derived albumin levels.<sup>78</sup> Considering that aging is one of the main risk factors for AMD onset, we additionally studied possible correlation between targeted proteins and age in our cohort, without observing any age-related change in the tear composition, with the exception of APP protein. A negative correlation was obtained for APP, but only in the AMD group ( $r = -0.523$ ,  $P < 0.01$ ), indicating that the levels of this protein decreased with age in AMD patients but not in healthy controls. This observation may be associated with the age-related increase of the activity of APP cleaving enzymes, which contributes to APP degradation and

the increased production and accumulation of extracellular deposits,<sup>79</sup> being markedly declined in the AMD disease group. Consequently, the follow-up of this protein in the tear film of AMD patients during development and advanced stages of the disease warrants additional research.

Current literature does not include any study tackling the multielemental analysis of tear film of AMD patients. We solely identified limited publications attempting to quantify several elements in the tear film by different sampling and analysis approaches. A seminal work quantified the levels of Zn in tears of young healthier volunteers by atomic absorption spectrometry, obtaining a mean value of  $1.537 \pm 0.146 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .<sup>80</sup> A multielemental analysis of Na, K, Mg, and Ca was carried out in the tear film of 10 healthy humans by ICP-MS or ICP atomic emission spectroscopy, with levels of  $104.5 \pm 4.27$ ,  $18.1 \pm 1.04$ ,  $0.49 \pm 0.02$ , and  $0.33 \pm 0.03 \text{ mM}$ , respectively.<sup>81</sup> The multielemental analysis of tears from 60 volunteers from different geographic origins (urban vs rural areas), by ICP-MS, provided averaged concentrations of  $18.40 \pm 16.53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  for Cu and  $29.61 \pm 31.46 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  for Zn.<sup>48</sup> Also, the possible relationship between tear Zn levels and helminths parasitic infection was evaluated in 81 individuals using a colorimetric assay, observing higher levels of this element in the infected population ( $4.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) when compared to control subjects ( $2.42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).<sup>82</sup> Finally, a multielemental analysis of Cu, Zn, Se, Rb, Ba, Pb, Mn, and Co was carried out by ICP-MS in 47 patients diagnosed with type II diabetes and 50 healthy controls, observing significant differences for Zn, Cr, Co, Mn, Ba, and Pb, with averaged concentration of Zn reaching  $66.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  in diabetic patients and  $33.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  in nondiabetic subjects.<sup>83</sup>

The important variability observed for the above quantitative results of trace elements in tears must be stressed, which differs with our results for Cu and Zn (averaged of 0.16 and  $0.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively). Experimental differences may be attributed to the tear sampling procedure or methodological determination. It seems that sampling using Schirmer strips provided lower levels of Zn and Cu,<sup>48,82,83</sup> when compared to the use of glass microcapillary.<sup>80,81</sup> Schirmer strips are routinely used in clinic to determine tear production, where the aqueous fraction of the tear travels further along the strips than non-polar proteins, lipids, or metabolites.<sup>42</sup> This fact, along with the requirement of a quantitative extraction of the analytes from the strips for further analysis, may contribute to the observed differences in sample composition. In fact, the tear composition is affected by the method used for sample collection,<sup>84</sup> as discussed for proteins,<sup>85</sup> metabolites,<sup>26</sup> and lipids.<sup>44</sup> The use of microcapillary tubes is less invasive, safer, and avoids reflex tearing, leading to the identification of a huge number of extracellular proteins, when compared to the use of Schirmer strips,<sup>25</sup> but requires trained personal, which could explain the low number of studies using microcapillary sampling. Also, particular care must be taken with all the methodologies to avoid sample contamination during uptake and pretreatment.

The observed lower levels for Fe, Mg and Cu in the AMD cohort of our study may be related to disease onset or progression. The essential element Fe is the most abundant redox-active metal in the human body,<sup>86</sup> the local accumulation of which has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, including AMD.<sup>87</sup> Specifically, higher content of Fe has been detected in the photoreceptors, RPE and its melanosomes, Bruch's membrane, and

extracellular deposits of AMD patients,<sup>87-90</sup> where its retinal accumulation may contribute to AMD pathogenesis by inducing oxidative stress and inflammation damage. Interestingly, elemental analysis of aqueous humor showed higher levels of Fe in AMD patients when compared to control subjects.<sup>91</sup> Nonetheless, according to our results, decreased concentration of Fe in the recruited AMD patients seems to be directly related with the observed lower levels of LF, one of the main iron binding proteins in the tear film, which suggest the underlying interplay between both variables.

Likewise, Cu is an essential element for the visual cycle and photoreceptors survival, the deficiency of which has been associated with morphological changes in the retina and optic neuropathy.<sup>92</sup> The lower Cu concentration determined in the tear film of our recruited patients diagnosed with AMD is in line with the lower levels of Cu observed in the aqueous humor of individuals with nonexudative AMD.<sup>93</sup> With aging, increased systemic levels of Cu (blood or serum) was observed,<sup>93</sup> but the local Cu levels in the RPE and choroid were reduced,<sup>94</sup> specifically in AMD patients,<sup>95</sup> reflecting lower levels of this element within the affected eye. On the other hand, Mg is the second most abundant intracellular cation involved in maintenance of cell membrane function, synthesis of nucleic acids, and energy metabolism.<sup>96</sup> Heesterbeek et al.<sup>97</sup> determined by ICP-MS that Mg levels were higher in the plasma of AMD patients, but without statistical significance. Recently, Chang et al.<sup>98</sup> reported that multiple dietary nutrients, including Mg, were associated with decreased risk for neovascular AMD. Considering its physiological role in restoring the blood-brain barrier integrity, Mg deficiency has been associated with age-related neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Alzheimer's or Parkinson diseases.<sup>17,98</sup> Specifically, Mg levels were lower in the blood of patients with ALS, when compared to control subjects, similarly to the significantly lower concentrations of this element determined in the tear film of AMD patients.

The higher prevalence of dyslipidemia in the AMD group is in agreement with previous studies, showing that pathogenesis may be related to circulating lipids, local lipid transport, or both.<sup>28,99</sup> To discard possible confounders of demographic and clinical conditions, including the risk factor dyslipidemia, in the altered levels of target metals and (metallo-)proteins obtained in the tear film of AMD patients, when compared to control subjects, an additional statistical analysis was carried out. Exclusion of the subjects with dyslipidemia from the multivariate analysis provided similar results, as compared to statistical analysis obtained including individuals with that risk factor, with the exception of Mg, probably because of the individual's reduction in the studied cohort, indicating the low influence of this risk factor on the obtained differences. Interestingly, the multivariate logistic regression analysis confirmed that dyslipidemia did not contribute to the observed differences, and therefore the differences observed for MT1A, S100A6, LF, Fe and Cu are as result of AMD disease.

Additionally, the possible correlations between proteins and elements were also investigated, observing a statistically significant positive trend for Mg when comparing with Na, Cu and P (Figs. 4A-C), for both AMD and control subjects. Conversely, positive correlations for Mg and Ca (Fig. 4D), for Ca and Na (Fig. 4E), and for LF and Cu, were exclusively observed for the AMD group and not for the healthy controls. Notably, LF was the only protein showing high positive

correlation with Cu (Fig. 4 D), but not for Fe, suggesting a possible interdependence in AMD disease. The highly positive correlation observed for Mg with Na, P and Ca may suggest an agonist behavior of Mg,<sup>100</sup> and also for Na and P and for LF and Cu. However, the specific positive interaction in the AMD group needs to be elucidated. Interestingly, the quantitative data obtained for the thirteen variables in both AMD and control groups were used to establish a three-protein-metal panel, consisting of MT1A, Na and Mg. This panel was used to generate machine-learning models (see Table 3), obtaining the classification accuracy when comparing AMD patients versus control subjects, which predicts the disease in the 73% of cases. However, the diagnostic power for predicting AMD is quite low using these variables, and it seems that their alterations in tears are not directly associated between themselves.

Even though this is a comprehensive targeted study on trace metals and (metallo-)proteins in patients with dry AMD, this work should be considered as exploratory. This study is limited by the restricted number of samples used for statistical analysis, which would require additional recruited patients to obtain more than 300 samples for each group to reach adequate power of the tests. Hence, the low number of samples used for classifying groups may affect the discriminating power of the studied panel of MT1A, Na and Mg, using the proposed algorithms. Also, evaluation of tear film composition throughout the day and in the long time would be desirable in future studies to determine intra- and/or inter-daily variations. Finally, issues regarding the relevant correlation of the tear film composition with macular lesions are open, considering that although the tear film is not directly connected with the retina, it can be altered by the partial blood-retinal barrier breakdown in the course of AMD.

The multitargeted approach developed for the analysis of limited volume from the tear film permitted us to obtain quantitative information for 13 variables, including LF, S100A6, CFH, CLU, APP, MT1A, Ca, Mg, P, Na, Cu, Fe, and Zn, combining spectrophotometry and mass spectrometry analytical techniques. The specific altered levels of metals and (metallo-)proteins (i.e., MT1A, S100A6, LF, Fe, Mg and Cu) in the tear film of AMD patients suggest compromised metal homeostasis during the progression of this neurodegenerative disease and may contribute to shedding light into the pathophysiology of macular degeneration. The possible relation of observed pathophysiological changes with the anomalous protein aggregation deserves further research.

#### Acknowledgments

The authors thank Esther Vázquez for her technical support during tear sampling collection.

Supported through project PID2019-107838RB-I00/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033. E. Valencia acknowledges the FPI Grant (Ref. BES-2017-080518) from the Ministry of Economy and Competitiveness. The Instituto Oftalmológico Fernández-Vega and Fundación de Investigación Oftalmológica acknowledge financial support from the Fundación Rafael del Pino (<http://www.frdelpino.es>), through the "Cátedra Rafael del Pino."

Disclosure: **E. Valencia**, none; **M. García**, none; **B. Fernández-Vega**, none; **R. Pereiro**, none; **L. Lobo**, none; **H. González-Iglesias**, none

#### References

- Desa UN. *World population prospects 2019: highlights*. New York: United Nations Department for Economic and Social Affairs. 2019;11(1):125.
- Jucker M, Walker LC. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018;21:1341–1349.
- Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal*. 2014;2(2):e106–e116.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. The age-related eye disease study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: The age-related eye disease study report number 6. *Am J Ophthalmol*. 2001;132:668–681.
- Sadda SVR, Guymer R, Monés JM, Tufail A, Jaffe GJ. Anti-vascular endothelial growth factor use and atrophy in neovascular age-related macular degeneration: systematic literature review and expert opinion. *Ophthalmology*. 2020;127:648–659.
- Chakravarthy U, Bailey CC, Johnston RL, et al. Characterizing disease burden and progression of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2018;125:842–849.
- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:14682–14687.
- Lengyel I, Flinn JM, Peto T, et al. High concentration of zinc in sub-retinal pigment epithelial deposits. *Exp Eye Res*. 2007;84:772–780.
- Flinn JM, Kakalec P, Tappero R, Jones B, Lengyel I. Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration. *Metallomics*. 2014;6:1223–1228.
- Thompson RB, Reffatto V, Bundy JG, et al. Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:1565–1570.
- Wang L, Clark ME, Crossman DK, et al. Abundant lipid and protein components of drusen. *PLoS One*. 2010;5(4):e10329.
- Astrid Sigel, Sigel H, Roland KO, ed. *Neurodegenerative diseases and metal ions*. Vol 1. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2014.
- Quintanar L, Lim MH. Metal ions and degenerative diseases. *J Biol Inorg Chem*. 2019;24:1137–1139.
- Tan ACS, Pilgrim MG, Fearn S, et al. Calcified nodules in retinal drusen are associated with disease progression in age-related macular degeneration. *Sci Transl Med*. 2018;10(466):1–12.
- Everett J, Lermyte F, Brooks J, et al. Biogenic metallic elements in the human brain? *Sci Adv*. 2021;7(24):eabf6707.
- Gilbert R, Peto T, Lengyel I, Emri E. Zinc nutrition and inflammation in the aging retina. *Mol Nutr Food Res*. 2019;63(15):1–16.
- Cicero CE, Mostile G, Vasta R, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ Res*. 2017;159(July):82–94.
- White AR, Kanninen KM, Crouch PJ. Editorial: Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(JUL):1–2.
- von Thun und Hohenstein-Blaul N, Funke S, Grus FH. Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Exp Eye Res*. 2013;117:126–137.

20. Sullivan DA, Stern ME, Tsubota K, Dartt DA, Sullivan RM, Bromberg B, ed. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes 3*. 3rd ed. Boston: Springer; 2002.
21. King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, Tiffany JM. The thickness of the tear film. *Curr Eye Res*. 2004;29(4-5):357-368.
22. Cwiklik L. Tear film lipid layer: a molecular level view. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858:2421-2430.
23. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J*. 2016;7:1-20.
24. Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23:449-474.
25. Ponzini E, Santambrogio C, De Palma A, Mauri P, Tavazzi S, Grandori R. Mass spectrometry-based tear proteomics for noninvasive biomarker discovery [published online ahead of print March 24, 2021]. *Mass Spectrom Rev*. doi:10.1002/mas.21691.
26. Brown CN, Green BD, Thompson RB, Den Hollander AI, Lengyel I. Metabolomics and age-related macular degeneration. *Metabolites*. 2019;9(1):4.
27. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006;113:260-266.
28. Curk T, Demsar J, Xu Q, et al. Microarray data mining with visual programming. *Bioinformatics*. 2005;21:396-398.
29. Fan Q, Maranville JC, Fritsche L, et al. HDL-cholesterol levels and risk of age-related macular degeneration: a multiethnic genetic study using Mendelian randomization. *Int J Epidemiol*. 2017;46:1891-1902.
30. Fernández-Vega B, García M, Olivares L, et al. The association study of lipid metabolism gene polymorphisms with AMD identifies a protective role for APOE-E2 allele in the wet form in a Northern Spanish population. *Acta Ophthalmol*. 2020;98(3):e282-e291.
31. Ponzini E, Scotti L, Grandori R, Tavazzi S, Zambon A. Lactoferrin concentration in human tears and ocular diseases: a meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(12):9.
32. Benítez-Del-Castillo JM, Soria J, Acera A, Muñoz AM, Rodríguez S, Suárez T. Quantification of a panel for dry-eye protein biomarkers in tears: a comparative pilot study using standard ELISA and customized microarrays. *Mol Vis*. 2021;27(May):243-261.
33. Soria J, Acera A, Merayo-Lloves J, et al. Tear proteome analysis in ocular surface diseases using label-free LC-MS/MS and multiplexed-microarray biomarker validation. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-15.
34. Yu V, Bhattacharya D, Webster A, et al. Clusterin from human clinical tear samples: Positive correlation between tear concentration and Schirmer strip test results. *Ocul Surf*. 2018;16:478-486.
35. Gachon AM, Richard J, Dastugue B. Human tears: normal protein pattern and individual protein determinations in adults. *Curr Eye Res*. 2009;2(5):301-308.
36. Tamás MJ, Sharma SK, Istedt S, Jacobson T, Christen P. Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*. 2014;4:252-267.
37. Lee JC, Kim JE, Pletneva E V, Faraone-Mennella J, Gray HB, Winkler JR. Protein Folding, Misfolding, and Disease. In: *Neurodegenerative Diseases and Metal Ions*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2006:9-60.
38. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res*. 2020;197:108115.
39. Forrester J, Dick A, McMenamin P, Roberts F, Pearlman E. *The Eye. Basic Science in Practice*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences; 2015.
40. Dartt DA, Willcox MDP. Complexity of the tear film: Importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res*. 2013;117:1-3.
41. Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics*. 2012;75:3877-3885.
42. Grus FH, Joachim SC, Pfeiffer N. Proteomics in ocular fluids. *Proteomics - Clin Appl*. 2007;1:876-888.
43. Karnati R, Laurie DE, Laurie GW. Lacritin and the tear proteome as natural replacement therapy for dry eye. *Exp Eye Res*. 2013;117:39-52.
44. Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res*. 2014;55:289-298.
45. Rantamäki AH, Seppänen-Laakso T, Oresic M, Jauhainen M, Holopainen JM. Human tear fluid lipidome: From composition to function. *PLoS One*. 2011;6(5):1-7.
46. Butovich IA. Tear film lipids. *Exp Eye Res*. 2013;117:4-27.
47. Chen L, Zhou L, Chan ECY, Neo J, Beuerman RW. Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS. *J Proteome Res*. 2011;10:4876-4882.
48. Semeraro F, Costagliola C, Cancarini A, Gilberti E, Tosco E, Apostoli P. Defining reference values of trace elements in the tear film: Diagnostic methods and possible applications. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012;80:190-194.
49. Roda M, Ciavarella C, Giannaccare G, Versura P. Biomarkers in tears and ocular surface: a window for neurodegenerative diseases. *Eye Contact Lens*. 2020;46:S129-S134.
50. Yu H, Yuan L, Yang Y, et al. Increased serum IgA concentration and plasmablast frequency in patients with age-related macular degeneration. *Immunobiology*. 2016;221:650-656.
51. Winiarczyk M, Kaarniranta K, Winiarczyk S, Adaszek Ł, Winiarczyk D, Mackiewicz J. Tear film proteome in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018;256:1127-1139.
52. Winiarczyk M, Winiarczyk D, Michalak K, et al. Dysregulated tear film proteins in macular edema due to the neovascular age-related macular degeneration are involved in the regulation of protein clearance, inflammation, and neovascularization. *J Clin Med*. 2021;10:3060.
53. Xi Y, Ju R, Wang Y. Roles of annexin A protein family in autophagy regulation and therapy. *Biomed Pharmacother*. 2020;130(August):110591.
54. Donato R, Cannon BR, Sorci G, et al. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med*. 2012;13:24-57.
55. Chen Y, Huang K, Nakatsu MN, Xue Z, Deng SX, Fan G. Identification of novel molecular markers through transcriptomic analysis in human fetal and adult corneal endothelial cells. *Hum Mol Genet*. 2013;22:1271-1279.
56. Soria J, Durán JA, Etxebarria J, et al. Tear proteome and protein network analyses reveal a novel pentamer panel for tear film characterization in dry eye and meibomian gland dysfunction. *J Proteomics*. 2013;78:94-112.
57. Recalde JI, Durán JA, Rodríguez-Agüirretxe I, et al. Changes in tear biomarker levels in keratoconus after corneal collagen crosslinking. *Mol Vis*. 2019;25:12-21.
58. Li C, Zhang F, Wang Y. S100A proteins in the pathogenesis of experimental corneal neovascularization. *Mol Vis*. 2010;16:2225-2235.
59. Riau AK, Wong TT, Beuerman RW, Tong L. Calcium-binding S100 protein expression in pterygium. *Mol Vis*. 2009;15:335-342.
60. Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, et al. Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Mol Vis*. 2009;15:2421-2434.
61. Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2531-2539.

62. Flanagan JL, Willcox MDP. Role of lactoferrin in the tear film. *Biochimie*. 2009;91(1):35–43.
63. Clausen R, Weller M, Wiedemann P, Heimann K, Hilgers RD, Zilles K. An immunochemical quantitative analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1991;29:186–190.
64. Lawen A, Lane DJR. Mammalian iron homeostasis in health and disease: Uptake, storage, transport, and molecular mechanisms of action. *Antioxidants Redox Signal*. 2013;18:2473–2507.
65. Li Y-Q, Guo C. A review on lactoferrin and central nervous system diseases. *Cells*. 2021;10:1810.
66. Grus FH, Podust VN, Bruns K, et al. SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:863–876.
67. Kawashima M, Kawakita T, Inaba T, et al. Dietary lactoferrin alleviates age-related lacrimal gland dysfunction in mice. *PLoS One*. 2012;7(3):3–10.
68. Ibuki M, Shoda C, Miwa Y, Ishida A, Tsubota K, Kurihara T. Lactoferrin has a therapeutic effect via HIF inhibition in a murine model of choroidal neovascularization. *Front Pharmacol*. 2020;11(Feb):1–11.
69. Kijlstra A, Jeurissen SHM, Koning KM. Lactoferrin levels in normal human tears. *Br J Ophthalmol*. 1983;67:199–202.
70. Gonzalez-Iglesias H, Alvarez L, García M, Petrash C, Sanz-Medel A, Coca-Prados M. Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle. *Metallomics*. 2014;6:201–208.
71. Álvarez-Barrios A, Álvarez L, García M, Artime E, Pereiro R, González-Iglesias H. Antioxidant defenses in the human eye: A focus on metallothioneins. *Antioxidants*. 2021;10:1–33.
72. Vasák M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4:177–183.
73. Tate DJ, Newsome DA, Oliver PD. Metallothionein shows an age-related decrease in human macular retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:2348–2351.
74. Rodríguez-Menéndez S, García M, Fernández B, et al. The zinc-metallothionein redox system reduces oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Nutrients*. 2018;10:1874.
75. Chen L, Wu W, Dentchev T, et al. Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res*. 2004;79:239–247.
76. Biswal MR, Ahmed CM, Ildefonso CJ, et al. Systemic treatment with a 5HT1a agonist induces anti-oxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress. *Exp Eye Res*. 2015;140:94–105.
77. Micera A, Di Zazzo A, Esposito G, et al. Age-related changes to human tear composition. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:2024–2031.
78. Kondkar AA, Azad TA, Almobarak FA, Kalantan H, Al-Obeidan SA, Abu-Amero KK. Elevated levels of plasma tumor necrosis factor alpha in patients with pseudoexfoliation glaucoma. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:153–159.
79. Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC.  $\beta$ -Secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol*. 2004;164:719–725.
80. Saatçi AO, İrkeç M, Özgüneş H. Zinc in tears. *Ophthalmic Res*. 1991;23:31–32.
81. Wei XE, Markoulli M, Millar TJ, Willcox MDP, Zhao Z. Divalent cations in tears, and their influence on tear film stability in humans and rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:3280–3285.
82. Framroze Z, Conroy C. Measuring the change in zinc ion concentration in eye tear fluid between healthy and parasite infected individuals: relationship between zinc ions in tear fluid and parasitic infection by soil-transmitted helminths. *J Med Diagnostic Methods*. 2016;5(4):8–11.
83. Cancarini A, Fostinelli J, Napoli L, Gilberti ME, Apostoli P, Semeraro F. Trace elements and diabetes: assessment of levels in tears and serum. *Exp Eye Res*. 2017;154:47–52.
84. Rentka A, Koroskenyi K, Harsfalvi J, et al. Evaluation of commonly used tear sampling methods and their relevance in subsequent biochemical analysis. *Ann Clin Biochem*. 2017;54:521–529.
85. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis*. 2008;14:456–470.
86. Hirayama T. Fluorescent probes for the detection of catalytic Fe(II) ion. *Free Radic Biol Med*. 2019;133(June 2018):38–45.
87. Biesemeier A, Yoeruek E, Eibl O, Schraermeyer U. Iron accumulation in Bruch's membrane and melanosomes of donor eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2015;137:39–49.
88. Wong RW, Richa DC, Hahn P, Green WR, Dunaief JL. Iron toxicity as a potential factor in AMD. *Retina*. 2007;27:997–1003.
89. Dunaief JL. Iron induced oxidative damage as a potential factor in age-related macular degeneration: the Cogan lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4660–4664.
90. Hahn P, Milam AH, Dunaief JL. Maculas affected by age-related macular degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol*. 2003;121:1099–1105.
91. Jünemann AGM, Stopa P, Michalke B, et al. Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exudative age-related macular degeneration: a case-control study. *PLoS One*. 2013;8(2):1–7.
92. Pineles SL, Wilson CA, Balcer LJ, Slater R, Galetta SL. Combined optic neuropathy and myelopathy secondary to copper deficiency. *Surv Ophthalmol*. 2010;55:386–392.
93. Belbraouet S, Biaudet H, Tébi A, Chau N, Gray-Donald K, Debry G. Serum zinc and copper status in hospitalized vs. healthy elderly subjects. *J Am Coll Nutr*. 2007;26:650–654.
94. Wills NK, Ramanujam VMS, Kalariya N, Lewis JR, van Kuijk FJGM. Copper and zinc distribution in the human retina: relationship to cadmium accumulation, age, and gender. *Exp Eye Res*. 2008;87:80–88.
95. Erie JC, Good JA, Butz JA, Pulido JS. Reduced zinc and copper in the retinal pigment epithelium and choroid in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009;147:276–282.e1.
96. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Magnesium. A. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta*. 2000;294(1-2):1–26.
97. Heesterbeek TJ, Rouhi-Parkouhi M, Church SJ, et al. Association of plasma trace element levels with neovascular age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2020;201:108324.
98. Chang JJ, Mack WJ, Saver JL, Sanossian N. Magnesium: Potential roles in neurovascular disease. *Front Neurol*. 2014;5:1–8.
99. van Leeuwen EM, Emri E, Merle BMJ, et al. A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2018;67:56–86.
100. Grigoryan R, Costas-Rodriguez M, Vandenbroucke RE, Vanhaecke F. High-precision isotopic analysis of Mg and Ca in biological samples using multi-collector ICP-mass spectrometry after their sequential chromatographic isolation - Application to the characterization of the body distribution of Mg and Ca isotopes in mice. *Anal Chim Acta*. 2020;1130:137–145.

## *Supplementary Material*

### **Targeted analysis of tears revealed specific altered metal homeostasis in age-related macular degeneration**

**Eva Valencia<sup>1,2</sup>, Montserrat García<sup>2,3</sup>, Beatriz Fernández-Vega<sup>2,3</sup>, Rosario Pereiro<sup>1,3</sup>, Lara Lobo<sup>1,\*</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>2,3,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Ophthalmological Research Foundation (University Institute Fernández-Vega, University of Oviedo), 33012 Oviedo, Spain.

<sup>2</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>3</sup>Ophthalmological Institute Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, Spain.

<sup>3</sup>Current Address: Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Spain.

\*Corresponding authors. Ophthalmological Institute Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012, Oviedo, Spain. Telephone: +34985240141. E-mail addresses: [lobolara@uniovi.es](mailto:lobolara@uniovi.es) (L. Lobo), [h.gonzalez@fio.as](mailto:h.gonzalez@fio.as) (H. González-Iglesias)

**Keywords:** Age-related macular degeneration, tear, targeted analysis, metals, dyshomeostasis.

**Supplementary Material Description:** The supplementary material contains supplementary data on molecular assays using ELISA kits, the supplementary Table S1 of Analytical parameters of individual ELISA analysis, the Supplementary Table S2 describing common oral treatments in both control subjects and AMD

patients, and the Supplementary Table S3 of Concentrations of proteins and elements determined in the tear film of AMD patients and control subjects without considering patients with dyslipidemia.

#### **Molecular assays using ELISA kits**

Commercially available sandwich-type ELISA kits from Abcam (UK) were used for the quantification the proteins human lactoferrin (LF, ab200015), human complement factor H (CFH, ab252359), human clusterin (CLU, ab174447) and human amyloid precursor protein (APP, ab216944). Commercial ELISA kits purchased from Abyntek Biopharma (Vizcaya, Spain) and LS BIO (WA, USA) were used for the analysis of human S100 calcium binding protein A6 (S100A6, ABK1-E1028) and human metallothioneins 1A (MT1A, LS-F10296), respectively. Quantitation was performed according to the instructions of the manufacturer, as follows:

Abcam ELISA kit protocol for LF, CFH, CLU and APP. 50  $\mu$ L of standard or samples were introduced in each well, then antibody cocktail was added. The plate was incubated at room temperature for an hour while was stirred. Afterwards, three washing steps were carried out using 1x PBS Buffer. Finally, a TMB solution was added and after stirring for 10 minutes, the reaction was stopped using a stop solution. Absorbance was measured at 450 nm wavelength.

Abyntek ELISA kit protocol for S100A6. 100  $\mu$ L of each solution, standard or sample, were added to wells. Then, an incubation step of 1 h at 37°C was carried out. Next, a detection reagent Ab solution was introduced in each well. After 1 h at the same temperature as first incubation step, the plate was washed three times using a 1x PBS Buffer. Then, a second detection reagent Ab solution was added and incubated for 30 min at 37°C. Five washing steps were carried out. A substrate solution was introduced inside all wells and the plate was incubated 10 min at 37°C. Finally, the enzymatic reaction was stopped, and the absorbance was monitored at 450 nm wavelength.

LSBIO ELISA kit protocol for MT1A. 100  $\mu$ L of each solution, standard or sample, were added to wells. Then, an incubation step of 2 h at 37°C was carried out. Next, a detection reagent Ab solution was introduced

in each well. After 1 h at the same temperature as first incubation step, the plate was washed three time using a 1x PBS Buffer. Then, a second detection reagent Ab solution was added and incubated for 1h at 37 oC. Five washing steps were carried out. A substrate solution was introduced inside all wells and the plate was incubated 10 min at 37oC. Finally, the enzymatic reaction was stopped, and the absorbance was monitored at 450 nm wavelength.

The analytical parameters of each individual ELISA assays are shown in Table S1.

**Table S1.** Analytical parameters of individual ELISA analysis

ELISA assay	LoD (ng/mL)	LoQ (ng/mL)	Calibration curve	Correlation coefficient	Detection range (pg/mL)
LF	0.193	0.644	$y = 0.00006x + 0.0667$	0.998	0-10000
CLU	0.312	1.042	$y = 0.00007x + 0.0349$	0.998	0-15000
APP	0.134	0.446	$y = 0.0001x + 0.0538$	0.998	0-6000
CFH	0.260	0.869	$y = 0.00006x + 0.0466$	0.997	0-10000
MT1A	0.007	0.025	$y = 0.0011x + 0.0891$	0.998	0-400
S100A6	0.274	0.914	$y = 0.0001x + 0.2518$	0.991	0-5000

LoD, detection limit; LoQ, quantitation limit

### Study subjects

**Table S2.** Common oral treatments in both control subjects and AMD patients.

Oral treatments	Study population (n)			
	Controls (29)	% controls	AMD (31)	% AMD
Lyrica (anticonvulsant)	2	7	0	0

3

Adiro 100 (acetylsalicylic acid)	3	10	2	6
Enalapril (anti- HTA)	1	3	1	3
Tramadol (pain)	1	3	1	3
Sintrom (acenocoumarol)	2	7	1	3
Omeprazole	3	10	3	10
Noctamid (lormetazepam)	2	7	0	0
Orfidal (benzodiazepines)	2	7	4	13
Hemovsas (pentoxifilina)	2	7	0	0
Avidart (dutasteride)	1	3	1	3
Atorvastatin	1	3	3	10
Tranxilium (dipotassium clorazepate)	1	3	1	3
Eutirox (levothyroxine)	1	3	1	3
Diovan (anti-HTA)	9	31	11	35
Simvastatin	2	7	10	32

### Elemental and molecular quantitation in the tear film of AMD patients and control subjects without dyslipidemia

**Table S3.** Concentrations of proteins and elements determined in the tear film of AMD patients (n=17) and control subjects (n=27), after filtering dyslipidemic individuals.

Protein Concentrations	Protein Concentrations			
	Control	AMD	Fold-change	p-value
Lactoferrin (average $\pm$ StD, mg/mL)	11.96 $\pm$ 4.13	5.89 $\pm$ 3.13	0.5	0.0005
S100A6 (average $\pm$ StD, ng/mL)	393.84 $\pm$ 153.38	541.37 $\pm$ 238.47	1.4	0.04
CFH (average $\pm$ StD, ng/mL)	1632.82 $\pm$ 1152.43	2047.47 $\pm$ 1375.23	1.3	0.4
Clusterin (average $\pm$ StD, mg/mL $\mu$ g/mL)	28.67 $\pm$ 12.78	35.55 $\pm$ 15.15	1.2	0.2
APP (average $\pm$ StD, ng/mL)	174.65 $\pm$ 78.86	156.03 $\pm$ 79.25	0.9	0.2
MT1A (average $\pm$ StD, ng/mL)	154.31 $\pm$ 37.63	328.45 $\pm$ 258.53	2.1	0.002

Element Concentrations				
Na (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	2141.09 $\pm$ 531.66	1872.65 $\pm$ 864.13	0.9	0.3
Mg (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	9.748 $\pm$ 3.76	6.81 $\pm$ 4.16	0.7	0.07
P (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	3.96 $\pm$ 2.31	3.36 $\pm$ 2.80	0.8	0.6
Ca (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	22.26 $\pm$ 7.38	22.67 $\pm$ 16.66	1.0	0.8
Fe (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	3.22 $\pm$ 1.88	1.75 $\pm$ 1.00	0.5	0.02
Cu (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	0.16 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.04	0.6	0.01
Zn (average $\pm$ StD, $\mu\text{g/mL}$ )	0.36 $\pm$ 0.27	0.32 $\pm$ 0.22	0.9	0.7

**Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a  
competitive immunoassay for the complement factor H**

Eva Valencia, Maria Cruz-Alonso, Lydia Álvarez, Héctor González-Iglesias,  
Beatriz Fernández, Rosario Pereiro

*Microchimica Acta* 186, 429



## Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H

Eva Valencia<sup>1</sup> · María Cruz-Alonso<sup>1</sup> · Lydia Álvarez<sup>2</sup> · Héctor González-Iglesias<sup>2,3</sup> · Beatriz Fernández<sup>1,2</sup> · Rosario Pereiro<sup>1,2</sup>

Received: 12 February 2019 / Accepted: 24 May 2019  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Silver nanoclusters (AgNCs) were investigated as labels for the development of a fluoroimmunoassay for the complement factor H (CFH). The reductive one-pot synthesis of AgNCs using lipoic acid as a ligand was optimized by varying the concentration of NaBH<sub>4</sub>, the temperature and the reaction time. The average diameter and crystal structure of the AgNCs (which display red fluorescence) were determined by HR-TEM. The silver concentration was quantified by ICP-MS. Labelling of the antibody against CFH with AgNCs was optimized. The antibody was labeled with the AgNCs without compromising the recognition capabilities of the antibody. A competitive fluoroimmunoassay was then developed. Fluorescence is measured at excitation/emission maxima of 430/660 nm. The assay has a 0.4 ng mL<sup>-1</sup> detection limit and a linear range that extends from 1.2 to 23 ng mL<sup>-1</sup>. The results compare favorably with those obtained by a commercial ELISA kit. The method was applied to the determination of CFH in spiked human serum.

**Keywords** Fluoroimmunoassay · Lipoic acid · One-pot synthesis · Carbodiimide · Labelling · Human serum

### Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of irreversible blindness in adults over the age of 60. It is a neurodegenerative eye disease characterized by the progressive loss of central vision [1]. During early AMD there is a continuous formation of extracellular deposits below the retina, called drusens, increasing in number and size in the

advanced stages [2]. Complement factor H (CFH), a constituent component of drusens [3, 4], has been identified as the first genetic variant strongly associated with AMD [5, 6]. The CFH protein is secreted into the bloodstream and has an essential role in the regulation of complement system. Therefore, altered or dysfunctional CFH might lead to chronic local inflammation that can be associated with the formation of drusens and thus the initiation and progression of AMD [7, 8]. Accordingly, the serum levels of CFH are of potential interest to predict AMD (molecular biomarkers) [9]. In addition, it may be required a highly sensitive method for the determination of CFH in small samples such as drusens or ocular fluids and also for studying in vitro cellular models secreting CFH [3, 10, 11].

Organic dyes and semiconductor quantum dots (QDs) are among the most commonly used fluorescent labels for analytical applications in the biomedical field. However, organic fluorophores usually are highly susceptible to photobleaching (here, it should be highlighted efforts towards the development of more photostable luminescent compounds, such as iridium (III) complexes [12]). On the other hand, QDs typically contain highly toxic metal species (e.g., CdSe) and suffer photoluminescence blinking, which restrains their use. To those labels, it should be added the water-soluble luminescent

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3554-y>) 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

metal nanoclusters (NCs), which are composed of a few to roughly several hundred metal atoms, with sizes below 3 nm [13]. The research on this later class of fluorescent labels has been fueled by properties of metal NCs, such as strong photoluminescence, large Stoke shifts, good photostability and low toxicity [14, 15]. Most frequently published photoluminescent NCs are constituted of gold [16, 17]. Furthermore, NCs of silver (AgNCs) [18–20] have proved to emit high photoluminescence. Fluorescent NCs made of copper [21] and platinum [22] have been also reported.

DNA-templated AgNCs offer interesting applications [23], including the use of DNA – Ag NC beacons for detection of nucleic acids [24] and transcription factors [25]. Moreover, other templates or stabilizing agents such as proteins, polymers and dendrimers have been also used for the synthesis of metal NCs [26]. Unfortunately, an inconvenience related with the use of such large templates is the difficulty in the removal of the remaining free templates from the clusters in solution. In addition, it has been observed in our laboratory that blanks of the synthesis reaction of some templates, such as those based on poly(ethyleneimine) based-polymers and polyamidoamine dendrimers, emit a high fluorescence. On the other hand, thiolate ligands are a popular choice to synthesize metal NCs [27]. In particular, it has been described that the use of small stabilizing agents such as lipoic acid can give rise to stable and highly luminescent metal NCs [17, 28–31] making also easier its process of purification.

Considering the high luminescence reported for AgNCs, in this work this type of metal NC has been investigated as fluorescent label for the determination of CFH. In a first step, the synthesis of AgNCs using lipoic acid has been optimized in terms of fluorescent properties and size homogeneity. The selected AgNCs were studied by complementary analytical techniques and the AgNCs particle concentration in solution was obtained. Then, the antibody (Ab) anti-CFH was labelled with the AgNCs and a competitive fluoroimmunoassay was developed. Finally, the optimized immunoassay has been investigated for the determination of CFH in human serum.

## Experimental

### Reagents and materials

One-pot synthesis of AgNCs was carried out with silver nitrate (99.9% crystalline; Alfa Aesar, Thermo Fisher, Kandel, Germany; <https://www.thermofisher.com>), lipoic acid (> 98% powder; Across Organics, Geel, Belgium; <http://www.acros.com>), sodium hydroxide (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WIS, USA; <https://www.sigmaaldrich.com>) and sodium tetrahydroborate (> 98% powder, Sigma-Aldrich).

Complement factor H (CFH; from MyBioSource, San Diego, USA; <https://www.mybiosource.com>) was employed

for the construction of the immunoassay calibration plots. Anti-human CFH produced in goat (LSBio, Seattle, USA; <https://www.lsbio.com>) was the Ab used in our experiments. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (98% powder; Across Organics) and N-hydroxysuccinimide (NHS) (> 98% powder; Sigma-Aldrich), Tris base (> 99%; Sigma-Aldrich), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Panreac, Barcelona, Spain; <https://www.itwreagents.com>) and L-glutathione reduced (>98%; Sigma-Aldrich) were employed for Ab labelling. 3 and 100 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units (Merck Millipore, Darmstadt, Germany; <http://www.merckmillipore.com>) were used in purification stages.

A polyclonal anti-goat IgG horseradish peroxidase (HRP) conjugated Ab (whole molecule, produced in rabbit; Sigma-Aldrich) was used as secondary Ab to evaluate the antigen recognition capabilities of the labelled Ab. TMB substrate kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was employed to detect the HRP in ELISA microtitration plates (Sterilin Limited, Newport UK; <http://www.sterilin.co.uk>).

Immunoassays with the AgNCs labelled Ab were carried out in poly-L-lysine surface coated microscope slides (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA; <http://www.electronmicroscopysciences.com>) with an adhesive on one side press-to-seal silicon isolator (Grace bio-labs, Oregon, USA; <https://gracebio.com>). Bovine serum albumin (BSA) ( $\geq$  99% powder; Sigma-Aldrich) was used as blocking agent. PBS was prepared with the following reagents: sodium chloride (Scharlab, Barcelona, Spain; <http://scharlab.com>), potassium chloride (Panreac), sodium phosphate dibasic ( $\geq$  98%, Acros Organics) and potassium phosphate monobasic (Sigma-Aldrich).

Aqua regia containing nitric acid (65% VWR International, Pennsylvania, USA; <https://www.vwr.com>) and hydrochloric acid (37% VWR International) was employed for AgNCs dissolution before determination of total elemental silver concentration by inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS). Deionized ultrapure water, resistivity 18.2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup> (Purelab Flex 3&4, ELGA-Veolia, UK; <https://www.elgalabwater.com>), was used throughout.

Clinical human serum samples from different control subjects recruited at the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo, Spain) were used to investigate the applicability of the immunoassay. Blood was collected in 5 mL Z Serum Sep Clot Activator tubes coated with microscopic silica particles (Vacuette, Madrid, Spain; <http://artroten.net/index.aspx>). The tubes were centrifuged at 1800 g for 18 min at 4 °C, and the supernatant (serum) was stored at –80 °C until use. The study adheres to the tenets of the Declaration of Helsinki on Biomedical Research Involving Human Subjects. Furthermore, full ethical approval was obtained from the Clinical Research Ethics Committee at the Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Spain). All subjects included in this study signed an informed consent. The

method was verified with an ELISA kit for CFH, Ref 90635Hu (USCN Life Science Inc., Wuhan, China; <http://www.uscnlifescience.com>) (96 tests).

### Instrumentation

A spectrophluorimeter (LS-50-B, Perkin Elmer, USA; <https://www.perkinelmer.com>) was used for fluorescence measurements of AgNCs in solution, employing Hellma® fluorescence cuvettes, semi Micro Suprasil® quartz (Sigma-Aldrich).

Fluorescent measurements of the immunoassays were obtained in a confocal microscope (DM IRE2; Leica, Germany; <https://www.leica-microsystems.com>) with 63% oil immersion objective, using a 405 nm laser excitation wavelength and integrating the fluorescence for the whole well surface.

Silver concentration in aqueous media was determined by ICP-MS, Model 7500ce (Agilent, USA; <https://www.agilent.com>). Diameter, shape and crystal structure of AgNCs was obtained with a high-resolution transmission electron microscope (HR-TEM) (JEOL JEM-2100, Tokyo, Japan; <https://www.jeol.co.jp>).

ELISA measurements were carried out with an absorbance microplate reader (ELX800; Bio-Tek, USA; <https://www.biotek.com>). A heating oven (Memmert, Moscow, Russia; <https://www.memmert.com>), an ultrasonic bath (J.P. Selecta, Barcelona, Spain; <http://grupo-selecta.com>) and a minicentrifuge (Gyrozen, Daejeon, South Korea; <https://www.gyrozen.com/index.php>) were also used. Fluorescence data processing and immunoassay plots representation was carried out using Image J software and MyAssay web (<https://www.myassays.com>), respectively.

Quantum yield (QY) was determined using a Spectrofluorometer FS5 (Edinburgh Instruments, Livingston, UK; <https://www.edinst.com>) with integrating sphere. AgNCs solution was measured in standard (10 mm × 10 mm) quartz cuvettes with PTFE stopper to prevent the spillage and to avoid evaporation. The final calculation of the QY was obtained by Fluoracle software (Edinburgh Instruments).

### Synthesis of AgNCs and quantum yield measurement

In a vial protected from light, 81.06 mg of lipoic acid were dissolved in 20 mL of ultrapure water together with 240 µL of 2 M NaOH and 1 mL of a 25 mM aqueous solution of AgNO<sub>3</sub>. After mixing for 5 min, 2 mL of a solution of 150 mM NaBH<sub>4</sub> was added. Finally, the reaction was kept at 9 °C under stirring for 21 h. Subsequently, the excess of ligand and reducing agent was removed by ultrafiltration (3 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units) using the following sequence: the first cycle at 2300 rpm for 10 min and three washing steps with ultrapure water at 2300 rpm for 10 min. The

AgNCs in the filter were restored to a volume equal to the initial one. This purified AgNCs aqueous solution was stored in the fridge.

The QY of AgNCs fluorescence was determined with an absolute method. For such purpose, it was used an integrating sphere consisting of a fluoropolymer material with a high reflectance. This property means that all the light that enters inside the sphere has only two possible paths: absorption by AgNCs or collection by the detector. The number of photons absorbed by AgNCs (per time unit) was determined as the difference between the number of photons emitted by the lamp and the number of photons that reach the detector. The emitted photons were collected by the integrating sphere that focuses them all near the detector for quantification. Ultrapure water was used to perform a spectral correction of the values obtained.

### Labelling of anti-CFH antibody with AgNCs and investigation of recognition capabilities

Labelling of anti-CFH Ab was accomplished in an Eppendorf tube, covered with aluminum foil, where 100 µL of anti-CFH antibody (100 µg mL<sup>-1</sup>) was added followed by 188 µL of AgNCs in Tris-EDTA solution with 3 mM glutathione (Ab:AgNCs, molar ratio 1:3). Despite its reducing nature, glutathione does not affect the disulfide bridges that maintain the structure of the antibodies [32]. Then, a solution of EDC and NHS (0.01 M) was added in a Tris-EDTA buffer with a 1:1 ratio. After 2 h of constant stirring at room temperature, purification by ultracentrifugation (100 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units) was carried out: a first cycle of 5500 rpm for 10 min and two washing cycles with ultrapure water at 5500 rpm for 5 min. The labelled Ab (in the filter) was diluted in 1 mL of PBS and was stored in the fridge.

A spectrophotometric immunoassay was carried out (using a secondary Ab labelled with HRP) in order to investigate if the recognition capabilities of the anti-CFH are kept after labelling with the AgNCs. For such purpose, CFH standard was immobilized (10 µg mL<sup>-1</sup>) adding 100 µL/well in an ELISA plate and incubated at 38 °C for 6 h. Then, a blocking step was performed by adding 2% BSA in 10 mM PBS solution (pH = 7.6; 200 µL/well) and kept at 4 °C overnight. Next, three washing steps were carried out with 10 mM PBS (pH = 7.6) and 0.05% Tween 20 solution (200 µL/well). Subsequently, 100 µL/well of anti-CFH Ab labelled with AgNCs (1 µg mL<sup>-1</sup>) were added and kept at 38 °C during 2 h. Next, three washing steps were carried out (same conditions than those detailed at the beginning of the paragraph). The Ab labelled with peroxidase, anti-goat IgG-HRP (100 µL/well), was then added at a 1:10000 dilution in a PBS-BSA-Tween 20 buffer. Next, the plate was incubated with the same conditions described above. TMB substrate kit was added (TMB/hydrogen peroxide in a 1:1 ratio, 100 µL/well) after washing the plate. Finally, 100 µL/well of 2 M sulfuric acid was added, causing a

blue to yellow color shift. The signal measurement was carried out with an Elix 800 absorbance plate reader at 450 nm.

### Fluoroimmunoassay with AgNCs as labels

Wells of poly-L-lysine coated microscope slide were filled with CFH standard (100  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). This CFH was immobilized by chemical reaction with EDC (100  $\mu\text{L}$  of EDC, 0.0001 M) and incubation was carried out at 38 °C for 2 h. Next, the blocking step took place, for which 200  $\mu\text{L}$ /well of BSA (1% in 10 mM PBS, pH = 7.6) was added to each well. It was incubated at room temperature for 2 h. Then, a washing steps were carried out three times with a solution containing 10 mM PBS (pH = 7.6) and 0.05% Tween 20 (200  $\mu\text{L}$ /well).

On the other hand, the CFH standards diluted in PBS (100  $\mu\text{L}$ ) and the labelled antibody (100  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were mixed in Eppendorf tubes under mechanical stirring for 30 min. Then, the mixture was added to the corresponding well and kept at 38 °C for 2 h in the dark. Finally, the last washing step was carried out and the fluorescence emission was measured by confocal laser microscopy.

### Determination of complement factor H (CFH) in serum

The application of the immunoassay using AgNCs as label was investigated for quantitative analysis of CFH in human serum (three clinical serum samples, denoted as SA, SB, SC, were analyzed). A serum dilution 1:200000 with PBS was necessary in order to fit the basal levels of CFH into the calibration plot.

The determination of CFH was verified using the commercial ELISA kit specific to human CFH, following manufacturer's instructions. Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of serum samples diluted 1:5000 with PBS or 100  $\mu\text{L}$  of CFH standards for the calibration plot were added to each well of the microtiter plate pre-coated with monoclonal anti-human CFH. Incubation was carried out for 2 h at 37 °C. Then, a biotin-conjugated polyclonal antibody preparation specific for CFH was added (1 h, 37 °C), followed by incubation with Avidin conjugated to HRP (30 min, 37 °C). TMB substrate was next added (TMB/hydrogen peroxide in a 1:1 ratio; 20 min, 37 °C). Finally the enzyme-substrate reaction was stopped by the addition of sulfuric acid solution and the color change was measured by spectrophotometry at 450 nm.

## Results and discussion

### Optimization of the synthesis of AgNCs and characterization

It has been reported that the slowdown of the reaction kinetics decreases the polydispersity of NCs [27, 33]. In this context,

the effects of  $\text{NaBH}_4$  concentration, reaction time and temperature were investigated in detail aiming at synthesizing AgNCs with high fluorescence intensity and low dispersity. Previous experiments with lipoic acid as stabilizing agent have evaluated incubation temperatures in the interval 20–40 °C and  $\text{NaBH}_4$ :lipoic acid ratios between 1:1 and 5:1, being the conditions selected 25 °C and a 4:1 of  $\text{NaBH}_4$ :lipoic acid ratio. The reaction time was 90 min under such conditions. In our experiments we have investigated lower  $\text{NaBH}_4$ :lipoic acid ratios and a lower temperature.

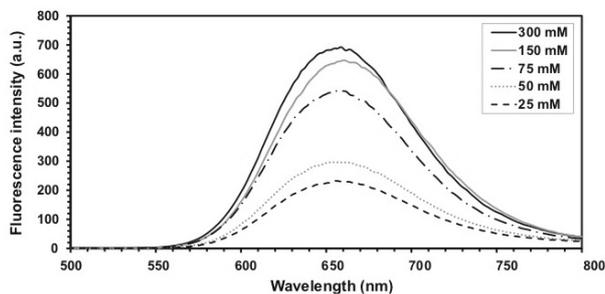
Figure 1 shows the fluorescence spectra obtained for the synthesized AgNCs using different concentrations of  $\text{NaBH}_4$  while keeping the rest of the synthesis parameters constant. In all cases, the emission spectra present a maximum about 660 nm. As can be observed, the fluorescence signal increases when higher  $\text{NaBH}_4$  concentrations were employed. However, for concentrations higher than 150 mM  $\text{NaBH}_4$  the increase is not so intense. On the other hand, it is known that high  $\text{NaBH}_4$  concentrations increase the polydispersity of AgNCs [26]. Therefore, 150 mM  $\text{NaBH}_4$  (corresponding to a  $\text{NaBH}_4$ :lipoic acid ratio close to 1:1) was selected as a compromise for further experiments.

Concerning the optimization of the synthesis reaction time, Fig. 2 shows the fluorescence signals measured for AgNCs every two hours along the synthesis reaction at 9 °C. As can be seen, the fluorescence signal increases with time up to about 19 h, and then tends to remain constant. 21 h was the time finally selected for the synthesis process.

To evaluate the effect of the synthesis temperature, two conditions were investigated: 9 °C (above experiments) and 22 °C. For this comparison, in order to stop the reaction before reaching equilibrium, the syntheses were carried out with 50 mM  $\text{NaBH}_4$  and 15 h. Fig. S1 in the Supplementary Material shows that, due to the higher reaction rate at high temperature, the fluorescence intensity reached higher values for the synthesis at 22 °C as compared to 9 °C for the same short synthesis time. The average size of the AgNCs can be calculated using the images obtained by HR-TEM. For such purpose, measurements of AgNCs diameters were randomly taken from the captured pictures. A higher AgNCs dispersity ( $3.73 \pm 0.3$  nm for 270 individual measurements, 99% confidence interval obtained with the standard normal distribution) was obtained for the synthesis at 22 °C as compared to that performed at 9 °C. In this later case, AgNCs with an average diameter of  $2.64 \pm 0.1$  nm for 270 individual measurements (99% confidence interval obtained with the standard normal distribution) was obtained. This confirms the positive role of lower reaction rates (i.e., lower temperature) in the synthesis of AgNCs with lower polydispersity.

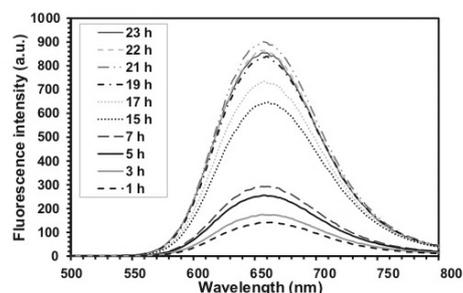
The diameter of the AgNCs synthesized with the selected procedure (i.e., 9 °C, 21 h and 150 mM  $\text{NaBH}_4$ ) was determined by HR-TEM. Figure 3a depicts the image, obtaining a value of  $2.9 \pm 0.1$  nm (99% confidence interval obtained with

**Fig. 1** Effect of  $\text{NaBH}_4$  concentration on the fluorescence intensity of the synthesized AgNCs. Concentrations of the rest of the precursor reagents were kept constant (excitation wavelength: 430 nm). The synthesis was carried out during 15 h at  $9^\circ\text{C}$



the standard normal distribution) through measurement of 270 individual AgNCs. This corresponds to an AgNC volume of  $12.90 \text{ nm}^3$  (considering that the nanostructure is spherical). In addition, a face-centered cubic crystalline structure of the material was observed (Fig. 3b) by the pattern of selected area electron diffraction (SAED). Silver was found as major element by EDX. Oxygen, carbon and sulfur (attributed to the lipoic acid used as ligand) were also observed. The yield of the selected procedure for AgNCs synthesis was  $84.3 \pm 3\%$ . This value was obtained by ICP-MS, comparing the elemental silver concentration in the aqueous phase containing the purified AgNCs (digested with aqua regia) and the elemental silver concentration before starting the synthesis. On the other hand, a 14% quantum yield was obtained following the procedure explained in the Experimental section.

As can be seen in Fig. S2 (Supplementary Material), fluorescence emission showed highest intensities for neutral-slightly basic media. Fluorescence emission of the purified AgNCs was constant in dark conditions over at least a week (at room temperature or in the fridge) when stored in ultrapure water. However, when exposed to solar light (experiments were done at room temperature) the fluorescence signal after 1 h exposure was about 90% of the initial one, whereas after



**Fig. 2** Influence of synthesis reaction time on the emission spectra of AgNCs (excitation wavelength: 430 nm). Concentrations of all the precursor reagents were kept constant. The synthesis was carried out at  $9^\circ\text{C}$

6 h was about 50% (Fig. S3 in Supplementary Material). Interestingly, we have observed that when the purified AgNCs were in a solution containing an efficient scavenger of dissolved oxygen, such as  $6 \times 10^{-3} \text{ M}$  sodium sulfite [34], the AgNCs emission remained constant. Thus it is possible to confirm the photo-oxidation role in the decrease of the AgNCs fluorescence [35]. Finally, it is interesting to note that suspensions with non purified AgNCs (i.e. in the synthesis solution) have higher stability. Emission observed for those AgNCs after three months storage in the fridge is in the same order than their initial fluorescence.

For further use of the AgNCs as labels in the development of reproducible immunoassays it is required to know the AgNCs concentration in aqueous media. With this aim, the mass of each unit cell was initially calculated. A value of  $7.16 \times 10^{-22} \text{ g/cell}$  was obtained by taking into account that each unit cell contains four silver atoms. This corresponds to a unit cell volume of  $6.82 \times 10^{-23} \text{ cm}^3/\text{cell}$  ( $10.5 \text{ g cm}^{-3}$  is the silver density). Subsequently, by dividing the AgNC volume by the unit cell volume, an average value of 188 crystal lattices per AgNC is obtained, corresponding to an average of 753 atoms of silver per NC.

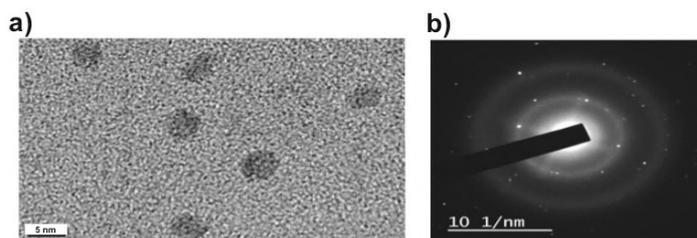
Considering the elemental silver molar concentration in the AgNCs purified liquid measured by ICP-MS, as well as the number of silver atoms per NC, an AgNCs concentration of  $6.40 \times 10^{17} \text{ NCs mL}^{-1}$  was determined.

### Labelling of the anti-CFH antibody with AgNCs

The labelling of the Ab with fluorescent AgNCs was optimized aiming at a high emission of the immunoprobe while keeping, to the best extent possible, the binding sites of the Ab. For such purpose, 1:3, 1:5, 1:7 and 1:10 M ratios of Ab:AgNCs in the labelling solution were investigated (1:3 was the lowest ratio assayed in order to have a high fluorescent signal).

A study was made by spectrophotometry to check the recognition capabilities of the Ab after being labelled with the different AgNCs ratios. Results, collected in Table 1, show that for the 1:3 ratio the absorbance was just slightly lower

**Fig. 3** Morphological characterization of AgNCs (obtained after 21 h synthesis at 9 °C, using 150 mM NaBH<sub>4</sub>). a) HR-TEM image of AgNCs, and b) SAED pattern of an AgNC



than for the unlabeled Ab (2.31 versus 2.54, respectively). However, absorbance signals for bioconjugates with higher ratios of AgNCs are much lower (for example, 1.69 with 1:10 M ratio), thus indicating that an important percentage of binding sites are no longer available. Therefore, a 1:3 Ab:AgNCs molar ratio was selected for the synthesis of the labelled Ab. The fluorescent spectrum of this immunoprobe showed a maximum emission signal at a similar wavelength that the AgNCs in solution (see Fig. S4 in Supplementary Material).

### Immunoassay for CFH determination in human serum

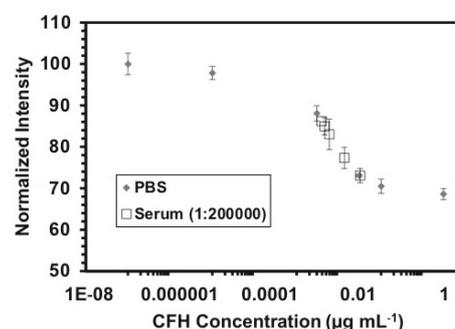
For CFH determination using the fluoroimmunoassay it was investigated a competitive format where the CFH in the sample and CFH previously immobilized compete for the anti-CFH Ab labelled with AgNCs. In the optimization of the immunoassay special care was taken with the concentration of CFH used for immobilization in wells of poly-L-lysine coated microscope slides (first step of the immunoassay procedure, as described in the Experimental section). Three concentrations of CFH solutions were evaluated for immobilization (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and calibration plots were obtained for each of them using standards of CFH prepared at different concentrations in PBS. The lowest detection limit (DL) was 0.4  $\text{ng mL}^{-1}$  and it was obtained when using 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of CFH for immobilization (Fig. 4 shows the corresponding calibration graph). Under such experimental conditions the linear range (IC20-IC80) extended from 1.16 to 23.0  $\text{ng mL}^{-1}$ . DLs and linear ranges for the other assayed

**Table 1** Absorbance measured with the ELISA immunoassay to study the influence of Ab:AgNCs molar ratio on recognition capabilities

Ab:AgNC ratio	Absorbance
Blank	0.211 $\pm$ 0.014
Ab without AgNCs	2.538 $\pm$ 0.114
1:3	2.306 $\pm$ 0.102
1:5	1.784 $\pm$ 0.057
1:7	1.752 $\pm$ 0.071
1:10	1.689 $\pm$ 0.076

conditions are collected in Table S1 (Supplementary Material). The DL achieved with the current method (using 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  CFH for immobilization) competes favorably with DLs previously reported for CFH determination: a DL of 4.86  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was established for an immunonephelometric assay [36], DLs of 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 10  $\text{ng mL}^{-1}$  were found for two ELISA immunoassays [37, 38], while the DL of the commercial kit is 2.15  $\text{ng mL}^{-1}$ .

The AgNCs-based fluoroimmunoassay was investigated for the determination of CFH in human serum. A 1:200000 dilution of the sera with PBS was carried out to fit CFH levels in serum samples within the linear range. In order to evaluate the effect of the serum matrix, known CFH concentrations were added to the diluted serum sample denoted as SA. Figure 4 collects data (marked as clean squares in the calibration graph) obtained for the diluted SA sample and for spiked aliquots where CFH at different concentrations were added to the diluted SA human serum. As it is shown, such spiked serum aliquots fit into the calibration plot obtained for the CFH standards. Therefore, it is possible to quantify CFH in diluted serum samples by using a calibration plot made in PBS. Furthermore, the recovery percentage was calculated, obtaining a value of 80.9%.



**Fig. 4** Calibration plot of the fluoroimmunoassay for CFH standards and for a serum sample spiked with different concentrations of CFH (1:200000 serum dilution), using 430 nm as excitation wavelength and measuring the emission at 660 nm

CFH concentrations in human serum samples obtained with the fluoroimmunoassay using AgNCs as labels are presented in Table S2. In addition, Table S2 shows the CFH figures obtained for the same serum samples analyzed with a commercial kit for CFH determination, proving the applicability of the methodology here developed.

## Conclusions

Fluorescent AgNCs synthesized in our laboratory have been thoroughly studied (in terms of synthesis yield, dispersity, silver atoms per NC and AgNCs concentration in aqueous media) and have been used as labels of Anti-CFH Ab. The Ab labelling procedure with AgNCs was investigated to find an optimum Ab:AgNC ratio in terms of Ab recognition capabilities and fluorescence. The use of the well-known carbodiimide crosslinker for Ab labelling points out to the universal use of the AgNCs as a label for other antibodies.

The analytical performance of the immunoassay with AgNCs labels showed a better detection limit ( $0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ ) than that achieved by current commercial ELISA kits ( $2.15 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Its applicability was successfully demonstrated for the determination of CFH in human serum as a proof of concept. The low detection limit points out to a further use of this immunoprobe for the analysis of other type of biological samples with lower CFH concentrations or smaller sample volumes (e.g., drusen, ocular fluids and cells).

In addition, it should be highlighted that the development of this type of metallic small labels and their bioconjugation is also of further interest to achieve highly sensitive and multiplexed determinations of proteins by ICP-MS detection. This fact can be mainly attributed to the AgNCs small size (2.9 nm) and high amplification provided (753 silver atoms were found on average per NC). In addition, both sensitivity and multiplexing capabilities by ICP-MS can be increased by using NCs of enriched isotopes. Experiments in this direction are underway in our laboratory.

To finish, it should be mentioned that there can be some limitations related with further use of AgNCs as *in vivo* probes due to their potential toxicity [39, 40].

**Acknowledgements** This work was supported through project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. B. Fernandez acknowledges her contract RYC-2014-14985 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the “Ramón y Cajal Program”. The Instituto Oftalmológico Fernández-Vega and Fundación de Investigación Oftalmológica acknowledge support from “Cátedra Rafael del Pino” and from Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias (IDEPA) and FEDER (project IDE/2016/000214).

**Compliance with ethical standards** The author(s) declare that they have no competing interests.

## References

- Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137:486–495
- Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY (2012) Age-related macular degeneration. *Lancet* 379:1728–1738
- Crabb JW (2014) The proteomics of drusen. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a017194
- Wang L, Clark ME, Crossman DK, Kojima K, Messinger JD, Mobley JA, Curcio CA (2010) Abundant lipid and protein components of drusen. *PLoS One* 5:e10329
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, San Giovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J (2005) Complement factor H polymorphism in age related macular degeneration. *Science* 308:385–389
- Geerlings MJ, de Jong EK, den Hollander AI (2017) The complement system in age-related macular degeneration: a review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Mol Immunol* 84:65–76
- Triebwasser MP, Roberson ED, Yu Y, Schramm EC, Wagner EK, Raychaudhuri S, Seddon JM, Atkinson JP (2015) Rare variants in the functional domains of complement factor H are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56:6873–6878
- Geerlings MJ, Kremlitzka M, Bakker B, Nilsson SC, Saksens NT, Lechanteur YT, Pauper M, Corominas J, Fauser S, Hoyng CB, Blom AM, de Jong EK, den Hollander AI (2017) The functional effect of rare variants in complement genes on C3b degradation in patients with age-related macular degeneration. *JAMA Ophthalmol* 135:39–46
- Gemenetzi M, Lotery AJ (2016) Complement pathway biomarkers and age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 30:1–14
- Kim YH, He S, Kase S, Kitamura M, Ryan SJ, Hinton DR (2009) Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247:651–659
- Chen M, Forrester JV, Xu H (2007) Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res* 84:635–645
- Vellaisamy K, Li G, Ko CN, Zhong HJ, Fatima S, Kwan HY, Wong CY, Kwong WJ, Tan W, Leung CH, Ma DL (2018) Cell imaging of dopamine receptor using agonist labeling iridium(III) complex. *Chem Sci* 9:1119–1125
- Zhan JJ, Cheng FF, Li JJ, Zhu JJ, Lu Y (2016) Fluorescent nanoprobes for sensing and imaging of metal ions: recent advances and future perspectives. *Nano Today* 11:309–329
- Zhang L, Wang E (2014) Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* 9:132–157
- Song X-R, Goswami N, Yang H-H, Xie J (2016) Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications. *Analyst* 141:3126–3140
- Chen L-Y, Wang C-W, Yuan Z, Chang H-T (2015) Fluorescent gold nanoclusters: recent advances in sensing and imaging. *Anal Chem* 87:216–229
- Alonso MC, Trapiella-Alfonso L, Fernández JMC, Pereira 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
- Xu H, Suslick KS (2010) Water-soluble fluorescent silver nanoclusters. *Adv Mater* 22:1078–1082
- Diez I, Ras RHA (2011) Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale* 3:1963–1970

20. Luo Z, Zheng K, Xie J (2014) Engineering ultrasmall water-soluble gold and silver nanoclusters for biomedical applications. *Chem Commun* 50:5143–5155
21. Fernández-Ujados M, Trapiella-Alfonso L, Costa JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2013) One step aqueous synthesis of fluorescent copper nanoclusters by direct metal reduction. *Nanotechnology* 24:495601
22. 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
23. Chen Y, Phipps ML, Werner JH, Chakraborty S, Martinez JS (2018) DNA templated metal nanoclusters: from emergent properties to unique applications. *Acc Chem Res* 51:2756–2763
24. Yeh H-C, Shama J, Han JJ, Martinez JS, Werner JH (2010) A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization. *Nano Lett* 10:3106–3110
25. Li B, Xu L, Chen Y, Zhu W, Shen X, Zhu C, Luo J, Li X, Hong J, Zhou X (2017) Sensitive and label-free fluorescent detection of transcription factors based on DNA-ag nanoclusters molecular beacons and exonuclease III-assisted signal amplification. *Anal Chem* 89:7316–7323
26. Li J, Zhu J-J, Xu K (2014) Fluorescent metal nanoclusters: from synthesis to applications. *Trends Analyt Chem* 58:90–98
27. 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
28. Adhikari B, Banerjee A (2010) Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing. *Chem Mater* 22: 4364–4371
29. Shang L, Dörflich RM, Trouillet V, Bruns M, Nienhaus GU (2012) Ultrasmall fluorescent silver nanoclusters: protein adsorption and its effects on cellular responses. *Nano Res* 5:531–542
30. Ren SH, Liu SG, Ling Y, Li NB, Luo HQ (2018) Fluorescence detection of melamine based on inhibiting Cu<sup>2+</sup>-induced disaggregation of red-emitting silver nanoclusters. *Spectrochim Acta A* 201: 112–118
31. Shu T, Lin X, Zhou Z, Zhao D, Xue F, Zeng F, Wang J, Wang C, Su L, Zhang X (2019) Understanding stimuli-responsive oligomer shell of silver nanoclusters with aggregation-induced emission via chemical etching and their use as sensors. *Sensor Actuat B-Chem* 286:198–205
32. Rogers AB, Cormier KS, Fox JG (2006) Thiol-reactive compounds prevent nonspecific antibody binding in immunohistochemistry. *Lab Invest* 86:526–533
33. Yu Y, Yao Q, Luo Z, Yuan X, Lee JY, Xie J (2013) Precursor engineering and controlled conversion for the synthesis of monodisperse thiolate-protected metal nanoclusters. *Nanoscale* 5:4606–4620
34. Garcia MED, Sanz-Medel A (1986) Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence. *Anal Chem* 58:1436–1440
35. Trapiella-Alfonso L, Menéndez-Miranda M, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2014) Nanostructural transformations of silver nanoclusters occurring during their synthesis and after interaction with UV-light. *Mater Res Express* 1:015039
36. Sofat R, Mangione PP, Gallimore JR, Hakobyan S, Hughes TR, Shah T, Goodship T, D'Aiuto F, Langenberg C, Warcham N, Morgan BP, Pepys MB, Hingorani AD (2013) Distribution and determinants of circulating complement factor H concentration determined by a high-throughput immunonephelometric assay. *J Immunol Methods* 390:63–73
37. Hakobyan S, Harris CL, Tortajada A, Goicochea de Jorge E, García-Layana A, Fernández-Robredo P, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP (2008) Measurement of factor H variants in plasma using variant-specific monoclonal antibodies: application to assessing risk of age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1983–1990
38. Hakobyan S, Tortajada A, Harris CL, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP (2010) Variant-specific quantification of factor H in plasma reveals null alleles associated with a typical hemolytic urmic syndrome. *Kidney Int* 78:782–788
39. Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K (2018) Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol* 31:73–80
40. Zhang L, Goswami N, Xie J, Zhang B, He Y (2017) Unraveling the molecular mechanism of photosynthetic toxicity of highly fluorescent silver nanoclusters to *Scenedesmus obliquus*. *Sci Rep* 7:16432 (12pp)

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Electronic Supporting Material on the Microchimica Acta  
publication entitled  
FLUORESCENT SILVER NANOCCLUSERS AS  
ANTIBODY LABEL IN A COMPETITIVE  
IMMUNOASSAY FOR THE COMPLEMENT  
FACTOR H**

**Eva Valencia<sup>1</sup>, María Cruz-Alonso<sup>1</sup>, Lydia Álvarez<sup>2</sup>, Héctor González-  
Iglesias<sup>\*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, University of Oviedo, Julian  
Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

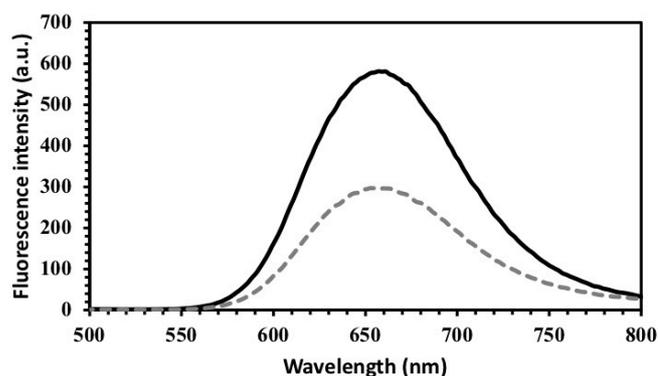
<sup>2</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega (Fundación de Investigación  
Oftalmológica, Universidad de Oviedo), Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012  
Oviedo, Spain.

<sup>3</sup>Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012  
Oviedo, Spain.

## Results and discussion

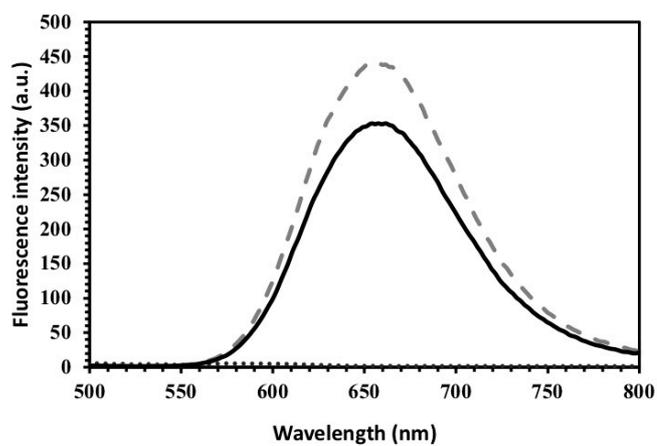
### Optimization of the synthesis of AgNCs and characterization

To evaluate the effect of the synthesis temperature, two conditions were investigated: 9 °C and 22 °C. Fig. S1 shows that, due to the higher reaction rate at high temperature, the fluorescence intensity reached higher values for the synthesis at 22 °C as compared to 9 °C for the same short synthesis time

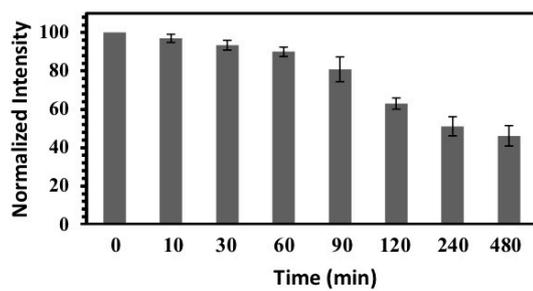


**Fig. S1.** Fluorescence comparison of AgNCs synthesized at 9 °C (dotted gray line) and 22 °C (black line). The syntheses were carried out with 50 mM NaBH<sub>4</sub> and the reactions were stopped after 15 h.

In order to evaluate the pH effect on the AgNCs fluorescence intensity as well as the stability of synthesized AgNCs in ultrapure water, emission of AgNCs was evaluated at different pHs (Fig. S2) and its stability was studied along 480 min (Fig. S3). As can be observed, fluorescence emission showed highest intensities for neutral-slightly basic media as compared to acid media. Additionally, although fluorescence emission of the purified AgNCs was constant in dark conditions over at least a week, the fluorescence signal after 1 h exposure to solar light was about 90% of the initial one. However, as it is depicted in Fig. S3, fluorescence signal decayed up to about 50% after 6 h exposure.



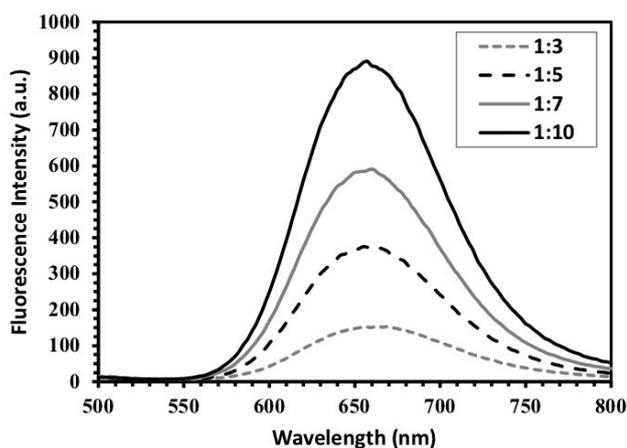
**Fig. S2.** Emission spectra of AgNCs at different pHs: pH 12 (dotted gray line), pH 7.5 (continuous black line) and pH 4.8 (dotted black line).



**Fig. S3.** Study of AgNCs photostability in ultrapure water exposed to day ambient light and room temperature.

### Labelling of the anti-CFH antibody with AgNCs

Fig. S4 collects the emission spectra of AgNCs immunoprobe using different anti-CFH Ab:AgNCs molar ratios, specifically 1:3, 1:5, 1:7 and 1:10. As it is depicted in Fig. S4, the higher the Ab:AgNCs ratio, the higher the fluorescence intensity.



**Fig. S4.** Emission spectra of 1:3, 1:5, 1:7 and 1:10 ratios of “anti-CFH Ab:AgNCs” added to the solution for the preparation of the bioconjugate.

### Immunoassay for CFH determination in human serum

For CFH determination using the AgNCs fluoroimmunoprobe it was investigated a competitive format where the CFH in the sample and CFH previously immobilized compete for the anti-CFH Ab labelled with AgNCs. Three concentrations of CFH solutions were evaluated for immobilization ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and calibration plots were obtained for each of them using standards of CFH prepared at different concentrations in PBS. Table S1 shows detection limits and linear ranges obtained for the three concentrations assayed.

**Table S1.** Comparison of detection limits and linear ranges obtained using different concentrations of CFH for immobilization in poly-L-lysine coated microscope slides.

<b>Concentration of CFH for immobilization (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Detection limit (<math>\text{ng mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Linear range IC20-IC80 (<math>\text{ng mL}^{-1}</math>)</b>
<b>5</b>	0.4	1.16 – 23.0
<b>10</b>	5.3	11.8 – 180.2
<b>20</b>	13.2	30.2 – 194.4

On the other hand, CFH concentrations in human serum samples were determined using the AgNCs fluoroimmunoassay as label. Table S2 shows the CFH concentrations obtained both using the AgNCs competitive immunoassay and a commercial kit for CFH determination.

**Table S2.** Determination of CFH in human sera by the AgNCs immunoassay procedure. Results are compared with those achieved with a commercial ELISA kit. In both methods uncertainties represent the standard deviations of the mean of three independent measurements.

<b>Sample reference</b>	<b>AgNCs competitive immunoassay (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Commercial kit (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
<b>SA</b>	608 $\pm$ 52	702 $\pm$ 76
<b>SB</b>	1494 $\pm$ 90	1374 $\pm$ 53
<b>SC</b>	944 $\pm$ 64	935 $\pm$ 91

**Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence  
microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and  
isotopically enriched silver nanoclusters**

Eva Valencia, Beatriz Fernández, María Cruz-Alonso, Montserrat García,  
Héctor González-Iglesias, Maria Teresa Fernández-Abedul, Rosario Pereiro

*Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35(9), 1868-1879

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 1868

## Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters

 Eva Valencia,<sup>a</sup> Beatriz Fernández,<sup>ab</sup> María Cruz-Alonso,<sup>a</sup> Montserrat García,<sup>bc</sup> Héctor González-Iglesias,<sup>abc</sup> María Teresa Fernández-Abedul<sup>a</sup> and Rosario Pereiro<sup>ab</sup>

Small water soluble silver nanoclusters (AgNCs) were synthesized either using silver of natural isotopic composition or isotopically enriched silver (<sup>nat</sup>AgNCs and <sup>109</sup>AgNCs) and employed as labels for specific protein bioimaging. Both types of AgNCs emit a strong fluorescence at 660 nm. Distributions, independently and simultaneously, of metallothioneins 1 and 2 (MT1/2) and superoxide dismutase 1 (SOD1) in human retinal layers from 5 μm thick ocular tissue sections of *post-mortem* donors were investigated as a proof of concept. For such a purpose, anti-MT1/2 and anti-SOD1 were respectively labelled with <sup>nat</sup>AgNCs and <sup>109</sup>AgNCs, and an immunohistochemical protocol was developed. Detection was carried out by fluorescence microscopy and laser ablation (LA) coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). In the case of fluorescence microscopy, a high autofluorescence signal was observed at the outer segments of photoreceptors within the retina thus limiting the analytical information in such a region. Additionally, since both types of AgNCs emit at the same wavelength it was not possible to obtain the simultaneous distribution of both proteins by fluorescence microscopy. However, simultaneous specific bioimaging of the two proteins at the same tissue section was possible using both types of AgNCs as labels combined with ICP-MS detection. For such a purpose, the potential of an isotope pattern deconvolution mathematical tool in combination with LA-ICP-MS was successfully evaluated.

Received 25th October 2019  
Accepted 31st January 2020

DOI: 10.1039/c9ja00365g

rsc.li/jaas

### Introduction

Over the last few years, noble metal nanoparticles (NPs) with diameters between 5 and 100 nm have been the subject of intense research because of their use in various fields, such as materials, environmental, or biological sciences.<sup>1,2</sup> Considering biological applications, special attention has been paid to the development of assays capable of specific biomolecule analysis.<sup>3</sup> In particular, gold nanoparticles (AuNPs) possess interesting properties and have been widely investigated as promising tools for medical studies.<sup>1</sup> There are fewer reports on the use of silver-based labels, but they have also been explored either as silver NPs (AgNPs) or in combination with Au as

bimetallic NPs.<sup>4–6</sup> Furthermore, metal nanoclusters (NCs), a class of small particles with diameters below 3 nm and consisting of a few to several hundreds of metal atoms, have gained attention owing to their potential applications as fluorescent labels.<sup>7–9</sup>

In addition to the optical properties, NPs and NCs have been investigated as elemental labels for detection of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).<sup>10–13</sup> Labels with many atoms of a given metal allow high signal amplification for the detection of the corresponding biomolecule. Lores-Padin *et al.*<sup>13</sup> have recently reported the application of PtNCs as bimodal labels for quantitative immunoassays by fluorescence and ICP-MS. The great amplification achieved by the combination of PtNCs and ICP-MS detection allowed a limit of detection (LOD) of 0.08 ng mL<sup>-1</sup> to be reached for immunoglobulin E in human serum.

Laser ablation (LA) coupled to ICP-MS offers interesting capabilities for direct elemental solid analysis, including spatial resolution in the low micrometer range and limits of detection down to ng g<sup>-1</sup>.<sup>14</sup> Bioimaging of specific biomolecules can be achieved by combining element-labelled antibodies (Ab) and

<sup>a</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: fernandezbeatriz@uniovi.es; h.gonzalez@fio.as; Tel: +34 985 10 3524; +34 985 24 0141

<sup>b</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega (Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Vega, Universidad de Oviedo), Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Spain

<sup>c</sup>Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Dres. Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Spain

LA-ICP-MS.<sup>15,16</sup> Most of the studies carried out in this area are related to the use of single metal chelates coordinated with lanthanides (*e.g.*, using DOTA or DTPA chelating reagents) or the use of commercial polymeric tags containing several metal chelates (*e.g.*, MAXPAR™).<sup>15</sup> Bioimaging with LA-ICP-MS has shown a burgeoning interest in life sciences to achieve a deeper understanding of the role of metals and biomolecules. The use of NPs as elemental labels for LA-ICP-MS analysis in tissue sections has been first reported by Seuma *et al.*<sup>17</sup> A sandwich immunoassay method was developed to detect two breast cancer-associated proteins (MUC-1 and HER2) using a secondary Ab labelled with AuNPs (5 nm). In the study, Ag staining was proposed for sensitivity enhancement, immersing the sections in Ag solution for 5 min before mounting on the slide.

From such pioneering work, some strategies have been proposed for signal amplification and sensitive detection of proteins in biological tissues using AuNPs.<sup>18–21</sup> Tvrdonova *et al.*<sup>21</sup> described the labelling of Abs with AuNPs (10 nm and 60 nm) in dot blot experiments. Although the sensitivity with AuNP labelling was up to 4 orders of magnitude higher in comparison to MeCAT, it showed a higher background level due to non-specific interactions of AuNPs. On the other hand, we have recently proposed the use of AuNCs (2.7 nm (ref. 22) or 2.2 nm (ref. 23)) as elemental labels for quantitative imaging of proteins by LA-ICP-MS in human tissues. Immunohistochemical (IHC) procedures based on the use of AuNCs bioconjugated with the specific primary Ab *via* carbodiimide cross-linking were performed for the specific localization of metallothioneins 1 and 2 (MT1/2) in the human retina<sup>22</sup> and ferroportin in the hippocampus region of human brain<sup>23</sup> tissue sections. Advantages brought about by the use of small metal NCs *versus* metal NPs include less risk of blocking the Ab epitopes during the labelling process as well as possibilities for bimodal detection (fluorescence and MS).

Combination of IHC and LA-ICP-MS measurements has great potential for the simultaneous bioimaging of several proteins due to the excellent isotopic spectral resolution of the mass spectrometer. Here, the high multiplexing capabilities reported by the combination of LA to ICP-time of flight MS<sup>24</sup> with metal tags in polymeric labels must be highlighted, permitting concurrent analysis of more than 30 biomolecules on a single sample. The main limitations reported for LA-ICP-time of flight MS (apart from the high cost of this instrumentation) are the difficulties to get enough amplification with polymeric labels, high signal backgrounds due to non-specific absorption, and difficulties to get quantitative information. Higher amplification can be expected by using NP and NC labels (because of large quantity of detectable atoms in each tag). In addition, a more efficient labelling is expected due to the smaller size of NPs and NCs compared to single metal chelates or polymer tags. However, studies for simultaneous analysis of biomolecules with such labels are still scarce. Paul *et al.*<sup>18</sup> employed AuNPs and Yb-tagged tyrosine hydroxylase Ab to assess localization of dopamine in mouse brain sections; nevertheless, different tissue sections were investigated with each label.

Capabilities of fluorescent AgNCs as labels for the bioimaging of specific proteins by fluorescence microscopy and LA-ICP-MS detection are presented here. Considering that natural Ag is constituted of two stable isotopes, naturally abundant AgNCs and isotopically enriched AgNCs were investigated as labels of two primary Abs for the detection of two proteins (MT1/2 and superoxide dismutase 1 (SOD1)) in the human retina of eyes from *post-mortem* donors. The mammalian retina consists of several cell types arranged in a highly organized manner forming distinct layers of a few micrometers each; therefore, this complex tissue is ideal for bioimaging studies. So far, the synthesis of isotopically enriched AgNPs was reported in several studies mainly for tracing studies in the environmental field,<sup>25–28</sup> but neither AgNPs nor AgNCs were previously reported as labels for LA-ICP-MS bioimaging. As a proof of concept, in the present work, the bioconjugation of naturally abundant and isotopically enriched AgNCs will allow us to study two proteins following the same NC synthesis protocol and to carry out simultaneous imaging of two proteins in the same tissue section by LA-ICP-MS.

## Experimental

### Reagents and materials

AgNCs of natural isotopic composition (<sup>nat</sup>AgNCs) were synthesized with AgNO<sub>3</sub> (99.9% crystalline; Alfa Aesar, Thermo Fisher, Kandel, Germany), lipoic acid (>98% powder; Acros Organics, Geel, Belgium) and NaOH (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) and NaBH<sub>4</sub> (>98% powder, Sigma-Aldrich). In the case of isotopically enriched AgNCs (<sup>109</sup>AgNCs), the same reagents were employed except the metal precursor. Specifically, isotopically enriched Ag (<sup>109</sup>Ag enriched at 99.9% isotope abundance) in metal nitrate form (solid) was purchased from ISC Science SL (Oviedo, Spain).

Immunoassays were carried out with two primary Ab: <sup>nat</sup>AgNCs were bioconjugated to mouse monoclonal anti-MT1/2 Ab (Abcam, Cambridge, UK) and <sup>109</sup>AgNCs to rabbit polyclonal anti-SOD1 Ab (Abcam). During such processes, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (98% powder; Acros Organics), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (>98% powder; Sigma-Aldrich), Tris base (>99%; Sigma-Aldrich), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Panreac, Barcelona, Spain) and L-glutathione reduced (>98%; Sigma-Aldrich) were employed. For purification purposes, 3 and 100 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) were used.

Additionally, non-specific interactions of AgNC bioconjugates with the tissues were minimized with hydroxylamine hydrochloride (≥99% powder; Sigma-Aldrich). Also, Chelex 100 resin (Na form, 100–200 dry mesh) from Bio-Rad Laboratories (California, USA) was employed to remove silver ions in chemical reagents. The resin was first converted to its acid form by treatment with 2 M hydrochloric acid (under mechanical stirring for 2 h) and subsequently was rinsed with ultrapure water to eliminate the excess of acid and air-dried.

ELISA microtitration plates (96 well; Thermo Fisher Scientific) were used to evaluate the recognition capabilities of the Ab

labeled with AgNCs. A polyclonal anti-goat IgG labeled with horseradish peroxidase (whole molecule, produced in rabbit; Sigma-Aldrich) and a TMB substrate kit (Thermo Fisher Scientific) were employed in such studies.

During the IHC protocol with the human eye tissue sections, ammonium chloride (99%, Panreac) was employed to reduce autofluorescence and Triton X-100 (Sigma-Aldrich) was used to permeabilize the tissue and assist the penetration of the Ab. Goat serum (Sigma-Aldrich) and bovine serum albumin (BSA) (99% powder; Sigma-Aldrich) acted as blocking agents. Washing steps were carried out with phosphate buffered saline solution (10 mM PBS) from Sigma-Aldrich. For the analysis of tissue sections by fluorescence, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Thermo Fisher) was used to stain the cell nucleus. Mounting media specific for fluorescence detection (Agilent Technologies) were also employed to protect the tissue and maintain the signal during microscopy visualization.

For the characterization of AgNCs in solution (determination of Ag concentration) by conventional nebulization ICP-MS, HNO<sub>3</sub> (65% VWR International, Pennsylvania, USA) with a 5% (v/v) concentration was added to the AgNCs followed by 15 min sonication. Pure standard solutions of Ag (Fluka, Merck Millipore, Massachusetts, USA) and Rh (Certipur, Merck Millipore) were employed for external calibration to determine total elemental Ag concentration in AgNCs (Rh was the internal standard). Sequential dilutions were performed with AgNC solutions to determine the Ag concentration by ICP-MS. For normalization of LA-ICP-MS measurements, laboratory standards were prepared from Ag pure standard solutions (1000 µg g<sup>-1</sup>) and gelatin (Merck). Deionized ultrapure water, resistivity 18.2 MΩ cm (Purelab Flex 3&4, ELGA-Veolia, UK) was used for preparing all solutions.

#### Collection of human eyes from *post-mortem* donors

For bioimaging analysis, human eye globes from adult donors without any signs of relevant ocular pathologies were obtained 24 h *post-mortem* through the National Disease Research Interchange (Philadelphia, USA). The samples were formalin-fixed and paraffin-embedded following conventional protocols. The procedures adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. Fluorescence and LA-ICP-MS measurements were carried out with 5 µm thick ocular tissue sections, which were placed in FLEX-coated microscope slides (IHC microscope slides, Agilent Technologies, USA). Deparaffinization was done with xylol and ethanol (Sigma-Aldrich).

#### Instrumentation

A double focusing magnetic sector field ICP-MS (Element 2, Thermo Fisher Scientific) was employed for conventional nebulization and LA-ICP-MS analyses, operating in low mass resolution mode. Setting experimental parameters were daily optimized using a multi-element standard solution to get the best signal-to-noise ratio with minimal oxide-formation contribution.

LA sampling was carried out using a LSX-213 system from Teledyne Cetac Technologies (Omaha, USA) coupled to the ICP-MS. The commercial ablation chamber of the system was

replaced by a Peltier-cooled chamber that allows working at low temperature (−20 °C).<sup>29</sup> Although He was the carrier gas selected to transport the laser-generated aerosol out of the ablation chamber, an additional flow rate of Ar was used to transport the particles to the ICP-MS (He and Ar gases were mixed using an internal connection located after the ablation chamber). LA-ICP-MS coupling was daily optimized with the SRM NIST 612 glass standard in terms of sensitivity, background signal, and <sup>238</sup>U<sup>+</sup>/<sup>232</sup>Th<sup>+</sup> signal ratios. Moreover, the <sup>248</sup>ThO<sup>+</sup>/<sup>232</sup>Th<sup>+</sup> signal ratio was monitored to control oxide formation, being always below 0.5% under the optimized conditions. Additionally, a careful optimization of laser parameters (*i.e.*, fluence, repetition rate, laser spot diameter and scan speed) as well as the He and Ar flow rates was performed in terms of lateral resolution, sensitivity and stability of the signals. Ocular tissue sections were completely ablated line by line under the LA-ICP-MS conditions summarized in Table 1.

Fluorescence of <sup>nat</sup>AgNCs and <sup>109</sup>AgNCs in solution was measured with a spectrofluorometer (LS-50-B, PerkinElmer, Massachusetts, USA) and Hellma® semi Micro fluorescence cuvettes with Suprasil® quartz windows (Sigma-Aldrich). A minicentrifuge (Gyrozen, Daejeon, South Korea) and a Leica DM600 microscope with a DFC 310 Fx digital color camera (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) were also used. Fluorescence images of AgNCs in tissue sections were obtained with a laser confocal microscope (DM IRE2 model; Leica, Wetzlar, Germany) with 20× and 40× oil immersion objectives. The laser excitation line selected for bioconjugate and DAPI measurements was 405 nm.

**Table 1** Operating conditions of laser ablation and ICP-MS instruments for the analysis of ocular tissue sections by LA-ICP-MS

ICP-MS	Thermo Fisher Scientific (element 2)
RF power	1280 W
Cooling gas	15 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas	1.1 L min <sup>-1</sup>
Nebuliser gas (solution)	1.1 L min <sup>-1</sup>
Isotopes (solution)	<sup>103</sup> Rh, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag
Isotopes (imaging)	<sup>103</sup> Rh, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag
Sample time	0.01 s
Mode	Low resolution ( <i>m/Δm</i> ~ 300)
Samples per peak	30
LA system	Teledyne Cetac Technologies (LSX-213)
Fluence	30 J cm <sup>-2</sup>
Repetition rate	20 Hz
Spot diameter	10 µm
Scan speed	5 µm s <sup>-1</sup>
Ablation mode	Line by line
Carrier gas	
He (ablation chamber)	1.0 L min <sup>-1</sup>
Ar	0.7 L min <sup>-1</sup>
Temperature of the tissue (Peltier-cooled chamber)	−20 °C

Image processing both for fluorescence microscopy and LA-ICP-MS measurements was performed with ImageJ-Fiji software (National Institute of Health, USA). For LA-ICP-MS imaging, the gas blank contribution was subtracted from the raw intensity signals to work with net intensities in counts per second (cps).

#### Synthesis and bioconjugation of naturally abundant and isotopically enriched AgNCs

The synthesis of  $^{nat}$ AgNCs was carried out following an approach previously described.<sup>30</sup> The synthesis protocol for the isotopically enriched  $^{109}$ AgNCs was exactly the same but using  $^{109}$ AgNO<sub>3</sub> as the metal precursor. Briefly, 81 mg of lipoic acid were dissolved in 20 mL of ultrapure water together with 240  $\mu$ L of 2 M NaOH and 1 mL of an aqueous solution of  $\sim$ 25 mM  $^{109}$ AgNO<sub>3</sub> in a vial protected from light. Afterwards, 2 mL of a 150 mM NaBH<sub>4</sub> solution was added and reaction was kept under stirring at 9 °C for 21 h. Purification of AgNCs was carried out by ultrafiltration (3 kDa pore size Amicon ultra centrifugal filter units) to eliminate the excess of ligands and reducing agents. For such a purpose, the following sequence was performed: (i) cycle at 6500 rpm for 10 min, (ii) three washing steps with ultrapure water at 6500 rpm for 10 min, and (iii) cycle of volume reduction at 6500 rpm for 5 min. Finally,  $^{nat}$ AgNCs or  $^{109}$ AgNCs in the filters were restored to a volume equal to the initial one and such purified solutions were stored separately in a fridge (4 °C).

The corresponding Ab was labelled with AgNCs ( $^{nat}$ AgNCs and  $^{109}$ AgNCs) through the carbodiimide cross-linking method.<sup>30</sup> In an Eppendorf tube under constant stirring and at room temperature, 100  $\mu$ L of the anti-MT1/2 Ab (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) or 100  $\mu$ L of anti-SOD1 Ab (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) were respectively introduced with 188  $\mu$ L of  $^{nat}$ AgNCs or  $^{109}$ AgNCs in a solution of Tris-EDTA with 3 mM glutathione (*i.e.*, anti-MT1/2 :  $^{nat}$ AgNC and anti-SOD1 :  $^{109}$ AgNC bioconjugates). In such a way, resulting molar ratios of Ab : AgNC were found to be 1 : 3. Next, a solution of EDC and NHS (0.01 M) was added in a Tris-EDTA buffer in the molar ratio 1 : 1. Finally, the surface of the AgNCs was blocked with hydroxylamine hydrochloride to avoid non-specific interactions of  $^{nat}$ AgNCs and  $^{109}$ AgNCs with the tissue. Anti-MT1/2 :  $^{nat}$ AgNCs and anti-SOD1 :  $^{109}$ AgNCs were separately incubated with hydroxylamine hydrochloride (1 : 20, 1 : 50 and 1 : 100 molar ratios were investigated). Next, after 2 h of stirring at room temperature, bioconjugate (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> Ab concentrations) purification was carried out by ultracentrifugation using 100 kDa pore size Amicon. The purified bioconjugate solutions were stored separately in a refrigerator under dark conditions.

The ratio between the AgNC label and the Ab (anti-MT1/2) in the immunoprobe was optimized through a spectrophotometric immunoassay, using a secondary Ab labelled with horseradish peroxidase. Additionally, it was investigated if the recognition capabilities of the Ab : AgNC bioconjugate are retained after the hydroxylamine-hydrochloride treatment. For such a purpose, MT1/2 was immobilized (100  $\mu$ L per well of 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> MT1/2) in an ELISA plate and incubated for 6 h at 38 °C. Then, the excess protein solution was removed and 200  $\mu$ L per well of 2% BSA solution in 10 mM PBS (pH 7.4) was added to block the

empty places in the well (the plate was incubated at 4 °C overnight). Next, 100  $\mu$ L per well of the anti-MT1/2 (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was added and kept for 2 h at 38 °C. In this step, the Ab labelled with different molar ratios of  $^{nat}$ AgNCs (with and without treatment with hydroxylamine-hydrochloride, in a 1 : 20 molar ratio bioconjugate : hydroxylamine) was employed. After washing with 0.05% PBS-Tween 20, 100  $\mu$ L per well of the anti-goat IgG peroxidase-labelled Ab (diluted 1 : 10 000 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  $\mu$ L per well of the TMB kit. The enzymatic reaction was stopped with 2 M sulfuric acid (100  $\mu$ L per well) and detected in an absorbance plate reader ( $\lambda = 450$  nm).

#### Immunoassay protocol for fluorescence and LA-ICP-MS bioimaging

The IHC procedure for the bioimaging of MT1/2 and SOD1 proteins was developed in human eye tissue sections (5  $\mu$ m thick) from formalin-fixed and paraffin-embedded blocks deposited on FLEX coated microscope slides. Each slide was introduced in xylol for paraffin removal and then it was rehydrated using ethanol in a decreasing graded alcohol series. Next, washing steps with Milli-Q water and PBS (10 mM, pH 7.3) were carried out. Ammonium chloride (0.5 M) in PBS (0.1% BSA) was added for 15 min, followed by another washing step with PBS. Subsequently, incubation with Triton X-100 (0.1%) in PBS was performed for 5 min. A further washing step with PBS was necessary and then a tissue blocking step was done using PBS and 0.1% BSA + 10% goat serum for 30 min.

After such washing and blocking steps, Ab labelled with  $^{nat}$ AgNCs or  $^{109}$ AgNCs (anti-MT1/2 :  $^{nat}$ AgNC or anti-SOD1 :  $^{109}$ AgNC bioconjugates, 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was added into the tissue and incubated at 4 °C overnight. Such a stage of the protocol was carried out in darkness due to the light sensitivity of AgNCs. After the incubation of the tissue with  $^{nat}$ AgNC or  $^{109}$ AgNC bioconjugates, a washing PBS step was done and the staining of the cell nucleus using a solution of DAPI (0.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was performed (10 min at room temperature in darkness). Finally, the slide was washed with PBS, and the mounting medium and a coverslip were added. Tissue sections were dried for 1 h at room temperature and they were stored at -20 °C. After fluorescence measurement, the coverslip was removed and the analysis by LA-ICP-MS was subsequently carried out in the same tissue section. Possible sensitivity drift of the LA-ICP-MS system was corrected by measuring a gelatin standard (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of Ag) before and after each tissue section.

For the simultaneous analysis of MT1/2 and SOD1 in the same tissue section, the same volume of the two bioconjugates ( $\sim$ 100  $\mu$ L) was mixed and subsequently added to the tissue following the above described IHC protocol.

## Results and discussion

### Synthesis of isotopically enriched AgNCs

In a previous study, the synthesis of fluorescent AgNCs (excitation/emission maxima at 430/660 nm) and their use as

labels has been described for the analysis of the complement factor H in liquid samples (human serum) by a fluoroimmunoassay.<sup>30</sup> In the present work, naturally abundant AgNCs are investigated as potential labels for bioimaging of proteins by fluorescence and LA-ICP-MS detection in ocular tissue sections. Additionally, the synthesis of stable isotopically enriched AgNCs (<sup>109</sup>AgNCs) was also investigated. In such a way, it would be possible to increase the number of available labels using a similar preparation procedure, which is of interest considering that the synthesis of new and fit for purpose metal-NCs and their characterization are tedious and time consuming processes. Fig. 1 shows the fluorescence spectrum obtained for the isotopically enriched <sup>109</sup>AgNCs and the <sup>natural</sup>AgNCs. As can be observed, the emission spectra present a maximum at 660 nm and the fluorescence intensity was similar to that obtained for the <sup>natural</sup>AgNCs (the grey line shows the emission spectra obtained using <sup>natural</sup>AgNO<sub>3</sub> for the synthesis).

Characterization of <sup>natural</sup>AgNCs was previously performed by high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) and ICP-MS.<sup>30</sup> The average diameter of the AgNCs was found to be  $2.9 \pm 0.10$  nm ( $n = 270$ , 99% confidence interval obtained with the standard normal distribution), measured by HR-TEM. Additionally, determination of the Ag concentration by ICP-MS combined with the size, geometry and crystal structure of AgNCs showed that each NC is composed of 753 atoms of Ag on average. Considering isotopically enriched AgNCs, <sup>109</sup>AgNC solution was characterized both for isotope abundances and concentration by ICP-MS. The isotope abundances of the <sup>109</sup>AgNCs were found to be 99.7% <sup>109</sup>Ag and 0.3% <sup>107</sup>Ag. Therefore, it can be stated that the isotope enrichment practically remained constant compared to the metal precursor employed for the synthesis (99.9% <sup>109</sup>AgNO<sub>3</sub>). The Ag concentration of the <sup>109</sup>AgNC solution (necessary for the reproducible bioconjugation with the Ab) was obtained by reverse isotope dilution analysis using a naturally abundant Ag standard solution. Ag concentration in the <sup>109</sup>AgNC solution was found to be  $1.54 \pm 0.07$  mM. As described in the Experimental section, the optimum molar ratio between the Ab and the AgNCs was 1 : 3, as a compromise between maintaining the recognition

capabilities of the Ab and achieving high fluorescence intensity of the labelled immunoprobe.

#### Optimization of the IHC protocol for specific protein detection in tissue sections using AgNC labels

Silver staining is a well-known protocol in histological characterization, diagnostic microbiology and genomic and proteomic analyses of biological samples. It is typically a sensitive procedure to detect trace amounts of biomolecules in gels, *in vitro* cells or tissue sections. The basis of silver staining consists of the reduction of ionic Ag in basic media, producing deposits of metallic Ag at the site of reduction. AgNCs are proposed in the present work as fluorescence and elemental labels for protein detection in biological tissue sections and, therefore, special attention was paid to avoid non-specific interactions of AgNCs with the tissues. Furthermore, taking into account that we also propose the use of naturally abundant and isotopically enriched AgNCs as potential protein labels for MS detection; possible contamination of tissue sections with naturally abundant Ag from the chemicals employed in the antibody's labelling and IHC protocols was studied.

Aliquots from the different solutions required for bioconjugation of <sup>natural</sup>AgNCs with anti-MT1/2 as well as during the IHC procedure in human ocular tissues (*i.e.*, Tris-EDTA, glutathione, EDC-NHS and PBS) were measured by conventional nebulization ICP-MS. <sup>107</sup>Ag signal intensity was detected for all the solutions, ranging from 200 cps for 0.01 M EDC-NHS to 62 000 cps for 1 mM Tris-EDTA. Experimental results make evident that such solutions contain Ag and, thus, it can severely interfere the study of protein distribution in biological tissues using AgNC labels. In the case of fluorescence microscopy, the images obtained for the protein distribution will not be affected by Ag contamination since the signal is related to AgNC emission. However, imaging of proteins by ICP-MS detection can be hampered due to a high Ag background. In this vein, in order to reduce Ag contamination from chemical reagents, the Chelex-100 chelating resin has been applied.<sup>31</sup> Chemical reagents used for bioconjugation and IHC protocols were treated with the resin as a sorption method to eliminate their Ag content. 0.2 g of dry resin were added to 10 mL solutions and subjected to magnetic stirring for 7 h. Then, the resin was separated by filtration through porous glass and the solutions measured again by ICP-MS. The experimental results showed that Ag was retained by the resin and its content in the solutions was significantly reduced up to 80% (60–80% signal decrease was observed depending on the solutions' pH). The Ag contribution of the chemicals to the tissue sections after the resin treatment and after the different washing steps performed with the tissues can be considered negligible: using the cleaned reagents the <sup>107</sup>Ag signal intensity from the tissue measured by LA-ICP-MS was not distinguished from the <sup>107</sup>Ag signal of He carrier gas or background (in the range of 300–400 cps).

On the other hand, for optimum IHC analysis with metallic NCs as labels it is necessary to consider that after bioconjugation of the specific Ab with the NCs, the surface of the NCs can still contain activated carboxyl groups which did not

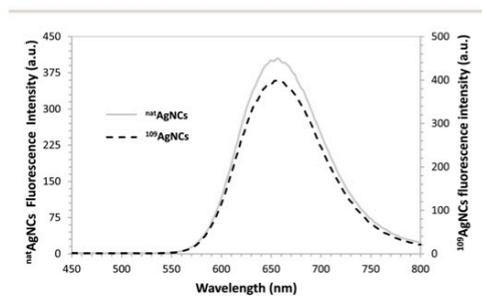


Fig. 1 Fluorescence spectra of the synthesized <sup>natural</sup>AgNCs (grey line) and isotopically enriched <sup>109</sup>AgNCs (dotted line in the secondary axis). Excitation wavelength: 430 nm.

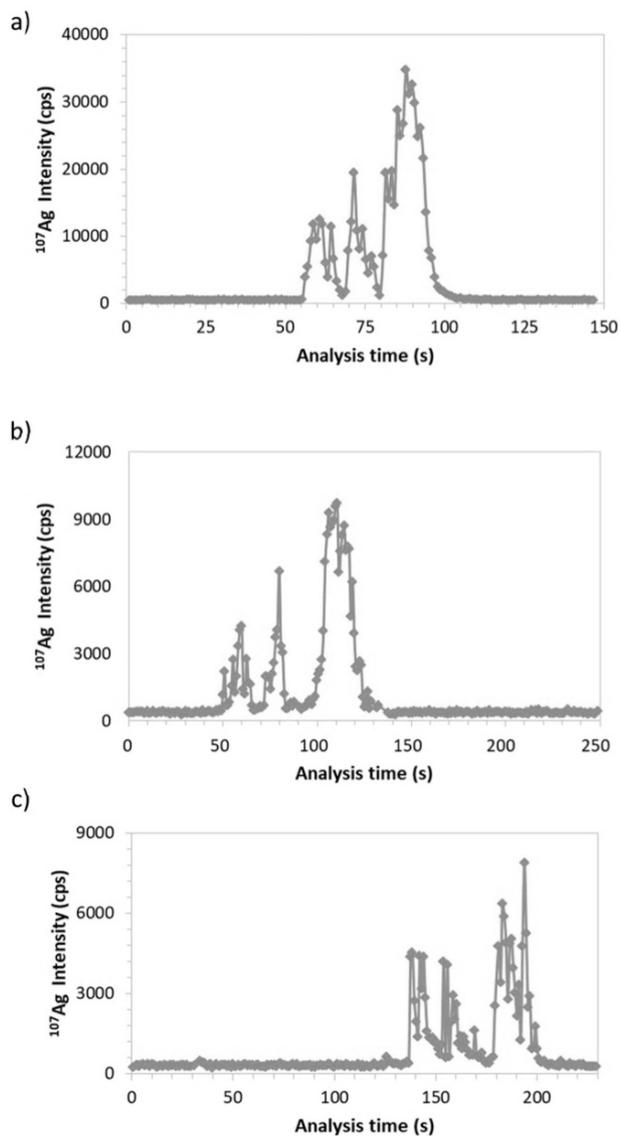


Fig. 2  $^{107}\text{Ag}$  line profile obtained by LA-ICP-MS for the analysis of retinal layers in human ocular tissue sections after the IHC protocol with the anti-MT1/2 :  $^{108}\text{AgNC}$  bioconjugate using different bioconjugate : hydroxylamine molar ratios. (a) 1 : 20; (b) 1 : 50; and (c) 1 : 100. The width of the ablation lines at the ocular tissues ranges from 450  $\mu\text{m}$  to 950  $\mu\text{m}$  (the initial and the last 30 s of the analyses correspond to the He carrier gas background).

react with the Ab. Therefore, it is necessary to block the remaining functional groups of metallic NCs to avoid non-specific interaction with other biomolecules present in the tissue section, which can subsequently produce a high background signal after the IHC procedure. For such a purpose, anti-MT1/2 : <sup>nat</sup>AgNC bioconjugates treated with different molar ratios of the selected primary amine were investigated. After the IHC protocol, the ocular tissue sections were measured by LA-ICP-MS. Fig. 2 shows the line profiles obtained by LA-ICP-MS for <sup>107</sup>Ag intensity in three consecutive tissue sections with different bioconjugate : hydroxylamine molar ratios (1 : 20, 1 : 50 and 1 : 100). Distribution of MT1/2 along the human retina is specifically located at three layers: the outer nuclear layer, the inner nuclear layer and the ganglion cells.<sup>22</sup> By using the anti-MT1/2 : <sup>nat</sup>AgNC bioconjugate without hydroxylamine, the three layers with MT1/2 were hardly distinguished from the high background observed for <sup>107</sup>Ag in the tissue section due to non-specific interactions of <sup>nat</sup>AgNCs (data not shown). However, as can be observed in Fig. 2, it is possible to determine the distribution of <sup>107</sup>Ag (*i.e.*, MT1/2) along the retinal layers using hydroxylamine as the blocking agent: the three maxima of the profiles correspond to the layers containing MT1/2 protein (ganglion cells, the inner nuclear layer and the outer nuclear layer, from left to right). Non-specific interactions of AgNCs with the tissue were impeded using 1 : 20, 1 : 50 and 1 : 100 bioconjugate : hydroxylamine molar ratios taking into account that the <sup>107</sup>Ag signal reached the background level between the layers containing MT1/2. Nevertheless, it was also observed that an increase in the amount of hydroxylamine produced a diminution in the <sup>107</sup>Ag intensity: the <sup>107</sup>Ag signal at the outer nuclear layer showed a reduction from 35 000 cps using a 1 : 20 molar ratio (Fig. 2a) to 9700 cps using a 1 : 50 molar ratio (Fig. 2b) and 7900 cps using a 1 : 100 molar ratio (Fig. 2c). This can be attributed to an excess in the primary amine employed as the blocking agent, not only reducing the non-specific interactions of AgNCs with the tissue but also blocking the Ab and, therefore, limiting the recognition capabilities of the labelled antibody. Thus, the 1 : 20 molar ratio was selected for further experiments.

As the last step, the ratio Ab : AgNCs was optimized aiming at a high fluorescence emission of the bioconjugate while keeping the recognition capabilities of the Ab. Different Ab : <sup>nat</sup>AgNC molar ratios (1 : 3, 1 : 5, 1 : 7 and 1 : 10) were assayed in the bioconjugation solution to label the anti-MT1/2 Ab. To check if the Ab retained its functionality after being labelled with <sup>nat</sup>AgNCs, a study was made for the different ratios. Additionally, as hydroxylamine hydrochloride was used to reduce non-specific interactions of AgNCs with the tissue sections, Ab : <sup>nat</sup>AgNC ratios were investigated both before and after the incubation with the primary amine (at the optimized 1 : 20 molar ratio bioconjugate : hydroxylamine). For this study, MT1/2 was immobilized in an ELISA plate and a secondary Ab labelled with horseradish peroxidase was employed for detection. Table 2 collects the absorbance at the different Ab : <sup>nat</sup>AgNC molar ratios investigated. Concerning Ab : <sup>nat</sup>AgNC bioconjugates without the hydroxylamine treatment, the results showed that for the 1 : 3 ratio the absorbance

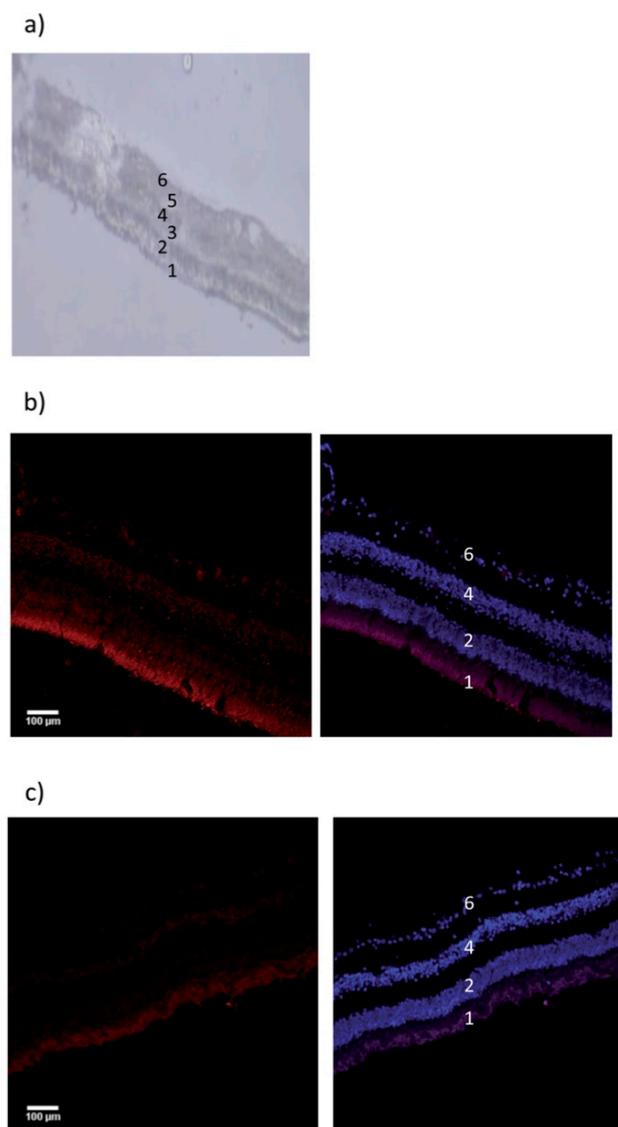
**Table 2** Absorbance measured with the ELISA immunoassay to study the influence of Ab : <sup>nat</sup>AgNC molar ratio on recognition capabilities of the Ab (MT1/2) before and after the incubation with the primary amine (1 : 20 molar ratio bioconjugate : hydroxylamine)

		Absorbance
Blank		0.142 ± 0.004
Ab without AgNCs		1.478 ± 0.018
Ab : AgNCs molar ratio	Ab : AgNCs without hydroxylamine	Ab : AgNCs with hydroxylamine
1 : 3	1.427 ± 0.068	1.226 ± 0.089
1 : 5	1.298 ± 0.053	0.730 ± 0.051
1 : 7	1.096 ± 0.021	0.727 ± 0.022
1 : 10	1.032 ± 0.031	0.699 ± 0.029

was slightly lower compared to the unlabeled Ab (1.43 *versus* 1.48, respectively). For 1 : 5, 1 : 7 and 1 : 10 ratios, absorbance signals exhibited lower values (up to 1.03). In the case of Ab : <sup>nat</sup>AgNC bioconjugates treated with hydroxylamine, lower absorbances were observed compared to the non-treated bioconjugates, indicating that the primary amine can also inhibit some binding sites of the Ab. However, the 1 : 3 molar ratio was found to display a reasonable absorbance (1.23 *versus* 1.48 for the Ab without <sup>nat</sup>AgNCs) and, therefore, it was selected as the optimum ratio for the labelling process.

#### Imaging of MT1/2 and SOD1 in the human retina using AgNC labels by fluorescence microscopy

In order to study the protein distribution in the human retinal layers following AgNC fluorescence emission, two consecutive tissue sections were subjected to the IHC protocol using the Ab labelled either with <sup>nat</sup>AgNCs (for MT1/2 detection) or with <sup>109</sup>AgNCs (for SOD1 detection). Fig. 3 shows the localization of MT1/2 (Fig. 3b) and SOD1 (Fig. 3c) in the micrometer layers of the retina obtained by laser confocal microscopy following <sup>nat</sup>AgNC and <sup>109</sup>AgNC emission, respectively. Each image corresponds to a different zone of the retina. In addition, it has to be noted that some uncontrolled morphological changes in the tissue structure can take place along deparaffinization and the IHC protocol (*e.g.* small regions of the ocular tissue can sometimes break). In both cases a high fluorescence signal can be found at the outer segments of photoreceptors (indicated as layer 1 in the images). However, the high autofluorescence typical of this layer does not allow confirming that MT1/2 or SOD1 is present. Although with a lower fluorescence signal compared to the photoreceptors, a fluorescence emission at the outer nuclear layer, the inner nuclear layer and the ganglion cells can also be clearly observed (both for <sup>nat</sup>AgNC and <sup>109</sup>AgNC labels) (indicated in Fig. 3 as layers 2, 4 and 6, respectively). Therefore, it can be concluded that MT1/2 and SOD1 proteins have a similar distribution in the retinal layers, being mainly distinguished along the outer and inner nuclear layers as well as at the ganglion cells. Images obtained by fluorescence



**Fig. 3** Analysis of the neurosensory retina in human ocular tissues after the IHC protocol with AgNC labels by fluorescence microscopy. Images obtained by laser confocal microscopy (20 $\times$ ). (a) Transmission image of the selected region from the human retina, including the description of the distinct retinal layers: (1) photoreceptors, (2) outer nuclear layer, (3) outer plexiform layer, (4) inner nuclear layer, (5) inner plexiform layer, (6) ganglion cells, and (7) nerve fiber layer; (b) MT1/2 detection with primary Ab anti-MT1/2 labelled with  $^{112}\text{AgNCs}$ ; and (c) SOD1 detection with primary Ab anti-SOD1 labelled with  $^{109}\text{AgNCs}$ . Images (b and c) show two independent images with the bioconjugate fluorescence emission in red ( $^{112}\text{AgNCs}$  or  $^{109}\text{AgNCs}$ , respectively) and the bioconjugate emission together with DAPI emission (the latter in blue).

microscopy offer a better resolution than that expected by LA-ICP-MS imaging. However, taking into account that  $^{nat}\text{AgNCs}$  and  $^{109}\text{AgNCs}$  used as labels of the selected Ab emit fluorescence at the same wavelength (660 nm), it was not possible to perform multiplexing analysis at the same tissue section.

#### Simultaneous imaging of MT1/2 and SOD1 in the human retina by LA-ICP-MS

5  $\mu\text{m}$  thick sections of human ocular tissues subjected to the IHC protocol with  $^{nat}\text{AgNCs}$  or  $^{109}\text{AgNCs}$  were ablated using experimental conditions collected in Table 1. Two dimensional images covering an area of the neurosensory retina were obtained for MT1/2 (Fig. 4a,  $^{107}\text{Ag}$  signal from the anti-MT1/2 :  $^{nat}\text{AgNC}$  bioconjugate) and SOD1 (Fig. 4b,  $^{109}\text{Ag}$  signal from the anti-SOD1 :  $^{109}\text{AgNC}$  bioconjugate) distribution after LA-ICP-MS analysis. As can be observed in Fig. 4a and b, MT1/2 and SOD1 proteins are non-homogeneously distributed along the retinal layers, showing in both cases a preferential location at the outer nuclear layer, the inner nuclear layer and the ganglion cells (in agreement with bibliography and experimental results obtained by fluorescence microscopy). Additionally, as can be observed from the fluorescence images shown in Fig. 3, images with signals in cps obtained by LA-ICP-MS confirm that the SOD1 content in the human retina is lower compared to MT1/2 levels for this particular sample: taking into account the different isotope abundances of the AgNC labels, the higher  $^{107}\text{Ag}$  intensity (51.84% isotope abundance) from  $^{nat}\text{AgNCs}$  bioconjugated with anti-MT1/2 (Fig. 4a) in comparison to  $^{109}\text{Ag}$  intensity (99.7% isotope abundance) from  $^{109}\text{AgNCs}$  bioconjugated with anti-SOD1 (Fig. 4b) reveals that the MT1/2 level is significantly higher than that of SOD1. In any case, the development of a suitable calibration method should be performed to obtain accurate information about MT1/2 and SOD1 concentrations along the tissue structures.<sup>22</sup>

Finally, the first attempt for simultaneous analysis of two different proteins at the same tissue section by LA-ICP-MS using metal-NC labels is presented in this work. After the individual imaging of MT1/2 and SOD1 using two tissue sections (Fig. 4), the two bioconjugates were added to the same tissue (anti-MT1/2 :  $^{nat}\text{AgNCs}$  and anti-SOD1 :  $^{109}\text{AgNCs}$ ). In this case, the  $^{107}\text{Ag}$  signal measured by LA-ICP-MS practically corresponds in its entirety to the MT1/2 distribution (51.84% isotope abundance of  $^{107}\text{Ag}$  from  $^{nat}\text{AgNCs}$  and 0.3% isotope abundance of  $^{107}\text{Ag}$  from  $^{109}\text{AgNCs}$ ), whereas the  $^{109}\text{Ag}$  signal gives information about both MT1/2 and SOD1 (99.7% isotope abundance of  $^{109}\text{Ag}$  from  $^{109}\text{AgNCs}$  together with 48.16% isotope abundance of  $^{109}\text{Ag}$  from  $^{nat}\text{AgNCs}$ ). Thus, qualitative images obtained by LA-ICP-MS after the tissue ablation will not directly provide the simultaneous distribution of the two proteins. Only by using two different isotopically enriched NCs labels (e.g.,  $^{107}\text{AgNCs}$  with 99.9% isotope abundance for MT1/2 and  $^{109}\text{AgNCs}$  with 99.9% isotope abundance for SOD1) multiplexing analysis of two proteins can be directly performed by LA-ICP-MS, resorting in both cases to an identical NC synthesis procedure (with a different isotope as the metal precursor). In our case, only one isotopically enriched label was used for this proof of concept

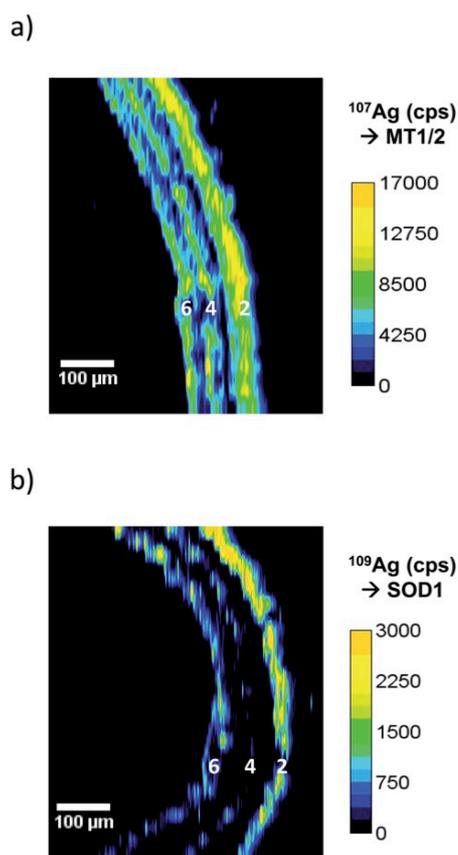


Fig. 4 Analysis of the neurosensory retina in human ocular tissues after the IHC protocol with AgNC labels by LA-ICP-MS. (a)  $^{107}\text{Ag}$  elemental image (in cps) obtained using the anti-MT1/2 :  $^{nat}\text{AgNC}$  bioconjugate for detection of MT1/2; and (b)  $^{109}\text{Ag}$  elemental image (in cps) obtained using the anti-SOD1 :  $^{109}\text{AgNC}$  bioconjugate for detection of SOD1.

and, therefore, an isotope pattern deconvolution (IPD) mathematical tool was used to obtain simultaneous information about the distribution of the two proteins in the human retina. By using LA-ICP-MS analysis together with IPD it was possible to distinguish the distribution of  $^{nat}\text{AgNCs}$  (MT1/2) from the isotopically enriched  $^{109}\text{AgNCs}$  (SOD1) along the retinal layers. Although IPD has been previously employed by MS to determine the contribution of individual mass spectra in mixtures of different isotope patterns, it has not been combined with LA-ICP-MS for protein analysis.

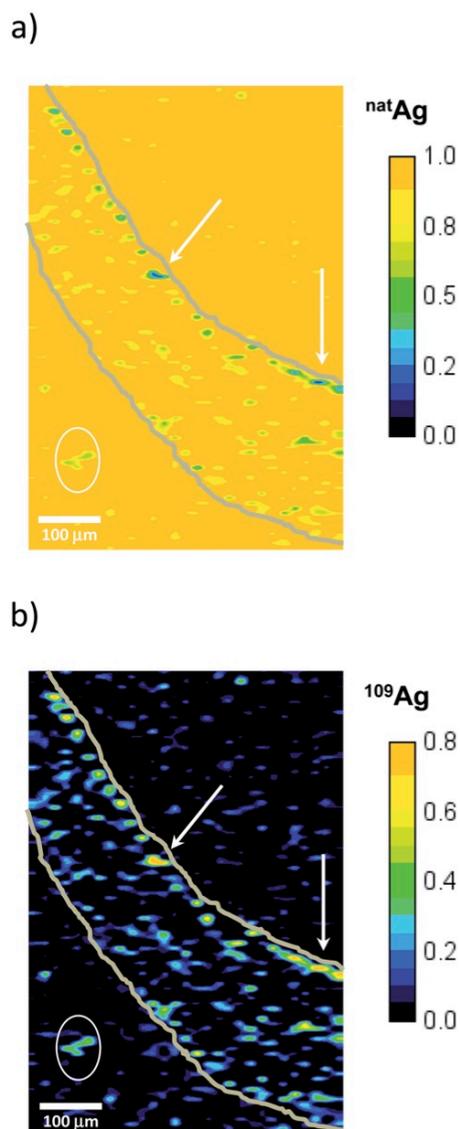


Fig. 5 Molar fraction images of  $^{nat}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  obtained by LA-ICP-MS in the human retina for a tissue section submitted to the IHC protocol with both the anti-MT1/2 :  $^{nat}\text{AgNC}$  bioconjugate and anti-SOD1 :  $^{109}\text{AgNC}$  bioconjugate. The area included inside the two light brown lines drawn in the images points out the region of the ocular retina ablated with the laser beam. (a)  $^{nat}\text{Ag}$  molar fraction; and (b)  $^{109}\text{Ag}$  molar fraction.

Although not strictly required in this particular case, in order to show the feasibility of using IPD to distinguish between the natural and isotopically enriched tracer contribution, multiple linear regression was applied. In this case,  $^{107}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  signals (cps) obtained by LA-ICP-MS were transformed into molar fraction images, allowing us to determine the distribution of the naturally abundant and isotopically enriched AgNC labels. For such a purpose, the measured  $^{107}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  signals were corrected for mass bias using the bracketing of a naturally abundant Ag standard ( $100 \mu\text{g g}^{-1}$  Ag in gelatin). Next, the mass corrected intensity data were transformed to isotope abundances and the time resolved  $^{nat}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  molar fractions were obtained by multiple linear regression, following a similar protocol to that previously proposed for the analysis of Zn in supplemented cultured cells.<sup>32</sup> Fig. 5 shows the  $^{nat}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  molar fraction images after IPD mathematical calculations. As shown in Fig. 5a, molar fractions of  $^{nat}\text{Ag}$  around 1 were obtained along the image when the human retina was not present (natural Ag contribution from the He carrier gas). In order to clearly localize the ocular tissue, two light brown lines drawn in the molar fraction images pointed out the region of the retina ablated with the laser beam. When ocular tissue was ablated,  $^{nat}\text{Ag}$  molar fractions close to 1 were also obtained. Nevertheless, in this case it can be attributed to both the presence of MT1/2 at the three layers where  $^{nat}\text{AgNCs}$  were identified (the outer and inner nuclear layers and the ganglion cells) but also to the He carrier gas during the ablation of the layers where MT1/2 was not present (*i.e.*, photoreceptors, outer and inner plexiform layers, and the nerve fiber layer).

On the other hand,  $^{109}\text{Ag}$  molar fractions (Fig. 5b) confirmed that SOD1 protein was mainly distributed along three of the retinal layers. Additionally,  $^{nat}\text{Ag}$  and  $^{109}\text{Ag}$  molar fraction images allow us to know that although MT1/2 and SOD1 proteins were found to be distributed at the same retinal layers, there are some regions of the tissue where both proteins are not located together or they are not at the same level. For example, the two arrows marked in the molar fraction images of Fig. 5a and b indicate regions of the outer nuclear layer where SOD1 protein was present but MT1/2 contribution was comparatively negligible. Note that some outliers (the larger one is marked in the images with a circle) can be identified in the images during He carrier gas contribution (*i.e.*, when the tissue section should not be ablated). They can be attributed to some residues aroused from the tissue during the different stages required for the IHC protocol. Finally, it should be stated that by using the state-of-the-art instrumentation (*e.g.*, small laser spots, ultrafast ablation chambers, *etc.*) higher resolution images of protein distribution can be obtained, allowing for a better discrimination of proteins within low-micrometer layers.<sup>33–36</sup>

## Conclusions

Small metal NCs constituted of a few hundred atoms of a given metal per NC are promising labels for elemental MS analysis since they provide high signal amplification for the detection of biomolecules. The use of NCs of different metals will allow for multiplexing capabilities in combination with ICP-MS.

Moreover, the synthesis of isotopically enriched metal NCs will increase the palette of this type of label.

In this paper the feasibility of synthesizing and applying labels constituted by isotopically enriched metal NCs for the imaging of proteins in biological tissues has been demonstrated. As evidence,  $^{108}\text{AgNCs}$  and  $^{109}\text{AgNCs}$  both with an emission maximum at 660 nm and similar intensity were prepared and employed for bioimaging studies in the human retina. Fluorescence of AgNCs allowed bioimaging by fluorescence microscopy; however, as expected, benefits of using isotopically enriched NCs were only obtained with LA-ICP-MS detection.

To conclude, it is worthy of note that an additional advantage of synthesizing isotopically enriched metal NCs for elemental mass spectrometric detection is that, as demonstrated here, the preparation procedure is the same as that with the corresponding metal of natural isotopic composition. This is of special interest considering that the synthesis of fit for purpose metal NCs is not a straightforward step and their characterization are rather time consuming processes. Further studies will be carried out towards the development of isotopically enriched NCs of other metals containing several stable isotopes such as platinum (190, 192, 194, 195, 196 and 198 isotopes). For example, in the case of Pt, the proposed methodology would allow for multiplex analysis of several proteins (by measuring different isotopically enriched PtNCs) in the same tissue sections by LA-ICP-MS combined to the IPD mathematical tool. Of course, for the multiplex analysis of numerous isotopes, the use of mass analyzers that allow the simultaneous acquisition of different isotopes (e.g., ICP-time of flight MS) will be most convenient.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

This work was supported through project CTQ2016-79015-R by Agencia Estatal de Investigación (Spain) and FEDER. E. Valencia-Agudo and B. Fernández respectively acknowledge the FPI Grant (Ref. BES-2017-080518) and the contract RYC-2014-14985 through the “Ramón y Cajal Program” from the Ministry of Economy and Competitiveness. The Instituto Oftalmológico Fernández-Vega and Fundación de Investigación Oftalmológica acknowledge support from “Cátedra Rafael del Pino” (Fundación Rafael del Pino). Finally, authors would like to acknowledge the technical support provided by Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo.

## References

- M. Larginho and P. V. Baptista, *J. Proteomics*, 2012, **75**, 2811–2823.
- H. D. Beyene, A. A. Werkneh, H. K. Bezabh and T. G. Ambaye, *Sustainable Mater. Technol.*, 2017, **13**, 18–23.
- Y.-H. Cheng, Y.-F. Cheung, T. S.-C. Tam, C.-N. Lok, H. Sun and K.-M. Ng, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1055**, 1–6.
- L. Wei, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z.-S. Chen and G. Chen, *Drug Discovery Today*, 2015, **20**, 595–601.
- G. Jalani, S. Lee, C. W. Jung, H. Jang, J. Choo and D. W. Lim, *Analyst*, 2013, **138**, 4756–4759.
- M. Shore, J. Wang, A. Johnston-Peck, A. Oldenburg and J. Tracy, *Small*, 2011, **7**, 230–234.
- K. Zheng, X. Yuan, N. Goswami, Q. Zhang and J. Xie, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 60581–60596.
- H. Jiang, G. Xu, Y. Sun, W. Zheng, X. Zhu, B. Wang, X. Zhang and G. Wang, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 11810–11813.
- M.-M. Yin, W.-Q. Chen, Y. Liu and F.-L. Jiang, *ACS Appl. Nano Mater.*, 2019, **2**, 408–417.
- Z. Liu, X. Li, G. Xiao, B. Chen, M. He and B. Hu, *Trends Anal. Chem.*, 2017, **93**, 78–101.
- B. Meermann and V. Nischwitz, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1432–1468.
- X. Yin, B. Chen, M. He and B. Hu, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 424.
- A. Lores-Padín, M. Cruz-Alonso, H. González-Iglesias, B. Fernández and R. Pereiro, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 705.
- A. Sajnóg, A. Hanc and D. Baralkiewicz, *Talanta*, 2018, **182**, 92–110.
- M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández and R. Pereiro, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 549–558.
- T. Van Acker, T. Buckle, S. J. M. Van Malderen, D. M. van Willigen, V. van Unen, F. W. B. van Leeuwen and F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1074**, 43–53.
- J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell and C. Murray, *Proteomics*, 2008, **8**, 3775–3784.
- 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 and P. A. Doble, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 5383–5393.
- 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 and P. A. Doble, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2160–2169.
- R. González de Vega, D. Clases, M. L. Fernández-Sánchez, N. Eiró, L. O. González, F. J. Vizoso, P. A. Doble and A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 639–646.
- M. Trdonova, M. Vlcovska, L. P. Vanickova, V. Kanicky, V. Adam, L. Ascher, N. Jakubowski, M. Vaculovicova and T. Vaculovic, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 559–564.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. Garcia, H. González-Iglesias and R. Pereiro, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 12145–12151.
- M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo and R. Pereiro, *Talanta*, 2019, **197**, 413–421.
- 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 and B. Bodenmiller, *Nat. Methods*, 2014, **11**, 417–422.

## Paper

- 25 J. Gigault and V. A. Hackley, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **763**, 57–66.
- 26 A. Laycock, B. Stolpe, I. Römer, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, J. R. Lead and M. Rehkämper, *Environ. Sci.: Nano*, 2014, **1**, 271–283.
- 27 M.-N. Croteau, A. D. Dybowska, S. N. Luoma, S. K. Misra and E. Valsami-Jones, *Environ. Chem.*, 2014, **11**, 247–256.
- 28 A.-M. A. Willmore, L. Simón-Gracia, K. Toome, P. Paiste, V. R. Kotamraju, T. Mölder, K. N. Sugahara, E. Ruoslahti, G. B. Braun and T. Teesalu, Targeted silver nanoparticles for ratiometric cell phenotyping, *Nanoscale*, 2016, **8**, 9096–9101, DOI: 10.1039/C5NR07928D.
- 29 I. Konz, B. Fernández, M. L. Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **809**, 88–96.
- 30 E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández and R. Pereiro, *Microchim. Acta*, 2019, **186**, 429.
- 31 F. Valverde, M. Costas, F. Pena, I. Lavilla and C. Bendicho, *Chem. Speciation Bioavailability*, 2008, **20**, 217–226.
- 32 S. Rodríguez-Menéndez, B. Fernández, H. González-Iglesias, M. García, L. Álvarez, J. I. García Alonso and R. Pereiro, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 4488–4495.
- 33 S. J. M. Van Malderen, A. J. Managh, B. L. Sharp and F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 423–439.
- 34 T. Van Acker, T. Buckle, S. J. M. Van Malderen, D. M. van Willigen, V. van Unen, F. W. B. van Leeuwen and F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1074**, 43–53.
- 35 J. Pisonero, D. Bouzas-Ramos, H. Traub, B. Cappella, C. Álvarez-Llamas, S. Richter, J. C. Mayo, J. M. Costa-Fernandez, N. Bordel and N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 655–663.
- 36 S. Theiner, A. Schweikert, S. J. M. Van Malderen, A. Schoeberl, S. Neumayer, P. Jilma, A. Peyrl and G. Koellensperger, *Anal. Chem.*, 2019, **91**, 8207–8212.

**Exploring the possibilities of calcium isotopic analysis in  
aqueous humor using a fast and miniaturized calcium isolation  
procedure**

Eva Valencia, Adrián López, Lara Lobo, Héctor González-Iglesias, Rosario  
Pereiro

*Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(12), 2573-2578.



Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, 36, 2573

## Exploring the possibilities of calcium isotopic analysis in aqueous humor using a fast and miniaturized calcium isolation procedure

Eva Valencia,<sup>a</sup> Adrián López,<sup>a</sup> Lara Lobo,<sup>id</sup> \*<sup>a</sup> Héctor González-Iglesias<sup>id</sup> \*<sup>abc</sup> and Rosario Pereiro<sup>id</sup> \*<sup>ab</sup>

The potential of using isotope ratios to understand biochemical processes in the body has been investigated in the past few years. In addition, to carry out a more comprehensive study on the etiology and evolution of diseases, analysis of microsamples has gained importance. The isotopic study of aqueous humor could contribute to elucidating the pathophysiological mechanisms that occur inside the eye leading to the development of glaucoma. Using this method, it is known that proteins and essential elements such as calcium play important roles in aqueous humor outflow dynamics and/or glaucoma disease due to their behavior as biological regulators. Thus, aiming at exploring the possibilities of calcium isotopic analysis by multicollector ICP-MS in aqueous humor within the context of eye diseases, and more specifically glaucoma, an optimized Ca isolation purification procedure was developed. As aqueous humor volumes available are usually at the  $\mu\text{L}$  level, and considering that most of the procedures discussed in the literature require high volumes of eluents, we propose a fast and miniaturized procedure applicable to low sample volumes, combining a reduced amount of resin and low eluent consumption. In the selected protocol, about 0.25 mL of sample were purified, using 0.5 mL of cation exchange resin and requiring just 21 mL of 1 M HCl as an eluent. The results showed the capabilities of the proposed approach for the analysis of Ca isotopic ratios in human aqueous humor. Further studies will be addressed using this novel procedure in larger cohorts of both glaucoma patients and control subjects.

Received 22nd July 2021  
Accepted 7th October 2021

DOI: 10.1039/d1ja00254f

rsc.li/jaas

## Introduction

Miniaturization strategies for both collection and analysis of biological fluids, in combination with improved performance of analytical techniques, for diagnosis purposes are current trends in research.<sup>1</sup> Due to the low limits of detection achieved with modern inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) systems, either having a low amount of sample and/or a low target element concentration should not be a major concern.<sup>2</sup> The situation turns different when dealing with high precision isotopic analysis by multi-collector (MC) ICP-MS, since the analysis of absolute concentrations of isotopes at low levels is not an easy task with available instrumentation.<sup>3</sup> For this reason, having either a low amount of sample and/or a low concentration of a target element can strongly compromise

cutting edge applications focused on the analysis of biological fluids. The use of aerosol desolvating systems, high-efficiency jet interfaces, high gain Faraday cup amplifiers ( $10^{13} \Omega$  compared to  $10^{11} \Omega$  conventional ones) and ion counter devices has improved performance in terms of sensitivity.<sup>4,5</sup> In addition, sample mixing of the analyte with a non-enriched in-house standard,<sup>3</sup> preconcentration procedures,<sup>6</sup> or the use of droplets of serum deposited on silicon (with laser ablation sample introduction)<sup>7</sup> have been among the strategies proposed to extend the applications of MC-ICP-MS within a clinical context.

Calcium (Ca) participates in numerous physiological and biochemical processes in the body (*e.g.* synaptic transmission, cell signaling, bone formation, blood coagulation, *etc.*) and its balance is strictly regulated to keep relatively constant concentration levels to ensure proper homeostasis.<sup>8</sup> Despite being one of the most abundant mineral elements in the human body, Ca isotope ratio analysis in human samples has not been carried out much in human samples. To our knowledge, whole blood,<sup>9</sup> serum,<sup>10,11</sup> and/or urine<sup>12–17</sup> are the main biological fluids in which Ca isotopic ratios were investigated, being mostly employed to monitor changes in bone mineral balance.<sup>9,12,14,15</sup>

Ca also plays an important role in the physiology of the eye and the visual cycle. In fact, several ocular pathologies, including different forms of retinal degeneration and the

<sup>a</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: lololara@uniovi.es; Tel: +34 985 10 3430 ext. 5366

<sup>b</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega (Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Veg, Universidad de Oviedo), Avda. Drs Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Spain. E-mail: h.gonzalez@fio.as; Tel: +34 985 24 0141

<sup>c</sup>Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avda. Drs Fernández-Vega 34, 33012 Oviedo, Spain

aberrant growth of retinal precursors or other cell types in the eye, are often caused by mutations in genes involved in Ca regulation.<sup>18</sup> Also, Ca-binding proteins participate in the control of oxidative stress, apoptosis, inflammation, or Ca<sup>2+</sup> homeostasis.<sup>19</sup> Systematic differences in the isotopic composition of essential elements have been reported so far for different pathologies (healthy *versus* non healthy), with the potential of this tool widely demonstrated during the last decade.<sup>20</sup> Therefore, measurements of Ca isotopic fractionation, attributed to different (bio)chemical reactions, could provide important information related to the status of the eye, contributing to shed light on existing alterations related to the homeostasis of this element in the visual system. Dysregulation of Ca homeostasis has been implicated in glaucoma,<sup>21</sup> a neurodegenerative eye disease of multifactorial origin where dysfunction of the normal flow of the human aqueous humor is considered one of the main risk factors. This intraocular fluid is mainly derived from the blood plasma and is secreted at a rate of 2.0–2.5  $\mu\text{L min}^{-1}$ . It contains proteins, metabolites and essential elements which may be altered during glaucoma.<sup>22</sup> Access to aqueous humor (*in vivo* sampling) requires an invasive approach for its collection, and it is important to note that not all aqueous humor can be extracted from the patients' eyes, with the obtained volumes usually being below 250  $\mu\text{L}$ .<sup>23</sup> Within this context, aqueous humor can be considered an ideal biological fluid to further explore novel methodologies permitting isotopic Ca analysis in samples of very limited volumes.

Over the last few years, several studies describing Ca isolation procedures for subsequent isotopic analysis by MC-ICP-MS have been reported.<sup>17,24,25</sup> Such procedures generally make use of 1–2 mL of an ion-exchange resin, and sample loading volumes between 0.5 and 2 mL. High volumes of solvents (~60 mL or even higher) are usually needed to complete the purification procedure. However, these procedures can be considered time consuming, thus reducing the sample throughput. Also, in the case of samples with low volume availability, such extended procedures do not provide advantages and there is indeed no need of using high amounts of chemical reagents.

Thus, aiming at exploring possibilities of Ca isotopic analysis in aqueous humor within the context of eye diseases, and more specifically glaucoma, an optimized Ca isolation purification procedure was developed in this work. As aqueous humor volumes available for analysis are usually at the  $\mu\text{L}$  level, and also considering that most of the procedures discussed in the literature for such purposes require high volumes of solvents, we propose a fast and miniaturized novel procedure applicable to low sample volumes, combining a reduced amount of resin and low solvent consumption.

## Experimental

### Sample collection

This pilot work was designed according to the Declaration of Helsinki on biomedical research involving human subjects and full ethical approval was obtained from the Clinical Research Ethics Committee at the Principality of Asturias (Oviedo, Spain). Specifically, 4 control donors ( $83 \pm 7.26$  years old) and 6

patients diagnosed with pseudoexfoliation glaucoma ( $75.5 \pm 14.46$ ) were recruited at the Institute of Ophthalmology Fernández-Vega (Oviedo, Spain) and aqueous humor was obtained after they signed an informed consent. All individuals underwent ophthalmic examination and glaucoma patients were also subjected to more specific ophthalmic tests. All of them suffered from cataracts and did not present relevant ocular pathologies such as retinopathies or maculopathies. Individuals diagnosed with pseudoexfoliation glaucoma had deposits of exfoliative material on the anterior lens surface and/or iris in one or both eyes, as revealed during slit-lamp examination. Aqueous humor (30–350  $\mu\text{L}$ ) was collected from both cohorts (control donors and glaucoma patients) at the beginning of cataract surgery, by placing a 27-gauge needle in the anterior chamber. Once collected, samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until analysis.

Optimization of the Ca isolation procedure was carried out by measuring the human serum of a healthy Spanish volunteer. This sample is regularly used as a quality control in our laboratory and we have a record of elemental concentrations to ensure good performance of the experimental work.

### Reagents, materials and instrumentation

9.8 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma Aldrich, Spain) and 14 M  $\text{HNO}_3$  (trace-metal™ grade, Fisher Scientific, USA) were used for mineralization of human serum and aqueous humor samples. The Ca isolation procedure was accomplished with an AG50W-X8 resin (200–400 mesh, hydrogen form, Bio-Rad, Spain). Polypropylene + polyethylene empty columns from Triskem International (France) with 7 mm internal diameter were filled with 0.5 mL of the resin. Diluted HCl solutions used for the different isolation procedures tested were prepared starting from optima grade 12 M HCl (VWR International, Spain) by appropriate dilution with ultrapure water (Purelab flex dispenser, Elga Lab water, UK).

Elemental determinations and Ca recoveries after isolation were measured in a 7700 ICP-MS (Agilent, USA) equipped with a collision/reaction cell using He gas ( $4.3 \text{ mL min}^{-1}$  flow rate) by means of external calibration. Ga was selected as an internal standard for instrumental drift and matrix effect correction. Standard stock solutions with concentrations of  $10\,000 \text{ mg L}^{-1}$  Ca (Lot # 1404943, High-Purity Standards, USA) and  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  Ga (Merck, Spain) were employed to prepare calibration standards. Also, standard stock solutions of P, Mg, K, Fe, Cu, Zn ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) and Na (with  $10\,000 \text{ mg L}^{-1}$ ) from Merck were used to obtain elution profiles of the tested protocols as well as verify the absence of matrix elements in the Ca purified fractions obtained. Elemental analysis was performed in 0.12 M HCl.

Calcium isotope ratios were measured using a Neptune MC-ICP-MS (Thermo Scientific, Germany) instrument in 0.14 M  $\text{HNO}_3$  (an evaporation step of the 0.12 M HCl media purified Ca fraction was performed). Table 1 lists employed cup configuration and instrumental settings. Samples were introduced into the ICP with a PFA concentric nebulizer ( $100 \mu\text{L min}^{-1}$  flow rate) and a Scott-type double pass spray chamber. The Neptune MC-ICP-MS is equipped with 9 Faraday cups connected to  $10^{11} \Omega$

## Technical Note

**Table 1** Instrument settings and acquisition parameters for MC-ICP-MS measurements

Cup configuration	$^{42}\text{Ca}^+$ : L4; $^{43}\text{Ca}^+$ : L2; 43.5: L1; $^{44}\text{Ca}^+$ : C
RF power (W)	1100
Ar flow-rates (L min <sup>-1</sup> )	Plasma gas: 15; auxiliary gas: 0.8; sample gas: 1.03
Resolution mode	Medium
Number of blocks	6
Number of cycles	8
Integration time (s)	4.194

amplifiers. The  $^{42}\text{Ca}$ ,  $^{43}\text{Ca}$  and  $^{44}\text{Ca}$  isotopes were monitored following a sample-standard bracketing sequence and were measured in 0.14 M HNO<sub>3</sub>. No contribution of  $^{88}\text{Sr}^{2+}$  or  $^{84}\text{Sr}^{2+}$  to  $^{44}\text{Ca}^+$  and  $^{42}\text{Ca}^+$  signals, which was determined by monitoring the signal measured at 43.5 mass ( $^{87}\text{Sr}^{2+}$ ), was observed. In fact, background levels below  $6 \times 10^{-5}$  mV were measured for 43.5 *m/z* for samples and for the ICP std used for bracketing correction (prepared from Ca stock solution). Ca measurements were performed in pseudo-medium resolution after selecting a position of the magnetic field so that  $^{42}\text{Ca}^+$  is free from  $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$  interference, that is, on the left flat shoulder of the spectral peak.<sup>25</sup> The Ca concentrations for both types of samples and the standard solution used for bracketing correction were adjusted to 10 mg L<sup>-1</sup>. Under these conditions, registered signals were at about 0.19 V, 0.04 V and 0.7 V for 42, 43 and 44 Ca isotopes, respectively. Due to the low signal for  $^{43}\text{Ca}$ , the isotopic ratio  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  was used. The isotopic composition, expressed as  $\delta^{44/42}$  (see eqn (1)), was calculated with respect to the ICP Ca standard solution which was also subjected to the optimized isolation procedure. Prior to  $\delta$  calculation, removal of outliers based on a  $2\sigma$ -test was processed online.

$$\delta^{44/42}\text{Ca} = \left[ \frac{(\text{Ca}^{44/42})_{\text{sample}} - (\text{Ca}^{44/42})_{\text{standard}}}{(\text{Ca}^{44/42})_{\text{standard}}} \right] \times 1000 \quad (1)$$

**Sample preparation**

Digestion of the samples (human serum and aqueous humor) was carried out in Savillex® beakers, previously cleaned with both HNO<sub>3</sub> and HCl of pro analysis purity grade (VWR, Spain) and subsequent repeated rinsing with ultrapure water. Samples of aqueous humor (volumes are collected in Table 1) were acid digested at 110 °C overnight using 500 μL of 14 M HNO<sub>3</sub> and 125 μL of 9.8 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*i.e.* 4 : 1 v/v ratio). Aliquots of 1 mL of the serum sample were acid digested at 110 °C overnight with 4 mL of 14 M HNO<sub>3</sub> and 1 mL of 9.8 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Digested samples were then evaporated until dryness at 90 °C and reconstituted in the medium required for the Ca isolation procedures (1 M HCl was employed for the optimized procedure), namely 1 mL for serum and 0.30 mL for aqueous humor, respectively. 0.25 mL of the corresponding digested samples (serum and aqueous humor) were subjected to the purification process while the rest was used to determine the elemental Ca content.

**Results and discussion****Determination of elemental calcium**

Table 2 lists the volume of aqueous humor collected from each sample and the Ca concentrations determined for the investigated samples. As can be seen, Ca concentration levels range from 43 to 220 mg L<sup>-1</sup>. Due to the limited number of samples available, no statistical analysis for group comparison was performed. Only averaged levels of Ca for each group were examined, resulting in similar results for both cohorts:  $135 \pm 62$  mg L<sup>-1</sup> (controls) and  $114 \pm 66$  mg L<sup>-1</sup> (patients). The Ca levels in aqueous humor have also been examined in recent literature studies with different results. For instance, Zhou *et al.*<sup>26</sup> found on average  $48.8 \pm 5.5$  mg L<sup>-1</sup> Ca (*n* = 24, age:  $72.46 \pm 11.83$  years, senile cataract individuals). These results are in agreement with other publications presenting Ca concentrations in aqueous humor between 50 and 80 mg L<sup>-1</sup> Ca.<sup>27</sup> On the other hand, Dolar-Szczasny *et al.*<sup>28</sup> published a study showing the levels of trace elements in the aqueous humor of patients with cataracts and reported averaged values ( $294.5 \pm 162.3$  mg L<sup>-1</sup> Ca), as well as minimum (98.98 mg L<sup>-1</sup> Ca) and maximum concentrations (1162 mg L<sup>-1</sup> Ca) found in 115 patients with cataracts of an average age of  $74 \pm 7.27$  years. Therefore, the Ca levels obtained in our work, ranging from 53 to 220 mg L<sup>-1</sup>, are within the range of published values. The concentrations of this element in aqueous humor was compared with values for individuals with distinct pathologies, including diabetes,<sup>29</sup> or cytomegalovirus retinitis,<sup>33</sup> and no significant differences in the levels of Ca was observed as a consequence of the disease, which may indicate a well-regulated homeostatic balance of this element in the body.

**Optimization of the calcium isolation procedure**

Based on the literature published on high-precision measurements of Ca isotope ratios in biological samples and

**Table 2** Elemental concentrations (uncertainty is estimated as 3%) of Ca measured in aqueous humor samples and Ca recoveries obtained after isolation via ICP-MS. The volumes of aqueous humor samples available for analysis has been also indicated.  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values obtained have been also corrected. Uncertainties for CT2 and CT4 correspond to standard deviation obtained for two measurement replicates of the same sample. For the rest of the samples the uncertainty corresponds to RSD (expressed in %) obtained in the measurement of the  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  ratio for the standards in between each sample

		Sample volume (μL)	[Ca] (mg L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	$\delta^{44/42}\text{Ca}$
Controls	CT1	180	67	110	$0.77 \pm 0.52$
	CT2	60	173	114	$0.81 \pm 0.21$
	CT3	80	200	94	$-1.4 \pm 0.4$
	CT4	200	98	106	$0.22 \pm 0.16$
Patients	PEXG1	60	151	103	$-2.4 \pm 0.5$
	PEXG2	30	220	97	$-0.40 \pm 0.20$
	PEXG3	115	53	98	$0.68 \pm 0.17$
	PEXG4	115	102	102	$0.32 \pm 0.23$
	PEXG5	350	115	99	$-1.6 \pm 0.4$
	PEXG6	160	43	100	$-1.4 \pm 0.5$

considering the limited volume of aqueous humor available, we selected just 0.5 mL of resin for Ca isolation. Then, the appropriateness of different procedures, all of them employing AGW-X8 cation exchange resin, was tested with human serum as a model sample. The first procedure used 2.5 M HCl as solvent for sample loading.<sup>17</sup> However, with such an approach, we found that Ca was not retained in the resin, being directly eluted from the column.

A summary of the different steps involving the other two tested protocols (protocol 1 and protocol 2) has been provided in Table 3. In addition to Ca, P, Mg and Na were also initially monitored. Elution profiles (2 mL fractions) obtained for the investigated protocols are shown in Fig. 1. Fig. 1a shows a protocol adapted from that proposed by Tacail *et al.*<sup>24</sup> (protocol 1). It can be seen in our experiments that, using 1 M HCl as the eluent (protocol 1), Ca elutes between 9 and 21 mL after sample loading, a considerably lower volume as compared to that employed previously,<sup>24</sup> which required 65 mL of eluent for 2 mL of sample and 2 mL of resin. Elution is also faster and simpler than in protocol 2, as shown in Fig. 1b for the adapted protocol from Grigoryan *et al.*<sup>25</sup> Another difference of protocol 2 with respect to the previous one<sup>25</sup> was the lower volume in our procedure, both of the resin (0.5 mL *versus* 1 mL) and sample (0.25 mL *versus* 1 mL). In protocol 2, it was observed that Ca eluted in 0.8 M HCl, not requiring 4 M HCl as expected,<sup>25</sup> probably due to the wash effect. For both developed protocols the Ca recovery was quantitative: 95% for protocol 1 and 94.8% for protocol 2. For further experiments, protocol 1 was selected because of simplicity.

In order to ensure proper purification of the target element from other matrix elements, the selected isolation protocol 1 was applied to five digestion replicates of the same serum sample (together with three procedural blanks) and all Ca was collected in the appropriate single fraction. After evaporation and reconstitution of such a fraction in 0.12 M HCl, ICP-MS was also carried out to confirm the absence of concomitant matrix elements Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn and P.

Despite an acidic digestion process being performed prior to isolation, it was considered important to further check the suitability of the selected protocol 1 for aqueous humor samples. Among matrix elements present in aqueous humor, a recent publication<sup>30</sup> showed concentration ranges in individuals having cataracts (same case as the control group analyzed in this group) between 2070 and 3936 mg L<sup>-1</sup> for Na; 13–30 mg

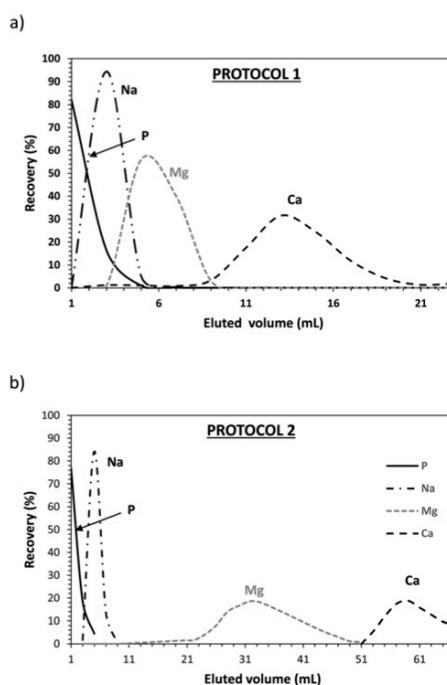


Fig. 1 Elution profiles obtained for protocol 1 (a), and protocol 2 (b) using 0.5 mL AG50W-X8 resin.

L<sup>-1</sup> for P and 5–17 mg L<sup>-1</sup> for Mg. The trace elements Cu, Fe and Zn were found to be in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  range.

In order to preserve as much sample as possible, Ca and elemental matrix components for investigated samples were only measured after the isolation procedure (Ca procedural blanks referred to the undiluted solutions were  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Na, K, Mg, Fe, Cu, Zn and P were determined in the Ca purified fraction, in all cases being below detection limits. In the digested samples, only Ca elemental concentrations were measured. Ca recoveries obtained for aqueous humor samples

Table 3 Experimental conditions of protocol 1 and protocol 2 tested for Ca purification. 0.5 mL of AG50W-X8 resin was used for both procedures

	Protocol 1	Protocol 2
(1) Resin cleaning	6 M HCl (10 mL), 2.5 M HCl (10 mL), Milli Q (10 mL)	
(2) Resin conditioning	1 M HCl (10 mL)	0.4 M HCl (10 mL)
(3) Sample loading	1 M HCl (0.25 mL)	0.4 M HCl (0.25 mL)
(4) Matrix elution	1 M HCl (8 mL)	0.4 M HCl (34 mL), 0.5 M HCl + 12.94 M acetone (10 mL), 0.8 M HCl (7 mL)
(5) Ca elution	1 M HCl (13 mL)	0.8 M HCl (13 mL)

## Technical Note

were calculated after evaporation of the 16 mL of 1 M HCl where Ca was eluted, followed by reconstitution in 0.12 M HCl. The results are collected in Table 2. After isolation, Ca recoveries between 94 and 114% were obtained (Table 2), further demonstrating the suitability of the procedure used for calcium.

## Calcium isotope ratios measurements by MC-ICP-MS

With the aim of demonstrating the applicability of the fast and miniaturized Ca isolation procedure, possible alterations of Ca homeostasis were investigated by performing isotopic analysis in the purified aqueous humor fractions. Isotopic analysis was carried out in 10 mg L<sup>-1</sup> Ca solutions. Bracketing correction was carried out with respect to a Ca ICP standard which was also subjected to a cation exchange procedure, thus avoiding procedural blank subtraction (signals from samples and the standard used for correction are subtracted for delta calculations therefore, as the ICP standard solution was subjected to the isolation procedure, procedural blank subtraction is not required). Fig. 2 shows the  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values obtained for the investigated samples (see numerical values in Table 2). It can be seen that  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  ranges from -1.4 to 0.81 for the control group whereas for the cohort of patients with eye disease, a wider range was obtained, that is,  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  varied from -2.4 to 0.68.

The results obtained in this work, showing a wider  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  range in the aqueous humor of patients with glaucoma disease than controls subjects, are in good agreement with the results found from Ca isotopic analysis in the serum of individuals with active myeloma with respect to non-active myeloma.<sup>10</sup> The alterations of the calcium isotopic composition could be directly related to alterations regarding S100 calcium binding proteins. Such a family of proteins is involved in numerous cellular activities and, for instance, S100A8 is associated with

the presence of ROS in ocular surface inflammation. In fact, levels of S100A8 have been found to be elevated in tear fluid from glaucoma patients under chronic medication.<sup>19</sup> Some calcium binding proteins, apart from Ca, may also be regulated by Zn or Cu.<sup>19,31</sup> Therefore, the results obtained here for Ca could also be reflected on Cu and Zn isotopic compositions. Indeed, a recent study has revealed significant differences in the isotopic composition of Zn (not for Cu) in the aqueous humor of glaucoma patients when compared to control subjects. In such work, the Zn isotopic composition in the glaucoma cohort was found to be enriched in the lighter isotope, which may be associated with the dysregulation zinc-binding protein synthesis or function, including metallothioneins, in glaucoma disease.<sup>30</sup> Therefore, larger cohorts must be considered in further experiments to address the role of Ca in the eye.

## Conclusions

In this work, a fast Ca purification procedure was developed, avoiding the use of high volumes of both sample and eluents. The feasibility to measure Ca isotope ratios by MC-ICP-MS in aqueous humor using the developed protocol was demonstrated and analysis was carried out comparing glaucoma patients *versus* a group of controls. However, it should be noted that a limited number of samples were measured. Still, as aqueous humor is located in a rather watertight compartment, its results might be easily interpreted as compared to those of other body fluids such as blood. The preliminary results obtained in this work foster the study of isotopic alterations of Ca in the aqueous humor of large cohorts of glaucoma patients and their possible implications with the dysregulation of the metabolism of Ca-binding proteins and/or Ca signalling.

In addition, in the search of a less invasive approach, tear fluid may be an interesting alternative for evaluation in future studies employing the method developed here.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

This work was supported through project PID2019-107838RB-I00/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/(10.13039/501100011033). E. Valencia-Agudo y acknowledges the FPI Grant (Ref. BES-2017-080518) from the Ministry of Economy and Competitiveness. The authors would like to acknowledge the technical support provided by Servicios Científico-Técnicos at the University of Oviedo. The Instituto Oftalmológico Fernández-Vega and Fundación de Investigación Oftalmológica acknowledge support from "Cátedra Rafael del Pino" (Fundación Rafael del Pino).

## References

- 1 R. S. Amais, G. L. Donati and M. A. Z. Arruda, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, **133**, 116094.

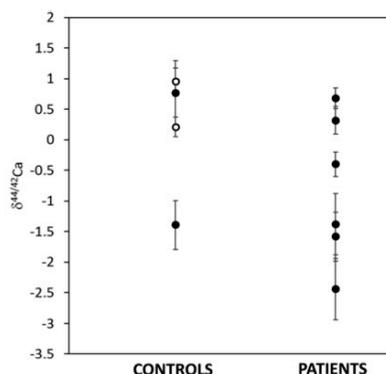


Fig. 2  $\delta^{44/42}\text{Ca}$  values obtained for controls and patients after bracketing correction. Error bars correspond to the standard deviation of two measurement replicates for samples filled in white colour. Error bars for samples in black colour correspond to RSD (expressed in %) obtained in the measurement of the  $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  ratio for the standards in between each aqueous humor sample.

- 2 S. Theiner, A. Schoeberl, L. Fischer, S. Neumayer, S. Hann and G. Koellensperger, *Analyst*, 2019, **144**, 4653–4660.
- 3 M. Costas-Rodríguez, L. Lobo and F. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 4393–4399.
- 4 R. Grigoryan, M. Costas-Rodríguez, P. Santens and F. Vanhaecke, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 15975–15981.
- 5 Q. Ma, M. Yang, H. Zhao, N. J. Evans, Z. Y. Chu, L. W. Xie, C. Huang, Z. D. Zhao and Y. H. Yang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1256–1262.
- 6 J. Zhang, J. Li, L. Zhang, Z. Wang, S. Sun and Z. Y. Luo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, **34**, e8658.
- 7 M. C. Garcia-Poyo, S. Berail, A. L. Ronzani, L. Rello, E. Garcia-Gonzalez, B. Lelievre, P. Cales, F. V. Nakadi, M. Aramendia, M. Resano and C. Pecheyran, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 968–980.
- 8 W. G. Robertson, *Chemistry and Biochemistry of Calcium (Chapter 1) in Calcium in the Human Biology*, ed. B. E. C. Nordin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1988.
- 9 M. B. Channon, G. W. Gordon, J. L. L. Morgan, J. L. Skulan, S. M. Smith and A. D. Anbar, *Bone*, 2015, **77**, 69–74.
- 10 Y. Yan, M. Ge, R. Ma, H. Zhao, D. Wang, C. Hu, J. Wang, W. Chen and C. Zhang, *Clin. Chim. Acta*, 2016, **461**, 141–145.
- 11 G. W. Gordon, J. Monge, M. B. Channon, Q. Wu, J. L. Skulan, A. D. Anbar and R. Fonseca, *Leukemia*, 2014, **28**, 2112–2115.
- 12 A. Eisenhauer, M. Müller, A. Heuser, A. Kolevica, C.-C. Glüer, M. Both, C. Laue, U. Hehn, S. Kloth, R. Shroff and J. Schrezenmeir, *Bone Rep.*, 2019, **10**, 100200.
- 13 S. Sturup, M. Hansen and C. Molgaard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, **12**, 919–923.
- 14 J. L. L. Morgan, J. L. Skulan, G. W. Gordon, S. J. Romaniello, S. M. Smith and A. D. Anbar, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, **109**, 9989–9994.
- 15 A. Heuser, P. Frings-Meuthen, J. Rittweger and S. J. G. Galer, *Frontiers in Physiology*, 2019, **10**, 12, DOI: 10.3389/fphys.2019.00012.
- 16 A. Heuser and A. Eisenhauer, *Bone*, 2010, **46**, 889–896.
- 17 J. L. L. Morgan, G. W. Gordon, R. C. Arrua, J. L. Skulan, A. D. Anbar and T. D. Bullen, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 6956–6962.
- 18 J. D. Kenealey, A. S. Polans and N. J. Colley, Calcium in Vision, in *Encyclopedia of Metalloproteins*, ed. R. H. Kretsinger, V. N. Uversky and E. A. Permyakov, Springer, New York, 2013.
- 19 L. Tong, W. Lan, R. R. Lim and S. S. Chaurasia, *Ocul. Surf.*, 2019, **12**, 23–31.
- 20 M. Costas-Rodríguez, J. Delanghe and F. Vanhaecke, *TRAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, **76**, 182–193.
- 21 S. D. Crish and D. J. Calkins, *Neuroscience*, 2011, **176**, 1–11.
- 22 M. Shahidullah, W. Hassan and N. A. Delamere, Mechanism of Aqueous Humor Secretion, Its Regulation and Relevance to Glaucoma, in *Glaucoma – Basic Clin. Concepts*, ed. S. Rumelt, IntechOpen, 2011.
- 23 M. Tamhane, S. Cabrera-Ghayouri, G. Abelian and V. Viswanath, *Pharm. Res.*, 2019, **36**, 40.
- 24 T. Tacail, E. Albalat, P. Télouk and V. Balter, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 529–535.
- 25 R. Grigoryan, M. Costas-Rodríguez, R. E. Vandenbroucke and F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1130**, 137–145.
- 26 Y. Zhou, F. Hong, X. Wang, J. Feng, D. Zhu, Y. Xu and Y. Tao, *Eye*, 2019, **33**, 1606–1612.
- 27 K. Yavuzer and Y. Akinay, *Curr. Eye Res.*, 2021, **46**, 490–495.
- 28 J. Dolar-Szczasny, A. Swiech, J. Flieger, M. Tatarczak-Michalewska, P. Niedzielski, J. Proch, D. Majerek, J. Kawka and J. Mackiewicz, *Molecules*, 2019, **24**, 1–15.
- 29 C. J. Kim and S. K. Choi, *Korean J. Ophthalmol.*, 2007, **21**, 90–94.
- 30 M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro and F. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, DOI: 10.1007/s00216-021-03467-5.
- 31 O. V. Moroz, K. S. Wilson and I. B. Bronstein, *Amino Acids*, 2011, **41**, 761–772.

## 2. Otras publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral

- Cruz-Alonso, M., Lores-Padín, A., Valencia, E., González-Iglesias, H., Fernández, B., Pereiro, R. (2019). **“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(3), 549-558.
- Aranaz, M., Valencia-Agudo, E., Lobo, L., Pereiro, R. (2022). **“Microsampling of biological fluids for elemental and isotopic analysis by ICP-MS: strategies and applications for disease diagnosis”** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(1), 50-68.

**Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation–ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered**

María Cruz-Alonso, Ana Lores-Padín, Eva Valencia, Héctor González-Iglesias, Beatriz Fernández, Rosario Pereiro

*Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(3), 549-558



## 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

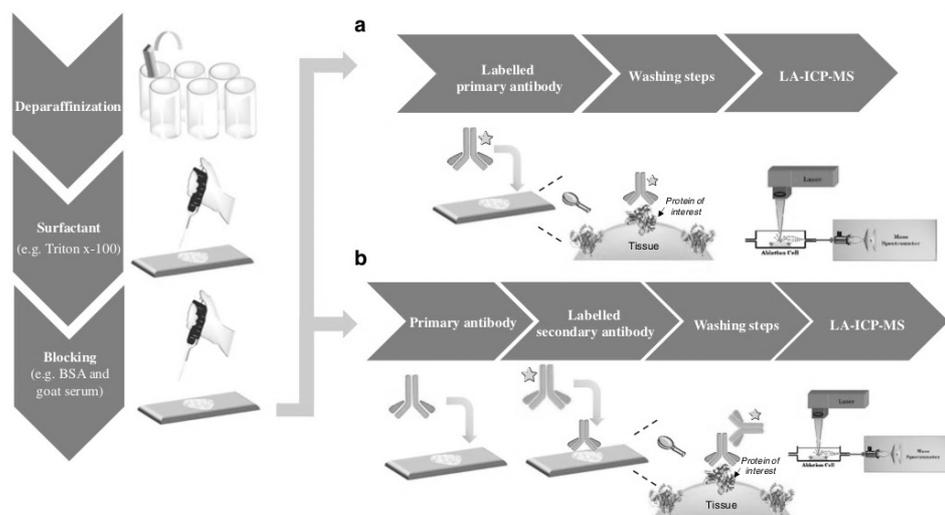
Quantitative elemental information on heteroatoms naturally present in biological tissues can be achieved by LA-ICP-MS by use of appropriate calibration standards (e.g. homogenized and spiked tissues, agarose gels, gelatin and polymeric films) [25, 30–35]. However, the analytical concept is more complex 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- $\mu$ 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].

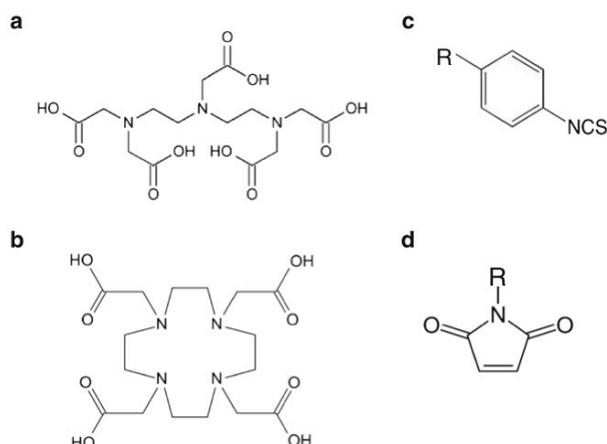
Bz-SCN-DOTA lanthanide complexes [47], which bind to lysine residues, have been applied in several LA-ICP-MS applications, such as the multiparametric analysis of cytochrome P450 isoenzymes after electrophoretic separation and blotting [48], or the multiplexed IHC detection of the tumour markers human 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

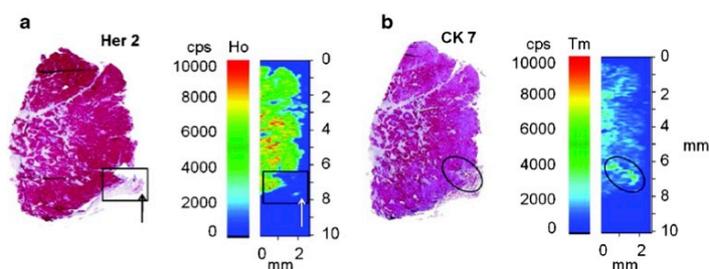


nm-long linear X8 polymer containing about 22 chelators per polymer and the branched DN3 polymer with 5-nm diameter and containing about 16 chelators per polymer. The metal polymeric label is bound to the antibody through a maleimide linker, by disulfide reduction. Typically, four or five such polymers 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

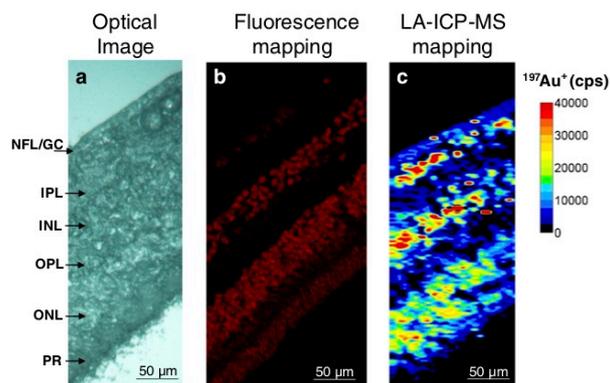
room for improvement of the ratio of “number of detectable metal atoms per label size”. Moreover, the risk of non-specific interactions has been reported in the case of IHC procedures in biological tissues [49].

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-µm 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, Meemann 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>.
- Careri M, Elviri 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/c3ja50277c>.
22. Majonis D, Herrera I, Ornaty 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, Vanhaccke 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, Vanhaccke 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, Ornaty 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.jymeth.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 quantitative immunoassay 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. Hoels S, Neumann B, Techriz 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, Techriz 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. Boutoureira 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, Waentig 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, Omatsky 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, Vanhacck 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>.

**Microsampling of biological fluids for elemental and isotopic analysis by ICP-MS: strategies and applications for disease diagnosis**

**Marta Aranaz, Eva Valencia-Agudo, Lara Lobo, Rosario Pereiro**

*Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(1), 50-68

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, 37, 50

## Microsampling of biological fluids for elemental and isotopic analysis by ICP-MS: strategies and applications for disease diagnosis

Marta Aranaz,<sup>†</sup> Eva Valencia-Agudo,<sup>†</sup> Lara Lobo<sup>✉\*</sup> and Rosario Pereiro<sup>✉</sup>

Human biological fluids are quite varied and complex. Some examples include blood, cerebrospinal fluid, synovial fluid, peritoneal fluid, intraocular fluids, and fluids that do not require an invasive sample uptake, such as lacrimal fluid, seminal fluid, sweat, urine and saliva. They are present in the body in very different volumes, from the low microliter level to the liter range. For those requiring invasive sampling, just a small percentage can be sampled in order not to disrupt the living body. Furthermore, quite often, the extracted samples must be divided into several aliquots required for different independent (bio)chemical assays. In addition, volumes of biofluids are much smaller in new-borns and infants. Therefore, just a microvolume of the biofluid is quite often available for analysis. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is a suitable technique for elemental and isotopic determination of biological fluids at the trace and ultra-trace levels. Such determinations contributes to the interpretation of biochemical processes within our bodies and in many cases serve for the diagnosis of diseases. A research trend along the years has been to increase the capabilities of ICP-MS for the analysis of microsamples. This review focusses on strategies for microsample collection of fluids from the human body and their introduction into an ICP-MS. In addition, representative examples of applications in the clinical field are briefly described.

Received 22nd September 2021  
Accepted 4th November 2021

DOI: 10.1039/d1ja00328c

rsc.li/jaas

### 1. Introduction

It is well-known that metals such as Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Cu, Zn and Mo are essential for humans and our body must have appropriate amounts of them.<sup>1</sup> Disruption of metal homeostasis caused by element deficiency, or imbalance, induces detrimental intracellular events, including oxidative stress, inflammation, DNA fragmentation, protein misfolding and activation of apoptosis, giving rise to pathogenesis and progression of many diseases.<sup>2</sup> Moreover, the detection in body fluids of metals such as Ti, V, Cr, Al, Co, Ni, Zr and Mo leaching from prostheses and implants (e.g. made of titanium alloys, stainless steel, high-strength alloys, alumina or zirconia),<sup>3,4</sup> as well as the unnoticed exposure to, or intake of, toxic elements (e.g. Cd, Pb, Hg and Tl)<sup>5</sup> also requires highly sensitive analytical techniques.

Inductively coupled plasma – mass spectrometry (ICP-MS) is a suitable technique for elemental determination of biological fluids, as it enables reliable analysis at the trace and ultra-trace levels with a wide dynamic range.<sup>6</sup> Many advances have been made in the last thirty years to improve analytical capabilities of ICP-MS instruments. For instance, sector field (SF)-ICP-MS,

collision/reaction cell (CRC) quadrupole ICP-MS, and tandem ICP-MS allow for reduction of spectral interferences, while time of flight (TOF) ICP-MS permits quasi-simultaneous multi-elemental analysis. On the other hand, improvements in electronics for fast data acquisition, including shorter dwell and settling times, make ICP-MS ideal for time-resolved analysis applications such as single particle (sp) and single cell (sc) detection.<sup>7–10</sup> All these developments contribute to improve the understanding of the role of trace and ultratrace elements in biological processes and under different medical conditions.

In addition, high precision isotopic analysis can be achieved with the multicollector (MC)-ICP-MS. The accurate measurement of isotopic ratios in biofluids may contribute to interpret biochemical processes within our bodies and to serve as potential diagnosis/prognosis markers of diseases, providing complementary information to the elemental analysis. It is well known that a low amount of sample and/or a low target isotope concentration can strongly compromise applications focused on high-precision isotopic analysis of biofluids by MC-ICP-MS.<sup>11</sup> The use of aerosol desolvating systems, high-efficiency jet interfaces, high gain Faraday cup amplifiers ( $10^{13} \Omega$  with respect to the  $10^{11} \Omega$  conventional ones) and ion counter devices has proved to enhance instrument sensitivity.<sup>12,13</sup> Methods based on sample mixing of the analyte with a non-enriched in-house standard,<sup>14</sup> the use of droplets of serum deposited on silicon,<sup>14</sup>

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: lara.lobos@uniovi.es

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

or preconcentration procedures,<sup>15</sup> have been proposed to extend the applications of MC-ICP-MS within a clinical context.

Of course, physiology and pathophysiology depend not only on elemental and isotopic concentrations, but also on the oxidation/reduction states and on the variety of compounds to which they can be bound to, such as proteins with different functions (e.g. storage and transport metalloproteins, metalloenzymes, or signal-transduction metalloproteins), or inorganic ligands such as metal chelators. The most powerful analytical strategies for metal speciation require the initial separation of the sought species by chromatographic or electrophoretic methods and then the detection of the metal content of the isolated species.<sup>16</sup> Sample volumes introduced in such separation systems are small and, in those cases where the separation technique is on-line connected to the detector, analytical signals follow a transient pattern.

Fig. 1 shows examples of human biological fluids which have been analysed by ICP-MS (the figure has been particularized for women; so it should be taken into account that some of those

fluids are not present in men, while men have other exclusive fluids, such as seminal fluid). Also, typical volumes present in the body of an adult have been indicated in Fig. 1. Evidently, for many biofluids (particularly for those cases requiring invasive sampling), just a small percentage can be sampled in order not to disrupt the living body. Furthermore, it must be noted that, quite often, the extracted samples must be divided into several aliquots required for different independent (bio)chemical assays. In addition, volumes of fluids are much smaller in newborns and infants. Moreover, although the focus of this review is human research, it must be kept in mind that before human research, animal experimentation is often necessary, and these animals often have even lower fluid volumes available. Therefore, the sample amount available for ICP-MS analysis can be minute in many applications. This will particularly affect the analysis of elements at very low native concentrations because the dilution step to get enough volume for conventional solution nebulisation is not feasible.

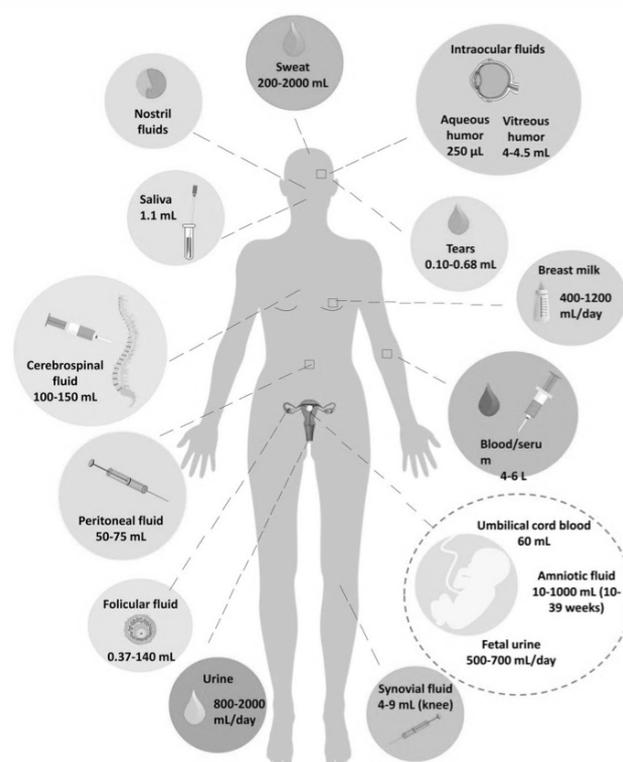


Fig. 1 Selection of body fluids whose elemental concentrations have been analyzed by ICP-MS (in the figure it has been particularized for women). Typical volumes present in the body of an adult have been indicated between parentheses.

The number of publications addressing the elemental and/or isotopic analysis of human biological fluids by ICP-MS is immense. Development of approaches for sampling and analysis of minimum amounts of biofluids is a current research trend. This review is focused on the strategies for microsample collection of fluids from the human body and their introduction into an ICP-MS. Besides, representative examples of applications either to establish reference concentrations or for diagnosis of diseases will be briefly described.

## 2. Overview of microsample introduction systems into the ICP

Micro-flow nebulizers combined with small spray chambers, allowing sample delivery rates below  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ , offer a great potential for elemental and isotopic determination of small volumes of biological fluids by ICP-MS.<sup>17–19</sup> In addition, they can serve as an interface for on-line coupling of very low-flow continuous separation methods (e.g. capillary chromatography<sup>20</sup> and capillary electrophoresis<sup>21</sup>) to ICP-MS for speciation purposes. The ICP-MS signals are proportional to the amount of analyte entering into the plasma per time unit, so, an efficient introduction system is required for sample delivery rates much lower than the typical  $1\text{--}2 \text{ mL min}^{-1}$  of conventional nebulizers.

Micronebulizers usually have similar arrangements to conventional ones, but their critical dimensions are reduced, providing finer aerosols. This fact, along with the decrease in water coalescence inside small chambers, leads to an increase of the analyte transport efficiency. Micronebulizers and spray chambers of different materials such as glass, quartz, PFA, PEEK, Teflon®, etc. are available, being selected as the material based on the application (e.g. to permit the introduction of organic solvents or hydrofluoric acid, or to avoid contamination in ultra-trace analysis). Different designs of pneumatic micronebulizers have been investigated, such as those based on microconcentric flow,<sup>22</sup> cross-flow,<sup>23</sup> parallel path<sup>24</sup> and flow burring.<sup>25</sup> Fig. 2 shows the schematics of some of such devices. The most popular ones are the microconcentric configurations. Also, parallel path designs are rather common.

The suction in concentric nebulizers allows for self-aspiration, thus eliminating the need for peristaltic pump tubing (a

potential source of contamination) and consequently reducing the signal noise. However, changes in the solution viscosity must be controlled in the self-aspiration mode, because viscosity affects the aspiration flow rate. Low flow rates could be introduced in conventional concentric nebulizers, but aerosol generation becomes erratic if the delivery rates are considerably lower than those obtained by natural aspiration. To overcome such problems, microconcentric nebulizers have been developed with reduced i.d. of the liquid capillary and a smaller gas exit cross-sectional area as compared to the conventional counterparts. The capillary i.d. and its position with respect to the nebulizer nozzle are important variables. A vast number of slight modifications of microconcentric nebulizers have been evaluated and several are commercially available, such as the so-called high efficiency nebulizer (HEN) made of borosilicate glass or quartz,<sup>26</sup> without capillary tip recess. It is designed to operate at a sample flow lower than  $0.3 \text{ mL min}^{-1}$  and has a small gas cross-section in order to obtain a higher nebulizing gas velocity and small droplets. The HEN design can be especially useful for very clean samples. On the other hand, the MicroMist (made of glass, VitriCone® technology) and the OpalMist (made of PFA)<sup>27</sup> nebulizers have the liquid capillary recessed with respect to the nebulizer tip, thus allowing for a relatively high content of solids in the sample. There are commercially available MicroMist models with natural sample uptake rates of 0.05; 0.1; 0.2; 0.4 and  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ , and OpalMist models with natural uptake rates of 0.01; 0.05; 0.1; 0.2; 0.4; 0.6; 1 and  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Another example is the so-called PFA Micro-Flow nebulizer<sup>28</sup> whose sample capillary is more recessed than in the case of the MicroMist design (6 mm *versus* about 1 mm, respectively). Therefore, in that case the liquid and gas interaction occurs inside the nebulizer, promoting the production of fine droplets. Models commercially available include PFA-20, PFA-50, PFA-75, PFA-100, PFA-200 and PFA-400; the number is related to the free aspiration flow rate.

Parallel path nebulizers (see Fig. 2c) do not require a critical alignment of the gas and the liquid streams as in the case of the concentric ones, the liquid being introduced into the gas stream by the low pressure around it. Any liquid caught in the gas flow is pushed away with the gas, and broken into small droplets. Due to the configuration of these nebulizers, the liquid channel

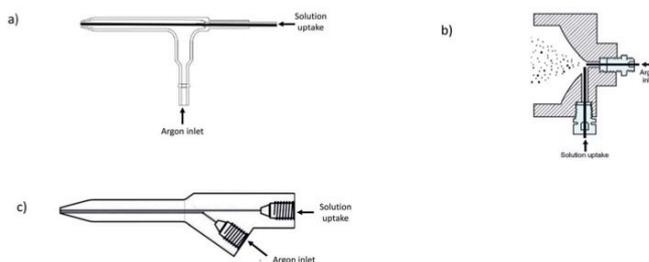


Fig. 2 Schematics of three examples of micronebulizers employed in ICP-MS: (a) microconcentric flow, (b) cross-flow (reprinted with permission from ref. 23. Copyright 2021 American Chemical Society), and (c) parallel-path.

can be thicker than in the microconcentric designs, thus preventing tiny particles in the liquid plugging the sample path. Therefore, parallel path nebulizers offer advantages when samples contain undissolved particulates. Different models of nano- and micro-low flow parallel path nebulizers are commercially available,<sup>29</sup> such as the Enya Mist model with a sample capillary of 60  $\mu\text{m}$  i.d. and tolerating flow rates of 0.002–0.050  $\text{mL min}^{-1}$  (it allows direct connection to micro HPLC), the Ari Mist HP (sample capillary of 150  $\mu\text{m}$  i.d. and flow rates of 0.005–1  $\text{mL min}^{-1}$ ), and the PFA 250 and PFA 260 (sample capillary of 250  $\mu\text{m}$  i.d. and flow rates of 0.050–2  $\text{mL min}^{-1}$ ), among others. Parallel path nebulizers have no suction, so liquids must be pumped.

The main types of spray chambers used in ICP-MS are the single-pass cylindrical type, the so-called Scott type (double-pass), and those based on cyclonic designs. Cyclonic spray chambers can be single-pass or double-pass (the central transfer tube of the double-pass acts as a secondary droplet filter to reduce the mean droplet size, thus reducing matrix effects and improving precision). The typical inner volumes of conventional chambers, around 50 mL, are reduced to 20 mL or less for micronebulizer coupling.

Alternatively, total sample consumption systems, enabling very low liquid flow rates and with a sample transport efficiency close to 100%, have become popular, offering competitive sensitivity and minimized matrix effects (interferences associated with the sample introduction system may be removed for analyte transport efficiency close to 100%).<sup>30</sup> They consist of two main groups: (i) those for which the spray chamber is removed such as the direct injection nebulizer (DIN),<sup>31</sup> or the direct injection high efficiency nebulizer (DIHEN)<sup>32</sup> with variants such as the large bore DIHEN<sup>33,34</sup> and the demountable DIHEN,<sup>35</sup> and (ii) those having the micronebulizer associated with a very small single-pass spray chamber. In this case, almost 100% of the solvent is evaporated at the low flow delivery rates used. Such an approach has been called a “torch integrated sample introduction system” (TISIS).<sup>30</sup> One of these systems is commercially available: DS-5 microflow concentric nebulizer, for very low-flow applications (3 to 10  $\mu\text{L min}$ ). The kit contains a low-volume spray chamber connected to the base of the ICP-MS torch.<sup>36</sup> The heating of the chamber (hTISIS)<sup>37</sup> and the addition of a sheathing gas flow<sup>30</sup> to TISIS configurations can contribute to enhance the aerosol evaporation as well as to prevent the impact of droplets against the walls, thus increasing the sensitivity. The hTISIS has been proved appropriate for the analysis of samples of complex nature, such as whole blood.<sup>38</sup>

As has been mentioned in the introduction section, a current trend is the use of ICP-MS for sp and sc analysis. In the particular case of sc-ICP-MS it is crucial to employ sample introduction devices that keep cells intact and that allow a high cell transport efficiency. For such purposes it is important to prevent cell deposition on the inner walls of the spray chamber. Parameters such as cell size,<sup>39</sup> morphology and stability (determined by the composition and structure of their cellular envelope) will facilitate or hinder their transport into the plasma.<sup>40</sup> Different designs of microflow concentric nebulizers have been investigated, such as the MicroMist nebulizer in

combination with a Scott spray chamber,<sup>40</sup> or a parallel path design (Enya Mist) coupled to a total consumption low-volume spray chamber.<sup>41</sup> Additionally, dedicated combinations of micronebulizer-spray chambers to transfer the highest percentage of cells into the ICP have been developed, such as the “high efficiency cell introduction system” (HECIS) consisting of a high performance concentric nebulizer and a 15  $\text{cm}^3$  total consumption spray chamber with a sheath gas flow to minimize the deposition of cells.<sup>42</sup> With such a system, transport efficiencies close to 100% have been reported. Nowadays, dedicated sc sample introduction systems based on pneumatic nebulizers for ICP-MS detection are marketed by companies such as Glass Expansion®, Meinhard®, Elemental Scientific® or PerkinElmer®, which typically offer pseudo-total consumption capabilities. An alternative to pneumatic nebulization is the generation of highly monodisperse microdroplets through a piezoelectric actuated quartz capillary and an internal carrier gas supply, offering high cell transport efficiencies;<sup>43</sup> however, its effectiveness for the analysis of fragile cells seems not yet clear.<sup>40</sup> Alternatively, some microfluidic platforms have been designed for sc manipulation and encapsulation in microdroplets before introduction into the ICP-MS,<sup>44</sup> although the transport efficiency in this case may be not as high as desirable.

At first, the continuous introduction of a sample will allow for better signal stability. However, for complex samples the risk of nebulizer obstruction exists. An alternative option to the continuous aspiration is the introduction of tiny volumes (a few microliters<sup>38,45</sup> or even nanoliters<sup>46</sup>) of samples in a discrete mode (flow injection in a liquid carrier, or segmented-flow injection in a continuously aspirated gas such as air), giving rise to transient signals. Due to the fast data acquisition capability of modern scanning ICP-MS devices (dwell time of a few ms), the transient signal when using a micronebulizer can reach a plateau for a few microliters (e.g. 2.5–10  $\mu\text{L}$ ) of solution injected (samples or standards), allowing for the analysis of several isotopes in each plug; of course, higher multielemental capabilities will be achieved with an ICP-TOFMS system.<sup>45</sup> On the other hand, in the segmented-flow injection mode, as the carrier stream is not a liquid, the extent of sample re-nebulization from the chamber walls and the sample dispersion in liquid phase is reduced.<sup>37,38</sup> Nonetheless, reported RSD values for 10  $\mu\text{L}$  injections of 1 : 25 diluted blood samples were higher than those obtained by the continuous aspiration mode, these results being attributed to possible small changes in the sample volume injected into the air carrier stream.<sup>38</sup>

Other strategies for analysing tiny volumes of biological fluids include electrothermal vaporization (ETV),<sup>46</sup> the sampling of dried droplets of biofluids by laser ablation (LA) with a high-energy pulsed laser,<sup>47–49</sup> and the use of diode laser thermal vaporization (DLTV).<sup>50</sup>

In ETV-ICP-MS, a small amount of sample is placed in a conducting reservoir (typically a graphite furnace) which is then heated resistively to vaporize the sample. The vapour is subsequently transported into the ICP by a carrier gas (Ar) through an inert tube. ETV-ICP-MS is specially well suited for the direct analysis of solids (0.1–5 mg) and slurries,<sup>51</sup> as well as for liquid samples (5 to 50  $\mu\text{L}$ ) such as oil or petroleum

products,<sup>52</sup> because the organic matrix is easily removed. ETV-ICP-MS can offer lower detection limits and less risk of interferences as compared with sample nebulization. In addition, it is very convenient for combination with micro-extraction procedures.<sup>53,54</sup> An excellent critical review was published in 2009 about ETV-ICP-MS.<sup>56</sup> In this paper it was stated that despite that ETV-ICP-MS was initially received with great enthusiasm by the scientific community owing to the potential advantages that the coupling could bring, it did not enjoy an increased success along the years. This continues to be the same more than ten years later. In any case, it is worth noting that some interesting applications have been recently developed for ETV-ICP-MS in the biological field, such as the analysis of trace elements in small amounts of cell samples without sample preparation.<sup>55</sup>

The analysis of dried matrix spots (DMS) on a filter paper, most commonly dried blood spots (DBS), has received attention for biochemical analysis. Development of the DBS methodology was related to a high-scale application of neonatal screening programs in hospitals because the analytical procedure requires a very small volume of blood (a few microliters), just requiring pricking the heel or finger.<sup>48</sup> In addition, requirements for transportation and storage of DMS biological specimens are less strict than those for liquid samples, enabling home collection and posting them to the lab by ordinary mail. There are commercially available filter papers with different characteristics that can be used for clinical purposes. Two main requirements to achieve reproducible results in the analysis of a DMS are (i) that the capacity of absorption and dissemination of the sample on the filter paper is uniform, and (ii) that these properties are maintained between the same and different lots.<sup>48</sup> Two main approaches can be followed for elemental and isotopic determination of DMS: (i) analyte extraction or sample digestion, or (ii) direct analysis of the DMS with techniques such as LA-ICP-MS.<sup>56–58</sup> Examples of elemental and isotopic analysis of DBS specimens will be described in the applications section, collecting some pros and cons of the methodology. In addition to blood, other types of fluids, such as urine, have been analysed by LA-ICP-MS using the DMS methodology.<sup>59,60</sup>

On the other hand, the DLTV sample introduction approach employs a low-cost continuous-wave diode laser for analysis of very small amounts of sample (200 nL droplets deposited with a micropipette, or 65 pL with a piezoelectric dispenser).<sup>59,61</sup> Laser power is sufficient to induce pyrolysis of a suitable substrate with a deposited sample leading to aerosol generation. This demonstrated its suitability for the determination of Pb and Cd in whole human blood without any sample treatment.<sup>50</sup> However, to date, DLTV has been scarcely analytically exploited.

### 3. Applications for disease evaluation and/or diagnosis

In this section, representative applications of elemental and isotopic analysis focused on the use of low volumes of biological fluids are reviewed. For the samples easily accessible at

relatively high volumes, focus has been exclusively on those examples where microsamples were analysed, or in method development aiming at the analysis of low sample volumes.

Sample preparation of biological fluids for ICP-MS can be considered as simple. Biofluids are usually either thermally digested or just diluted before analysis. For thermal digestion, samples are typically heated with a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide.<sup>62</sup> On the other hand, dilute acids (*e.g.* nitric acid) or alkali solutions (*e.g.* ammonium hydroxide or tetramethylammonium hydroxide) are commonly employed diluents for direct analysis of the biological fluids. The concentration of the acid must be low (typically below 0.5%) to prevent precipitation of proteins and cell debris, while in the case of using alkali solutions a complexing agent such as EDTA is also added to avoid metal precipitation in basic media. A surfactant such as Triton™ X is frequently incorporated into the samples to help rinse the spray chamber and to aid the solubilisation of proteins and cell membranes. In some cases, a small concentration of butanol (*e.g.* 1%) is included as a source of carbon to minimize differences between samples and standards.<sup>63</sup>

For the calibration of samples which have not been previously digested, the use of matrix-matched standards is typically preferred in an attempt to mimic the matrix of the sample. For complex sample matrices where external calibration with matrix-matched standards is found to be inadequate to correct for matrix effects, the method of standard additions may be used.<sup>64</sup> In addition, as in most ICP-MS methods, an internal standard is usually added to standards and samples in order to correct for changes in instrument operating conditions and sample-specific matrix effects which may enhance or suppress the analyte signal.<sup>65</sup> Finally, it must be noted that particular care must be taken in the introduction of non-digested samples into the ICP to avoid nebulizer and injector clogging. Also, deposition of carbon compounds in the torch and/or onto sampler and skimmer cones will cause destabilization or extinction of argon plasma. Such problems may be circumvented by the addition of oxygen to the composition of the plasma.<sup>66</sup> However, in most cases this is not necessary. Considering that microsamples are introduced, a simple sample dilution is enough to work for long periods with ICP-MS.

Below, applications are divided into two groups, depending on whether an invasive sample collection procedure is required or not.

#### 3.1. Biological fluids requiring invasive sample collection

Blood is the biological fluid where elemental and isotopic analysis has been most widely studied within a clinical context. Also, cerebrospinal fluid (CSF) has been rather deeply investigated. Among other types of human biological fluids, follicular fluid, amniotic fluid, fetal urine, peritoneal fluid, synovial fluid, and intraocular fluids such as vitreous and aqueous humours can be included.

**3.1.1. Blood serum and whole blood.** Despite the invasive nature of sample collection, blood extraction by venipuncture is a very common procedure and an informed consent from

individuals is usually easily accessible. The sample volume cannot be considered an issue, though there are exceptions, such as for new-borns/infants, or when repeated sampling is required (as for chronic patients). For these cases, the analysis of DBS on filter paper is an attractive approach. For instance, Moreda-Piñeiro *et al.*<sup>56</sup> presented a method for the quantitative determination of several major (K, Na and S), minor (Ca, Cu, Fe, Mg, P, Rb and Zn) and trace elements (Al, As, Ba, I, Li, Pb, Sb, V and T) in DBS *via* LA-ICP-MS. Later, the same group published an article focused on analysis of DBS samples for metabolic disorder diagnosis in new-borns.<sup>57</sup> Moreover, a methodology was developed for the quantitative analysis of Ga-based contrast agents (metallo-drugs) based on DBS sampling and LA-ICP-MS measurements.<sup>58</sup> Also, it is interesting to note that Aramendia *et al.*<sup>67</sup> demonstrated the potential to couple a LA chamber simultaneously (by split-flow) to a MC-ICP-MS and a SF-ICP-MS, thus allowing both elemental (Co, Cu, Cd and Pb) and isotopic (Cu) information to be obtained from DBS samples.

A minimal blood sample volume can also be collected through volumetric absorptive microsampling (VAMS®), overcoming some pitfalls of DBS. The VAMS sampler consists of a holder on which an absorptive porous substrate is attached (see Fig. 3). This substrate takes up a fixed volume of specimen (*e.g.* 10  $\mu$ L) when exposed to a liquid blood sample. After collection, samples can be dried and stored or directly analysed.<sup>68,69</sup> In fact, the device resembles a pipette tip, so it can be easily integrated into an automated sample preparation procedure. VAMS shares the benefits of DBS sampling in terms of easiness, sample stability and transport efficiency. Since a constant and known volume is obtained, it becomes easier to carry out a quantitative analysis (classic DBS approaches required the use of a pipette in the sampling location to achieve that). In addition, VAMS has proven to overcome the variability associated with differences in viscosity and spreadability between blood samples spotted on filter paper from different

patients.<sup>70</sup> VAMS was applied for the determination of ultra-trace amounts of prosthesis-related metals by ICP-MS<sup>70,71</sup> and for Fe elemental and isotopic analysis.<sup>72</sup>

Literature collection methods aim at multielemental analysis of low sample volumes, with or without acid digestion, before nebulization and ICP-MS measurement. For example, Fu *et al.*<sup>73</sup> published an article focused on the rapid determination of Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, and Se in the serum of hepatocellular carcinoma (HCC) patients by tandem ICP-MS. 100  $\mu$ L serum specimens diluted to 2 mL with 1% (*v/v*) HNO<sub>3</sub> were analyzed. The samples were introduced into the ICP source with a MicroMist glass concentric nebulizer and a Peltier-cooled quartz double-pass Scott-type spray chamber. N<sub>2</sub>O gas was chosen as the reaction gas, and the mass shift method was used to eliminate spectral interferences. Elemental analysis of 210 samples (105 inpatients and 105 healthy controls) revealed higher contents of Fe and Cu and lower contents of Zn and Se in the serum of HCC patients compared to controls, whereas for Mn and Ni significant differences were not found between the two cohorts. Another example requiring only 30  $\mu$ L serum<sup>63</sup> focused on Fe, Cu and Zn elemental determination with a 100-fold dilution of the serum specimens with 1.0% butanol, 0.5% *v/v* ammonia, 0.02% *v/v* Triton X-100 and 0.01% *v/v* HNO<sub>3</sub>. After validation, the method was applied to determine Zn, Cu and Fe in human serum samples from Alzheimer's disease (AD) and age-related macular degeneration (AMD) patients. No significant differences were found for Zn and Cu levels between age matched controls, AD and AMD patients. Fe showed a larger overall variability as compared to Cu and Zn, Fe being marginally higher in the AMD group, compared with the AD group.

The concentrations of heavy metals in the sera of umbilical cord blood can provide information about prenatal exposure. The *in utero* exposure to metallic and metalloid elements was investigated by ICP-MS.<sup>74</sup> The method required 100  $\mu$ L of serum diluted 1 : 25 for direct analysis. Matrix-matched standards and kinetic energy discrimination were employed to eliminate mass matrix interferences and polyatomic ion interferences, respectively.

For isotopic analysis, most investigated elements so far are Fe, Cu and Zn, whose levels in whole blood/serum are accessible for MC-ICP-MS measurements. More recently, isotopic analysis of other metabolically relevant elements (*e.g.* S, Ca and Mg) has started to increase. Although much effort is made for method development for the measurement of accurate and precise isotopic composition, there is still work pending to extend its use for clinical purposes, especially analysing bigger cohorts. In this line, Table 1 shows applications focused on diagnosis/prognosis of different pathologies<sup>62,75-93</sup> (examples focused on method development have not been considered). Most of the applications deal with Cu followed by Fe. Few examples can be found for S, Zn, Mg and Ca, but still they underpin the potential of isotopic analysis for diagnosis/prognosis of different pathologies.

**3.1.2. Cerebrospinal fluid.** CSF is a main source of clinical information. However, the need for lumbar puncture to obtain CSF restricts its analysis except for well-justified evaluations.

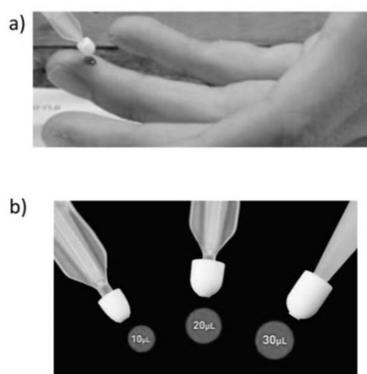


Fig. 3 Volumetric absorptive microsampling. (a) Blood collection with vams®. (b) Tips for different blood volumes (<https://www.neoteryx.com/mitra-clamshell-blood-collection-device>).

Table 1 Isotopic determinations by MC-ICP-MS, in human blood, to assess differences between diseased people versus controls

Element	Isotopic composition	Pathology	Sample introduction system	Summary of results	Ref.
Cu	$\delta^{65}\text{Cu}$	Ovarian cancer	—	The Cu isotopic composition was lighter in ovarian cancer patients than in healthy subjects	75
		Age related macular degeneration (AMD)	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	The Cu isotopic composition was lighter in AMD patients compared to controls	62
		Cholestatic liver disease	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	The Cu isotopic composition of the patients with chronic liver disease was fractionated in favour of the lighter isotopes	76
		Liver transplant patients	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	The isotopic composition in the blood serum of patients with end-stage liver disease was fractionated in favour of the lighter isotope	77
		Liver cirrhosis (LC)	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	The Cu isotopic composition ( $\delta^{65}\text{C}_{\text{uEXCH-UF}}$ and $\delta^{65}\text{C}_{\text{uSERUM}}$ values) was lower in patients with alcoholic LC compared to controls	78
				The isotopic composition in the blood serum of patients with end-stage liver disease was fractionated in favour of the lighter isotope	79
		Cancer (breast and colorectal)	—	Breast and colorectal cancer patients showed lower $\delta^{65}\text{Cu}$ values than healthy subjects	80
		Parkinsonism	—	Individual isotopic profiles showed that Cu metabolism is less controlled in patients compared to controls	81
		Wilson's disease	Sample introduction was accomplished <i>via</i> a 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer mounted onto a double pass spray chamber (a combination of a Scott-type and a cyclonic spray chamber)	Cu in serum samples from patients is significantly fractionated towards the lighter isotope when compared to healthy individuals	82
		Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	200 $\mu\text{L min}^{-1}$ quartz concentric nebulizer and a cyclonic spray chamber	Serum $\delta^{65}\text{Cu}$ values were lower in NAFLD compared to healthy controls	83
Fe	$\delta^{56}\text{Fe}$	Ferroportin Q248H mutation/diabetes	Low-flow PFA concentric nebulizer (100 $\mu\text{L min}^{-1}$ ) and a quartz spray chamber with a cyclonic and a Scott-type sub-unit	Significantly higher $\delta^{56}\text{Fe}$ values in diabetic patients	84
		Chronic kidney disease (CKD)	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA concentric nebulizer and a high-stability dual spray chamber with cyclonic and Scott-type sub-units	The serum Fe isotopic composition was heavier in patients with CKD and/or iron disorders than controls	85
	$\delta^{56}\text{Fe}$ $\delta^{57}\text{Fe}$	Hemochromatosis type 1/anaemia of chronic disease (ACD)	200 $\mu\text{L min}^{-1}$ quartz concentric nebulizer and a cyclonic spray chamber	The whole blood of patients with ACD shows a light Fe isotopic composition, whereas heavy Fe isotopic signature was obtained in the case of hemochromatosis patients. The results for hemochromatosis patients were demonstrated to coincide with low iron status, while those for ACD patients coincided with high iron status	86
				Hereditary hemochromatosis	—

Published on 05 November 2021. Downloaded on 5/5/2022 7:20:45 AM.

Table 1 (Contd.)

Element	Isotopic composition	Pathology	Sample introduction system	Summary of results	Ref.
Fe, Cu & Zn	$\delta^{65}\text{Cu}$ $\delta^{56}\text{Fe}$ $\delta^{66}\text{Zn}$	Bariatric surgery	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	Lower $\delta^{65}\text{Cu}$ values were obtained in serum and whole blood after bariatric surgery (it became gradually lighter over time), while $\Delta^{66}\text{Zn}$ (difference between serum and whole blood) was significantly increased at 6 months post-surgery	88
		Hematological malignancy	—	The Cu isotopic composition was significantly lower than the control group, whereas $\delta^{66}\text{Zn}$ tended to increase in HM patients	89
Mg	$\delta^{25}\text{Mg}$ $\delta^{26}\text{Mg}$	Diabetes type 1	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer and a dual spray chamber, consisting of a cyclonic and a Scott-type sub-unit	The serum Mg isotopic composition was significantly lighter in diabetes type 1 patients than for the reference population	90
S	$\delta^{34}\text{S}$	Breast & colon and liver & prostate cancer/hepatitis and rheumatoid arthritis	Cetac Aridus II desolvator (100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA nebulizer)	The isotopic composition of patients with non-malignant liver pathologies tends to be light, whereas breast and prostate cancer and rheumatoid arthritis do not seem to affect the average $\delta^{34}\text{S}$ serum values	91
Cu and S	$\delta^{65}\text{Cu}$ $\delta^{34}\text{S}$	Hepatocellular carcinoma patients	—	Lighter $\delta^{65}\text{Cu}$ and $\delta^{34}\text{S}$ values were reported in the blood of patients compared with that of control subjects	92
Ca	$\delta^{44}\text{Ca}$	Osteoporosis	APEX IR desolvating nebulizer	The blood Ca isotopic composition of women suffering from osteoporosis was significantly lower than the control group	93

Published on 05 November 2021. Downloaded on 5/5/2022 7:20:45 AM.

The CSF volume in adults is estimated to be about 100–150 mL, while typical collected volumes by lumbar puncture are around 3–10 mL.<sup>94–96</sup> However, such volumes are frequently not available for research purposes, as CSF is mostly dedicated to clinical diagnosis. In any case, many examples of elemental determination by ICP-MS in CSF can be found in the literature to investigate different pathologies, including chronic neuropathic pain,<sup>97</sup> amyotrophic lateral sclerosis,<sup>98–100</sup> AD,<sup>101,102</sup> or Niemann-Pick,<sup>103</sup> among others.

The high sensitivity of ICP-MS allows most of the studies reported dealing with elemental alterations for a certain pathology made use of sample dilution prior to ICP-MS measurements. Still, efforts aimed at the analysis of microvolumes of CSF were pursued. For instance, Theiner *et al.*<sup>45</sup> developed a high-throughput quantitative multi-elemental method for CSF specimens by flow injection of undiluted CSF, requiring sample volumes of only 5  $\mu\text{L}$ . Also, direct injection of small volumes of CSF employing total consumption systems operating at high temperature prior to the CRC-ICP-MS determination has been carried out.<sup>104</sup> In particular, non-diluted 2.5  $\mu\text{L}$  CSF volume was injected into a carrier gas stream in combination with a HEN, thus providing a transient signal that was integrated for data analysis. Signal stability, oxides and

double charged ions and non-spectral interferences were evaluated using the developed approach for the elemental determination of 14 elements in CSF samples both by external calibration and single-point standard addition.

Among the applications within a clinical context, alterations of essential trace elements (Mn, Co, Cu, Zn and Se) as well as contaminant elements (Al, Ni, As, Sr, Cd, Ce, Pt, Pb and U) in blood, CSF and tissue samples of patients with malignant brain tumours by means of CRC-ICP-MS have been investigated.<sup>105</sup> CSF samples from brain tumour patients ( $n = 61$ ) were compared to CSF samples of hydrocephalus patients ( $n = 51$ ). Only Cd and Sr showed lower and higher concentrations with respect to the control group ( $p < 0.05$ , Mann Whitney *U*-test). In addition, it is worth highlighting that particular attention was paid to amyotrophic lateral sclerosis. Vinceti *et al.*<sup>98,100</sup> published several articles focused on analysis and speciation of Se by using ion-exchange chromatography, HPLC and ICP-MS, finding abnormal levels for this particular pathology.

To the best of the authors' knowledge, isotopic analysis of CSF has been tackled in two publications (see Table 2). One of them presents a method for Mg isotopic analysis *via* MC-ICP-MS using high-gain  $10^{13} \Omega$  Faraday cup amplifiers. The accuracy and the precision of the Mg isotope ratios measured at a 7  $\mu\text{g}$

**Table 2** Isotopic determination by MC-ICP-MS in human biological fluids, different than blood, to assess differences between diseased people versus controls

Element	Isotopic composition	Body fluid	Pathology	Sample introduction system	Summary of results	Ref.
Mg	$\delta^{26}\text{Mg}$	Cerebrospinal (CSF)	Hydrocephalus	100 $\mu\text{L min}^{-1}$ PFA concentric nebulizer mounted onto a double spray chamber with cyclonic and Scott-type sub-units for sample introduction into the plasma	Hydrocephalus patients showed in CSF an isotopic composition of Mg similar to plasma values from healthy subjects. In contrast, this composition was found heavier than the quality control CSF material and lighter than the Seronorm reference material	12
Cu and Zn	$\delta^{65}\text{Cu}$ $\delta^{66}\text{Zn}$		Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Alzheimer disease (AD)	—	In patients with AD, $\delta^{66}\text{Zn}$ values were found slightly lighter in comparison with the control group. In the case of Cu, heavier delta values were observed in ALS patients	106
Cu and Zn	$\delta^{65}\text{Cu}$ $\delta^{66}\text{Zn}$	Aqueous humor	Glaucoma disease	—	Patients with pseudoexfoliation glaucoma showed lower $\delta^{66}\text{Zn}$ in comparison with healthy subjects. In contrast, no significant change in isotopic composition of Cu was detected	107

$\text{L}^{-1}$  concentration level using  $10^{13} \Omega$  resistors for the  $^{25}\text{Mg}$  and  $^{26}\text{Mg}$  isotopes were only slightly deteriorated as compared to those of the conventional method. Accurate and precise Mg isotope ratios could be achieved using about 5  $\mu\text{L}$  of human CSF.<sup>12</sup> The method was applied for CSF collection from hydrocephalus patients. The other publication refers to the isotopic determination of Cu and Zn in patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease.<sup>106</sup>

**3.1.3. Intraocular fluids.** Aqueous and vitreous humours are colourless intraocular fluids vital in the physiology of the eye. Aqueous humour helps to maintain intraocular pressure and structural integrity of the ocular globe, provides substrates and removes metabolites from the cornea, lens and trabecular meshwork, and participates in immune and antioxidant responses.<sup>107</sup> Vitreous humour is a gel-like substance that fills the space between the lens and the retina, providing the round shape of the eye and also contributes to vision clarity.

Access to aqueous humour is enabled by using a needle placed in the anterior chamber of the eye and volumes collected are typically below 250  $\mu\text{L}$ .<sup>108</sup> Elemental concentrations of aqueous humour have been determined by ICP-MS to investigate ocular disorders such as glaucoma,<sup>109,110</sup> AMD,<sup>111</sup> cytomegalovirus retinitis,<sup>112</sup> or pseudoexfoliation syndrome.<sup>113</sup> Changes in the aqueous humour isotopic composition may provide relevant information, complementary to that embedded in the element concentrations. A recent publication analysing aqueous humour of control and glaucoma individuals has shown statistical differences in terms of elemental concentrations of P and Mg (Na, K, Fe, Cu and Zn were investigated as well) and of the Zn isotopic composition (see Table 2).<sup>107</sup>

The volume of vitreous humour is higher than that of aqueous humour. Vitreous humour is accessible *via* surgical vitrectomies and biopsies for medical reasons. Given the

invasiveness of vitreous sampling, collection of vitreous reflux after intravitreal injections has been explored. Very few publications are available within the scope of this review.<sup>114–116</sup> Collected post-mortem vitreous humour has been analysed, and so publications are mostly focused on forensic and toxicological fields.<sup>115,117</sup>

**3.1.4. Examples of other body fluids: follicular fluid, amniotic fluid, fetal urine, peritoneal fluid and synovial fluid.** Follicular fluid (FF) is a blood-plasma ultrafiltrate that envelops oocytes in the ovarian follicle. During *in vitro* treatment, oocytes and the surrounding FF are obtained *via* a transvaginal needle. The FF is separated from the oocyte(s) during processing. Elemental analysis of FF can be of interest to assess the trace element content as well as to determine potential exposure to toxic elements in women seeking *in vitro* fertilization treatment. For instance, Galusha *et al.*<sup>118</sup> recently investigated variations of 4 elements at trace levels (Cu, Se, Sr, and Zn) and 7 at ultra-trace levels (As, Cd, Co, Mo, Mn, Hg, and Pb) in 197 human FF diluted specimens using a MicroMist nebulizer and tandem ICP-MS. The results showed a significantly lower concentration of Cd and Pb as compared to previous studies, this being attributed to the efforts to minimise sample contamination during the collection step.

Samples of amniotic fluid, the protective liquid that surrounds the fetus during pregnancy within the amniotic sac, can be obtained by amniocentesis. A few mL of liquid is extracted through a fine needle inserted into the uterus through the abdomen, under ultrasound guidance. Current knowledge of the concentration of elements in amniotic fluid and their role in fetal growth is limited. However, considering that the fetus swallows amniotic fluid, it may be an essential source of dietary components. In this line, determination of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS has been

carried out.<sup>119</sup> Samples were collected during cesarean section by transabdominal puncture just before delivery. An aliquot of each sample was digested with HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A dynamic reaction cell (DRC) with two reaction gases, ammonia and oxygen, was employed in the measurement with ICP-MS to eliminate spectral interferences. Particular attention was focused on the validation of the procedure and evaluation of traceability and uncertainty. Analysis of amniotic fluid from 50 healthy Caucasian women at birth was carried out. Although the cohort is small, it contributes to further establish reference values for the concentration of selected essential and toxic elements in the amniotic fluid.

Regarding fetal urine, a method for the determination of 21 macro and trace elements in very low volumes (200–1000  $\mu$ L) using a single analytical run by ICP-MS equipped with a DRC has been proposed.<sup>120</sup> For sampling, a vesico-amniotic shunting procedure was applied under continuous ultrasound guidance using a shunt that was inserted through the maternal abdomen. A MicroMist nebulizer (0.1 mL min<sup>-1</sup>) and a low volume spray chamber (20 mL cyclonic Cinnabar) were employed. The samples were diluted with HNO<sub>3</sub> and analysed without further treatment. The analytical procedure was applied to 58 samples collected from human foetuses. The comparison of measured concentrations of physiological elements with the literature provides no definitive conclusions. However, the concentration of toxic elements, As, Cd and Pb, was found lower in fetal urine than in the adult urine, which might be due to the additional mechanisms of protection from xenobiotics in the mother's placenta.

Peritoneal fluid is a serous fluid (commonly 5 to 20 mL total) in the abdominal cavity, which lubricates the surface of organs in the abdomen. Sampling of peritoneal fluid is generally performed by paracentesis. An interesting application of ICP-MS relates to the study of the evolution of the concentration of platinum after hyperthermic intraperitoneal perioperative chemotherapy (HIPEC) with oxaliplatin in a patient diagnosed with peritoneal carcinomatosis.<sup>121</sup> Plasma, plasma ultrafiltrate, urine and peritoneal fluid were sampled at 5 min time intervals. Specimens were diluted 1000-fold with 0.5% HNO<sub>3</sub> and mixed on a vortex-mixer prior to ICP-MS analysis using a PFA micro-flow nebulizer and a quartz cyclonic (Peltier cooled) spray chamber. The method could be easily implemented in a routine setting for pharmacokinetic studies in patients treated with oxaliplatin-based HIPEC.

Synovial fluid, a viscous fluid (with an egg white-like consistency) found in the knee joint, has a total volume usually below 3.5 mL. Its principal role is to reduce friction between the articular cartilage of synovial joints during movement. Sixteen elements in 250  $\mu$ L synovial fluid samples taken from patients with rheumatoid arthritis were determined by ICP-MS.<sup>122</sup> Before analysis, the samples were pretreated with 250  $\mu$ L formic acid, and the mixture was shaken vigorously. Then, the flask was kept at 90 °C in a water bath for 30 min and the volume was completed to 2.5 mL with water and nitric acid to a final concentration of 1%. The use of a PFA microconcentric nebulizer operating at a low flow rate (200  $\mu$ L min<sup>-1</sup>) and a cooled quartz cyclonic spray chamber enabled the introduction of

sample solutions with high organic contents, thus, allowing the development of a fast sample pretreatment method to identify the elemental profile of human synovial fluid generated in joint disorders. Also, an ICP-MS method was developed to determine Co in synovial fluid to investigate leaching of implants containing this element.<sup>123</sup>

### 3.2. Biological fluids allowing non-invasive sample collection

In recent years, increasing attention is being paid to the determination of metals/isotopes in human biofluids not requiring invasive sampling, such as urine, saliva, lacrimal fluid, nasal exudate, seminal fluid, breast milk and sweat to establish correlations with the human body state or to detect particular diseases. Of course, collection procedures and available sample volumes are very different for each type of fluid. Below are presented examples for most of the fluids above collected, excepting seminal fluid and breast milk. Elemental concentrations of seminal fluids have been principally investigated to evaluate semen quality in terms of male reproductive parameters,<sup>124,125</sup> or to correlate the concentrations of elements depending on donors' habits (*e.g.* Cd for smokers).<sup>126</sup> Regarding breast milk, a lot of research has been done along the years with varied goals, such as to investigate the effect of maternal dietary intake on breast milk composition,<sup>127</sup> the potential exposure of infants to toxicants through breast milk,<sup>128</sup> or to establish reference values for elaboration of formula milk (baby formula or infant formula).<sup>129</sup> Considering that this fluid is mostly used for feeding purposes, we consider that a detailed description of its characterization by ICP-MS is out of the scope of this review.

**3.2.1. Urine and saliva.** The elemental and/or isotopic analysis of urine can provide information about body diseases,<sup>59,130</sup> liberation of metals from implants,<sup>131</sup> intoxication with heavy metals<sup>132,133</sup> and their removal along treatment,<sup>134</sup> contamination with actinides,<sup>36,135</sup> *etc.* In addition, sp-ICP-MS has been investigated for the characterization and determination of nanoparticles (NPs) made of titanium dioxide,<sup>136,137</sup> silver,<sup>137</sup> or platinum<sup>138</sup> expelled in urine. On the other hand, elemental and/or isotopic analysis of saliva can be of interest to evaluate mouth diseases such as periodontitis<sup>139</sup> and periodontal status,<sup>140</sup> taste disorders,<sup>141</sup> the liberation of metals from dental implants and orthodontic appliances,<sup>142</sup> the effects of smoking,<sup>143</sup> and illnesses such as diabetes mellitus.<sup>144</sup> In addition, these fluids have been investigated as alternatives to blood for the routine control of workers at risk of occupational exposure (*e.g.* to lead).<sup>145</sup>

Sample uptake is easy in both cases, though some care must be taken to avoid the influence of recent food intake or digestion. Obviously, urine and saliva are fluids with few or no restrictions related to volume availability. In any case, some methods requiring low volumes have been developed, such as the analysis of dried urine spots by LA-ICP-MS either for the direct determination of several elements in urine,<sup>59</sup> or for the determination of Cu isotope ratios in order to diagnose Wilson's disease.<sup>60</sup> Also, the analysis of nanovolumes by flow injection,<sup>36</sup> or the use of continuous sample introduction

systems at low flow rates using a DIHEN nebulizer<sup>135</sup> (0.06  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) and a LB-DIHEN<sup>132</sup> (120  $\mu\text{L min}^{-1}$ ), allowing the use of high volumes of contaminated samples<sup>135</sup> and rinse-out times of elements susceptible to memory effects such as Hg to be reduced,<sup>132</sup> has been proposed.

**3.2.2. Lacrimal (tear) fluid.** Lacrimal (or tear) fluid consists of a thin film formed by an external lipid layer, a middle aqueous layer and an inner protein layer. It is mostly composed of water (90%) and to a much lesser extent by proteins, lipids, electrolytes and trace elements. Tear production is estimated to be at the 1  $\mu\text{L min}^{-1}$  rate.<sup>146</sup> Tears are collected either by a glass microcapillary of 5–10  $\mu\text{L}$  inner volume (see Fig. 4a), with Schirmer strips (see Fig. 4b), or other absorbent materials such as minisponges, or flushing the eye with a saline solution that is later collected.<sup>108</sup> In the first case, the microcapillary is placed at the inferior meniscus of the eye (blinking is recommended to prevent induction of reflex tearing).<sup>147</sup> The Schirmer test consists of placing paper strips inside the lower eyelid (inferior fornix) of both eyes for a fixed time to measure production of tears. If required, analytes can then be leached out from the strip for (bio)chemical analysis (with the subsequent risk of contamination, or loss of the analytes due to not quantitative recoveries). On the other hand, in the case of using a saline solution to collect the tear, it must be taken into account that sample dilution is accomplished.

Tear fluid has been analysed to investigate ocular disorders by means of proteomics and lipidomics.<sup>148,149</sup> However, very few research articles can be found for trace elemental determination in human tears. In 2017, Cancarini *et al.*<sup>150</sup> determined concentrations of Cu, Zn, Se, Rb, Ba, Pb, Mn, Co and Cr in tear fluid and serum of Diabetes type II individuals ( $n = 47$ ) with respect to a non-diabetic group ( $n = 50$ ). 10  $\mu\text{L}$  tear fluid was collected using Schirmer strips, and then subjected to acid exposure. A 1 : 500 dilution allowed for ICP-MS quantitative analysis by external calibration. Investigated elements were found to be at the  $\text{ng mL}^{-1}$  level. After statistical analysis, higher levels were found for Zn, Cr, Co, Mn, Ba and Pb in tear fluid from diabetic patients as compared to the control group.

Following a similar methodology, lower levels of Pb and Ba and higher levels of As were found in tears of supposedly healthy individuals from rural areas as compared to urban living areas.<sup>151</sup>

**3.2.3. Nostril fluids.** The elemental content of nostril fluids has not been much investigated. However, the recent description of the cerebral lymphatic drainage system, showing vessels draining to the nostrils and cervical lymph nodes,<sup>152</sup> opened up new opportunities for obtaining information from the central nervous system. The olfactory nerve, which crosses the cribriform plate at the base of the ethmoid bone, leaves room for releasing soluble species and cells. Within this context, two studies<sup>153,154</sup> have shown that the iron concentration in nasal exudates (sampling was carried out with swabs making circular movements in the area closest to the upper turbinate for 3 seconds in each nostril, stored at 4 °C and diluted in a 2%  $\text{HNO}_3$  solution before ICP-MS measurement) can allow differentiation between haemorrhagic and ischemic strokes. Thus, determination of metals and metalloids at trace and ultratrace levels in small nasal exudate samples deserves further studies because interesting information from the brain could be achieved.

In a forensic study gunshot residues (GSRs) in nasal samples were detected by monitoring 15 elements that are usually associated with GSRs. Nostrils were sampled by rubbing a swab (pre-moistened in a solution of 2% EDTA) in the same direction throughout the inner wall of the nostril to collect inorganic gunshot residues after shooting, and then the swabs were analysed by LA-ICP-MS.<sup>155</sup> The results proved that the GSRs persisted for longer periods in nasal mucus than on the hands of the shooters, and that the LA method enabled the reduction of the swab analysis time.

**3.2.4. Sweat.** Numerous factors can significantly impact the reliability of sweat analysis including anatomical site of sweat sampling, skin integrity and preparation, temperature and humidity at the sweat collection room, sweat collection method, *etc.*<sup>156</sup> Procedures for sweat sampling after induction of perspiration or just passive sampling can be carried out. Commercial sweat collection devices are available such as the

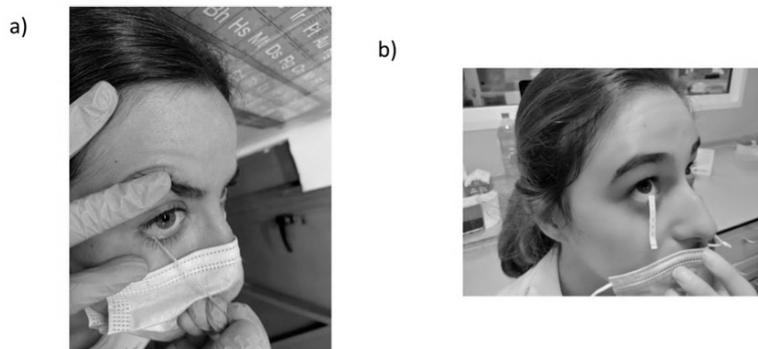


Fig. 4 Collection of tears for analysis: (a) collection with a glass microcapillary. (b) Collection with schirmer strips.

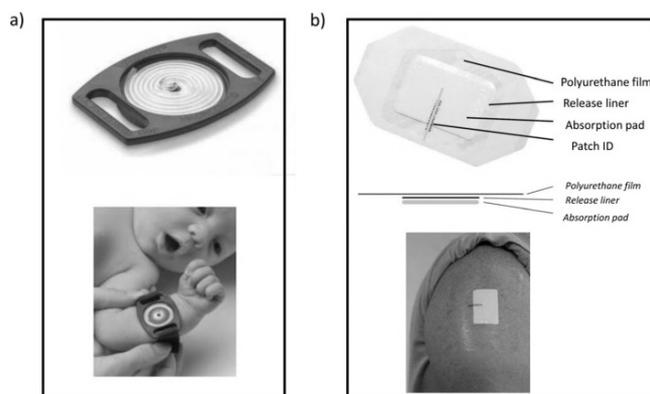


Fig. 5 Examples of commercial sweat collection devices: (a) macroduct® sweat collector from elitechgroup (<https://www.elitechgroup.com/germany/product/macroduct-sweat-collection-system-2>), (b) pharmchek® sweat patch from pharmchem, inc. (<https://www.pharmchek.com/products/pharmchek-patch>).

Macroduct® sweat collector (see Fig. 5a) or the PharmChek® sweat patch (see Fig. 5b). Of course, non-commercial techniques of sweat collection have also been described.<sup>156</sup>

The Macroduct® sweat collector employs a plastic capillary-coil device: sweat secreted by the sweat glands is forced from the ducts under hydraulic pressure and flows between the skin and the concave undersurface of the Macroduct collector and into the micro bore tubing spiral. The system allows an exact volume of sweat to be collected. The PharmCheck® sweat patch consists of a medical-grade absorption pad covered by a thin layer of polyurethane and an adhesive to fix against the skin. The adhesive film of the patch is a semi-permeable membrane that allows oxygen, carbon dioxide, and water vapour to pass through, while non-volatile species are trapped in the absorbent pad of the patch.

Several research studies related to elemental analysis of sweat by ICP-MS address studies of elimination of bio-accumulated toxic elements, comparing normothermic and hyperthermic conditions, or after physical exercise.<sup>157,158</sup> In other studies, the release of essential elements such as Fe<sup>159</sup> or Mg and P<sup>160</sup> has been investigated. Although a non-metal, a few words must be reserved for the quantification of chloride in sweat of new-borns by ICP-MS to detect cystic fibrosis, the commonest, inherited life-shortening condition of childhood.<sup>161,162</sup> Coulometric titration is commonly used for such purposes; however ICP-MS has proved to offer sensitivity for the recently reduced sweat Cl reference interval accepted for infants. Other advantages include the low sample volume requirements and the addition of an internal standard.

#### 4. Conclusions

The high sensitivity provided by ICP-MS allows its application to many multielemental and isotopic analyses of biological fluids,

just making use of a simple dilution step. However, for analysis of elements at very low concentrations this is not feasible because measured levels will be below detection limits. This makes it mandatory to resort to special microsampling introduction systems if very low sample volumes are available. For such purposes, strategies such as micronebulizers for continuous sample aspiration, flow injection, ETV-ICP-MS, LA sampling of DMS, *etc.*, have been developed and applied, all of them with advantages and disadvantages. At present, efforts are being made to develop new or improved sample introduction systems, such as on-line coupling of microfluidic systems to ICP-MS. Over the last decade, this combination has been mainly exploited for the analysis of droplet encapsulated single cells and lysed cell populations.<sup>44</sup> In addition, recent work addressed the accurate metal determination in any sample of limited volume using microfluidic chips connected to ICP-MS.<sup>163</sup>

To select the sample introduction method, not only the characteristics of the biological fluid, but also the intended application (*e.g.* number of samples, place of sample uptake, *etc.*) must be taken into account. Regarding this last issue, and especially for those biofluids for which it is not so common to carry out elemental/isotopic determination, particular care is needed to develop updated protocols of the sampling procedure and the storage, to avoid sample contamination with the sought elements.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

#### Acknowledgements

This work was supported through project PID2019-107838RB-I00/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/

501100011033). E. Valencia-Agudo acknowledges the FPI Grant (Ref. BES-2017-080518) from the Ministry of Economy and Competitiveness. M. Aranaz acknowledges the "Plan de Apoyo y Promoción de la investigación" grant (Ref. PAPI-20-PF-04) of the University of Oviedo.

## References

- 1 M. A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana and V. M. Nurchi, The essential metals for humans: a brief overview, *J. Inorg. Biochem.*, 2019, **195**, 120–129.
- 2 C. M. Weekley and C. He, Developing drugs targeting transition metal homeostasis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2017, **37**, 26–32.
- 3 M. Merola and S. Affatato, Materials for hip prostheses: a review of wear and loading considerations, *Materials*, 2019, **12**, 495.
- 4 A. Sarmiento-González, J. M. Marchante-Gayón, J. M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jiménez and A. Sanz-Medel, ICP-MS multielemental determination of metals potentially released from dental implants and articular prostheses in human biological fluids, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **382**, 1001–1009.
- 5 N. B. Ivanenko, A. A. Ganeev, N. D. Solovyev and L. N. Moskin, Determination of trace elements in biological fluids, *J. Anal. Chem.*, 2011, **66**, 784–799.
- 6 R. S. Amais, G. L. Donati and M. A. Z. Arruda, ICP-MS and trace element analysis as tools for better understanding medical conditions, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, **133**, 116094.
- 7 J. Hu, D. Deng, R. Liu and Y. Lv, Single nanoparticle analysis by IC-MS: a potential tool for bioassay, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 57–67.
- 8 D. Mozhayeva and 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, **35**, 1740–1783.
- 9 H. Wang, M. He, B. Chen and B. Hu, Advances in ICP-MS-based techniques for trace elements and their species analysis in cells, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1650–1659.
- 10 M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, **132**, 116042.
- 11 M. Costas-Rodríguez, L. Lobo and F. Vanhaecke, A novel approach to measure isotope ratios via multi-collector—inductively coupled plasma—mass spectrometry based on sample mixing with a non-enriched standard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 4393–4399.
- 12 R. Grigoryan, M. Costas-Rodríguez, P. Santens and F. Vanhaecke, Multicollector inductively coupled plasma—mass spectrometry with  $10^{13}$   $\Omega$  Faraday cup amplifiers for ultrasensitive Mg isotopic analysis of cerebrospinal fluid microsamples, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 15975–15981.
- 13 Q. Ma, M. Yang, H. Zhao, N. J. Evans, Z.-Y. Chu, L.-W. Xie, C. Huang, Z.-D. Zhao and Y.-H. Yang, Accurate and precise determination of Lu and Hf contents and Hf isotopic composition at the sub-nanogram level in geological samples using MC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1256–1262.
- 14 M. C. García-Poyo, S. Berail, A. L. Ronzani, L. Rello, E. García-González, B. Lelievre, P. Cales, F. V. Nakadi, M. Aramendia, M. Resano and C. Pecheyran, Laser ablation of microdroplets for copper isotopic analysis via MC-ICP-MS. Analysis of serum microsamples for the diagnosis and follow-up treatment of Wilson's disease, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, **36**, 968–980.
- 15 J. Zhang, J. Li, L. Zhang, Z.-B. Wang, S.-L. Sun and Z.-Y. Luo, Precise determination of the molybdenum isotopic composition of urine by multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2020, **34**, 8658.
- 16 M. Montes-Bayón, M. Sharar and M. Corte-Rodríguez, Trends on (elemental and molecular) mass spectrometry based strategies for speciation and metallomics, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2018, **104**, 4–10.
- 17 N. H. Bings, J. O. Orlandini von Niessen and J. N. Schaper, Liquid sample introduction in inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry—Critical review, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2014, **100**, 14–37.
- 18 J. L. Todoli and J. M. Mermet, Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2006, **61**, 239–283.
- 19 J. L. Todoli and J. M. Mermet, Elemental analysis of liquid microsamples through inductively coupled plasma spectrochemistry, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 107–116.
- 20 K. E. Lokits, P. A. Limbach and J. A. Caruso, Interfaces for capillary LC with ICP-MS detection: A comparison of nebulizers/spray chamber configurations, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 528–534.
- 21 B. Franze, I. Strenge and C. Engelhard, Separation and detection of gold nanoparticles with capillary electrophoresis and ICP-MS in single particle mode (CE-SP-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1481–1489.
- 22 A. P. Vonderheide, M. V. Zorzi, A. V. Izmer, C. Pickhardt, J. A. Caruso, P. Ostapczuk, R. Hillec and J. S. Becker, Determination of  $^{90}\text{Sr}$  at ultratrace levels in urine by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 675–680.
- 23 A. W. Boom, Sample introduction techniques for atomic spectroscopy, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 875A–888A.
- 24 J. F. Staff, A.-H. Harding, J. Morton, K. Jones, E. A. Guice and T. McCormick, Investigation of saliva as an alternative matrix to blood for the biological monitoring of inorganic lead, *Toxicol. Lett.*, 2014, **231**, 270–276.
- 25 E. Pérez, F. M. Marco, P. Martínez-Peinado, J. Mora and 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*, 2019, **1049**, 10–19.

- 26 <https://www.meinhard.com/shop-by-product/nebulizers/meinhard-classic-nebulizers/meinhard-classic-high-efficiency-nebulizers>.
- 27 [https://www.geicp.com/cgi-bin/site/wrapper.pl?c1=Products\\_nebs\\_bytype](https://www.geicp.com/cgi-bin/site/wrapper.pl?c1=Products_nebs_bytype).
- 28 <https://www.icpms.com/products/nebulizers-pfa-microflow.php>.
- 29 <https://burgener.com/NebulizerSelectionCriteria.html>.
- 30 M. Grotti, F. Ardini and J. L. Todolí, Total introduction of microsamples in inductively coupled plasma mass spectrometry by high-temperature evaporation chamber with a sheathing gas stream, *Anal. Chim. Acta*, 2013, **767**, 14–20.
- 31 A. C. S. Bellato, M. F. Giné and A. A. Menegário, Determination of B in body fluids by isotope dilution inductively coupled mass spectrometry with direct injection nebulization, *Microchem. J.*, 2004, **77**, 119–122.
- 32 B. W. Acon, J. A. McLean and A. Montaser, A direct injection high efficiency nebulizer interface for microbore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 852–857.
- 33 J. A. Mclean, B. W. Acon, A. Montaser, J. Singh, D. E. Pritchard and S. R. Patierno, Determination of chromium in human lung fibroblast cells using a large bore direct injection high-efficiency nebulizer with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 659–663.
- 34 C. S. Westphal, J. A. Mclean, S. J. Hakspiel, W. E. Jackson, D. E. McClain and A. Montaser, Determination of depleted uranium in urine via isotope ratio measurements using large-bore direct injection high efficiency nebulizer-inductively coupled plasma mass Spectrometry, *Appl. Spectrosc.*, 2004, **58**, 1044–1050.
- 35 C. S. Westphal, K. Kahen, W. F. Rutkowski, B. W. Acon and A. Montaser, Demountable direct injection high efficiency nebulizer for inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, **59**, 353–368.
- 36 D. Schaumlöffel, P. Giusti, M. V. Zoriy, C. Pickhardt, J. Szpunar, R. Lobinski and J. S. Becker, Ultratrace determination of uranium and plutonium by nanovolume flow injection double-focusing sector field inductively coupled plasma mass spectrometry (nFI-ICP-SFMS), *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 17–21.
- 37 R. Sánchez, J. L. Todolí, C. P. Lienemann and J. M. Mermet, Air-segmented, 5- $\mu$ L flow injection associated with a 200 °C heated chamber to minimize plasma loading limitations and difference of behaviour between alkanes, aromatic compounds and petroleum products in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 1888–1894.
- 38 Á. Cañabate, E. García-Ruiz, M. Resano and J.-L. Todolí, Analysis of whole blood by ICP-MS equipped with a high temperature total sample consumption system, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 78–87.
- 39 S. Miyashita, A. S. Groombridge, S. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba and K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1598–1606.
- 40 S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski and T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, *Metallomics*, 2018, **10**, 73–76.
- 41 M. C. Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, E. Blanco, J. Bettmer and M. Montes-Bayón, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 11491–11497.
- 42 S. Miyashita, A. S. Groombridge, S. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba and K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1598–1606.
- 43 S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax and D. Günther, Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1166–1174.
- 44 M. He, B. Chen, H. Wang and B. Hu, Microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry for trace elements and their species analysis in cells, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2019, **54**, 250–263.
- 45 S. Theiner, A. Schoeberl, L. Fischer, S. Neumayer, S. Hann and G. Koellensperger, FI-ICP-TOFMS for quantification of biologically essential trace elements in cerebrospinal fluid – high-throughput at low sample volume, *Analyst*, 2019, **144**, 4653–4660.
- 46 M. Aramendia, M. Resano and F. Vanhaecke, Electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A versatile tool for tackling challenging samples: A critical review, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **648**, 23–44.
- 47 A. Limbeck, P. Galler, M. Bonta, G. Bauer, W. Nischkauer and F. Vanhaecke, Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 6593–6617.
- 48 M. Resano, M. A. Belarra, E. García-Ruiz, M. Aramendia and L. Rello, Dried matrix spots and clinical elemental analysis. Current status, difficulties, and opportunities, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2018, **99**, 75–87.
- 49 P. J. Parsons, A. L. Galusha, Y. Cui, E. M. Faustman, J. C. Falman, J. D. Meeker and K. Kannan, A critical review of the analysis of dried blood spots for characterizing human exposure to inorganic targets using methods based on analytical atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2020, **35**, 2092–2112.
- 50 P. Foltynova, A. Bednarik, V. Kanicky and J. Preisler, Diode laser thermal vaporization ICP MS with a simple tubular cell for determination of lead and cadmium in whole blood, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1585–1590.
- 51 A. S. Henn, E. M. M. Flores, V. L. Dressler, M. F. Mesko, J. Feldmann and P. A. Mello, Feasibility of As, Sb, Se and

- Te determination in coal by solid sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 1384–1393.
- 52 J. S. Silva, A. S. Henn, V. L. Dressler, P. A. Mello and E. M. M. Flores, Feasibility of rare earth element determination in low concentration in crude oil: Direct sampling electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 2018, **90**, 7064–7071.
- 53 L. Li, B. Hu, L. Xia and Z. Jiang, Determination of trace Cd and Pb in environmental and biological samples by ETV-ICP-MS after single-drop microextraction, *Talanta*, 2006, **70**, 468–473.
- 54 J. C. Ramos and D. L. G. Borges, Evaluation of electrothermal vaporization as a sample introduction technique for the determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry, following dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 304–314.
- 55 H. Wang, M. He, B. Chen and B. Hu, Advances in ICP-MS-based techniques for trace elements and their species analysis in cells, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1650–1659.
- 56 J. Moreda-Piñeiro, A. Cantarero-Roldán, A. Moreda-Piñeiro, J. Á. Cocho and P. Bermejo-Barrera, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multi-elemental determination in dried blood spots, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1500–1507.
- 57 J. Moreda-Piñeiro, J. A. Cocho, M. L. Couce, A. Moreda-Piñeiro and P. Bermejo-Barrera, Trace elements in dried blood spots as potential discriminating features for metabolic disorder diagnosis in newborns, *Metallomics*, 2021, **13**, mfab018.
- 58 S. Kröger, M. Sperling and U. Karst, Quantitative dried blood spot analysis for metalodrugs by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **51**, 50–56.
- 59 M. Aramendia, L. Rello, F. Vanhaecke and M. Resano, Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 8682–8690.
- 60 M. Resano, M. Aramendia, L. Rello, M. L. Calvo, S. Bérail and C. Pécheyran, Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 98–106.
- 61 P. Foltynova, V. Kanicky and J. Preisler, Diode Laser Thermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 2268–2274.
- 62 M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, H. Gonzalez-Iglesias, F. Vanhaecke and 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. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, **177**, 112857.
- 63 T. N. Abduljabbar, B. L. Sharp, H. J. Reid, N. Barzegar-Befroeid, T. Petod and I. Lengyel, Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using microsampling ICP-MS and sample dilution, *Talanta*, 2019, **204**, 663–669.
- 64 S. C. Wilschefski and M. R. Baxter, Inductively coupled plasma mass spectrometry: Introduction to analytical aspects, *Clin. Biochem. Rev.*, 2019, **40**, 115–133.
- 65 J. L. M. de Boer, R. Ritsema, S. Piso, H. van Staden and W. van den Beld, Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 872–880.
- 66 R. S. Amais, E. E. Garcia, M. R. Monteiro, A. R. A. Nogueira and J. A. Nóbrega, Direct analysis of biodiesel microemulsions using an inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.*, 2010, **96**, 146–150.
- 67 M. Aramendia, L. Rello, S. Bérail, A. Donnard, C. Pécheyran and M. Resano, Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2015, **30**, 296–309.
- 68 M. G. M. Kok and M. Fillet, Volumetric absorptive microsampling: current advances and applications, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **147**, 288–296.
- 69 M. Protti, R. Mandrioli and L. Mercolini, Tutorial: Volumetric absorptive microsampling (VAMS), *Anal. Chim. Acta*, 2019, **1046**, 32–47.
- 70 E. Bolea-Fernandez, K. Phan, L. Balcaen, M. Resano and F. Vanhaecke, Determination of ultra-trace amounts of prosthesis-related metals in whole blood using volumetric absorptive micro-sampling and tandem ICP – Mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **941**, 1–9.
- 71 S. Capiua, E. Bolea-Fernandez, L. Balcaen, C. Van Der Straeten, A. G. Verstraete, F. Vanhaecke and C. P. Stove, Development, validation and application of an inductively coupled plasma – mass spectrometry method to determine cobalt in metal-on-metal prosthesis patients using volumetric absorptive microsampling, *Talanta*, 2020, **208**, 120055.
- 72 Y. Anoshkina, M. Costas-Rodríguez and F. Vanhaecke, Iron isotopic analysis of finger-prick and venous blood by multi-collector inductively coupled plasma-mass spectrometry after volumetric absorptive microsampling, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 314–321.
- 73 L. Fu, H. Xie, J. Huang and L. Chen, Rapid determination of trace elements in serum of hepatocellular carcinoma patients by inductively coupled plasma tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1112**, 1–7.
- 74 C. Liang, Z. Li, X. Xia, Q. Wang, R. Tao, Y. Tao, H. Xiang, S. Tong and F. Tao, Determine multiple elements simultaneously in the sera of umbilical cord blood samples—A very simple method, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2017, **177**, 1–8.
- 75 B. Toubhans, A. T. Gourlan, P. Telouk, K. Kutchman-Singh, L. W. Francis, R. S. Conlan, L. Margarit, D. Gonzalez and L. Charlet, Cu isotope ratios are meaningful in ovarian cancer diagnosis, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2020, **62**, 126611.

- 76 M. Costas-Rodriguez, S. V. Campenhout, A. A. M. B. Hastuti, L. Devisscher, H. V. Vlierberghe and F. Vanhaecke, Body distribution of stable copper isotopes during the progression of cholestatic liver disease induced by common bile duct ligation in mice, *Metallomics*, 2019, **11**, 1093–1103.
- 77 S. Lauwens, M. Costas-Rodriguez, H. V. Vlierberghe and F. Vanhaecke, Cu isotopic signature in blood serum of liver transplant patients: a follow-up study, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 20683.
- 78 S. Lauwens, M. Costas-Rodriguez, J. Delanghe, H. V. Vlierberghe and F. Vanhaecke, Quantification and isotopic analysis of bulk and of exchangeable and ultrafiltrable serum copper in healthy and alcoholic cirrhosis subjects, *Talanta*, 2018, **189**, 332–338.
- 79 M. Costas-Rodriguez, Y. Anoshkina, S. Lauwens, H. V. Vlierberghe, J. Delanghe and 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*, 2015, **7**, 491–498.
- 80 P. Télouk, A. Puisieux, T. Fujii, V. Balter, V. Bondanese, A. P. Morel, G. Clapissou, A. Lamboux and F. Albarède, Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study, *Metallomics*, 2014, **7**, 299–308.
- 81 F. Larner, B. Sampson, M. Rehkämper, D. J. Weiss, J. R. Dainty, S. O'Riordan, T. Panetta and P. G. Bain, High precision isotope measurements reveal poor control of copper metabolism in Parkinsonism, *Metallomics*, 2013, **5**, 125–132.
- 82 M. Aramendia, L. Rello, M. Resano and F. Vanhaecke, Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 675–681.
- 83 S. V. Campenhout, A. A. M. B. Hastuti, S. Lefere, H. V. Vlierberghe, F. Vanhaecke, M. Costas-Rodriguez and L. Devisscher, Lighter serum copper isotopic composition in patients with early non-alcoholic fatty liver disease, *BMC Res. Notes*, 2020, **13**, 225.
- 84 J. C. Cikomola, M. R. Flórez, M. Costas-Rodriguez, Y. Anoshkina, K. Vandepoele, P. B. Katchunga, A. S. Kishabongo, M. M. Speeckaert, F. Vanhaecke and J. Delanghe, Whole blood Fe isotopic signature in a sub-Saharan African population, *Metallomics*, 2017, **9**, 1142–1149.
- 85 Y. Anoshkina, M. Costas-Rodriguez, M. Speeckaert, W. V. Biesen, J. Delanghe and F. Vanhaecke, Iron isotopic composition of blood serum in anemia of chronic kidney disease, *Metallomics*, 2017, **9**, 517–524.
- 86 L. V. Heghe, J. Delanghe, H. V. Vlierberghe and F. Vanhaecke, The relationship between the iron isotopic composition of human whole blood and iron status parameters, *Metallomics*, 2013, **5**, 1503.
- 87 P. A. Krayenbuehl, T. Walczyk, R. Schoenberg, F. V. Blanckenburg and G. Schulthess, Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood, *Blood*, 2005, **105**, 3812–3816.
- 88 A. A. M. B. Hastuti, M. Costas-Rodriguez, Y. Anoshkina, T. Parnall, J. A. Madura and F. Vanhaecke, High-precision isotopic analysis of serum and whole blood Cu, Fe and Zn to assess possible homeostasis alterations due to bariatric surgery, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 727–738.
- 89 A. A. M. B. Hastuti, M. Costas-Rodriguez, A. Matsunaga, T. Ichinose, S. Hagiwara, M. Shimura and F. Vanhaecke, Cu and Zn isotope ratio variations in plasma for survival prediction in hematological malignancy cases, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 16389.
- 90 R. Grigoryan, M. Costas-Rodriguez, S. V. Laecke, M. Speeckaert, B. Lapauw and F. Vanhaecke, Multi-collector ICP-mass spectrometry reveals changes in the serum Mg isotopic composition in diabetes type I patients, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 1514–1521.
- 91 E. Albalat, P. Telouk, V. Balter, T. Fujii, V. P. Bondanese, M.-L. Plissonnier, V. Vlaeminck-Guillem, J. Baccheta, N. Thiam, P. Miossec, F. Zoulim, A. Puisieux and F. Albarède, Sulfur isotope analysis by MC-ICP-MS and application to small medical samples, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**, 1002–1011.
- 92 V. Balter, A. Nogueira da Costa, V. P. Bondanese, K. Jaouen, A. Lamboux, S. Sangrajrang, N. Vincent, F. Fourel, P. Télouk, M. Gigou, C. Lécuyer, P. Srivatanakul, C. Bréchet, F. Albarède and P. Hainaut, Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, **112**, 982–985.
- 93 A. Eisenhauer, M. Müller, A. Heuser, A. Kolevica, C. C. Glüer, M. Both, C. Laue, U. V. Hehn, S. Kloth, R. Shroff and J. Schrenzenmeir, Calcium isotope ratios in blood and urine: a new biomarker for the diagnosis of osteoporosis, *BoneKey Rep.*, 2019, **10**, 100200.
- 94 L. Gerhardsson, T. Lundh, L. Minthon and E. Londos, Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease, *Dementia Geriatr. Cognit. Disord.*, 2008, **25**, 508–515.
- 95 B. Michalke and V. Nischwitz, Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid—current methods and results: A review, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **682**, 23–36.
- 96 F. Maass, B. Michalke, D. Willkommen, C. Schulte, L. Tönges, M. Boerger, I. Zerra, M. Bähr and P. Lingor, Selenium speciation analysis in the cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2020, **57**, 110–115.
- 97 M. Korvela, A.-L. Lind, M. Wetterhall, T. Gordh, M. Andersson and J. Pettersson, Quantification of 10 elements in human cerebrospinal fluid from chronic pain patients with and without spinal cord stimulation, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2016, **37**, 1–7.
- 98 J. Mandrioli, B. Michalke, N. Solovyev, P. Grill, F. Violi, C. Lunetta, A. Conte, V. A. Sansone, M. Sabatelli and M. Vinceti, Elevated levels of selenium species in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with disease-associated gene mutations, *Neurodegener. Dis.*, 2017, **17**, 171–180.

- 99 M. Vinceti, T. Filippini, J. Mandrioli, F. Violi, A. Bargellini, J. Weuve, N. Fini, P. Grill and B. Michalke, Lead, cadmium and mercury in cerebrospinal fluid and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A case-control study, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2017, **43**, 121–125.
- 100 M. Vinceti, N. Solovyev, J. Mandrioli, C. M. Crespi, F. Bonvicini, E. Arcolin, E. Georgouloupoulou and B. Michalke, Cerebrospinal fluid of newly diagnosed amyotrophic lateral sclerosis patients exhibits abnormal levels of selenium species including elevated selenite, *Neurotoxicology*, 2013, **38**, 25–32.
- 101 B. R. Cardoso, D. J. Hare, A. I. Bush, Q.-X. Li, C. J. Fowler, C. L. Masters, R.-N. Martins, K. Ganio, A. Lothian, S. Mukherjee, E. A. Kapp and B. R. Roberts, The AIBL research group, Selenium levels in serum, red blood cells, and cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients: A report from the Australian Imaging, Biomarker & Lifestyle Flagship study of ageing (AIBL), *J. Alzheimer's Dis.*, 2017, **57**, 183–193.
- 102 B. R. Roberts, J. D. Doecke, A. Rembach, L. F. Yévenes, C. J. Fowler, C. A. McLean, M. Lind, I. Volitakis, C. L. Masters, A. I. Bush and D. J. Hare, Rubidium and potassium levels are altered in Alzheimer's disease brain and blood but not in cerebrospinal fluid, *Acta Neuropathol. Commun.*, 2016, **4**, 119.
- 103 Y. H. Hung, N. G. Faux, D. W. Killale, N. Yanjanin, S. Firnkes, I. Volitakis, G. Ganio, M. Walterfang, C. Hastings, F. D. Porter, D. S. Ory and A. I. Bush, Altered transition metal homeostasis in Niemann-Pick disease, type C1, *Metallomics*, 2014, **6**, 542–553.
- 104 A. Cañabate, E. García-Ruiz, M. Resano and J.-L. Todolí, Cerebrospinal fluid elemental analysis by using a total sample consumption system operated at high temperature adapted to inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1916–1924.
- 105 A. Stojsavljević, L. Vujotić, B. Rovčanin, S. Borković-Mitić, M. Gavrović-Jankulović and D. Manojlović, Assessment of trace metal alterations in the blood, cerebrospinal fluid and tissue samples of patients with malignant brain tumors, *Sci. Rep.*, 2020, **10**, 3816.
- 106 L. Sauzéat, E. Bernard, A. Perret-Liaudet, I. Quadrio, A. Vighetto, P. Krolak-Salmon, E. Broussolle, P. Leblanc and V. Balter, Isotopic evidence for disrupted copper metabolism in amyotrophic lateral sclerosis, *iScience*, 2018, **6**, 264–271.
- 107 M. Aranaz, M. Costas-Rodriguez, L. Lobo, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro and F. Vanhaecke, Homeostatic alterations related to total antioxidant capacity, elemental concentrations and isotopic compositions in aqueous humour of glaucoma patients, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, DOI: 10.1007/s00216-021-03467-5.
- 108 M. Tamhane, S. Cabrera-Ghayouri, G. Abeliana and V. Viswanath, Review of biomarkers in ocular matrices: Challenges and opportunities, *Pharm. Res.*, 2019, **36**, 40.
- 109 B. Bocca, G. Forte, A. Pisano, C. Farace, E. Giancipoli, A. Pinna, S. Dore and R. Madeddu, A pilot study to evaluate the levels of aqueous humour trace elements in open-angle glaucoma, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2020, **61**, 126560.
- 110 B. Hohberger, M. A. Chaudhri, B. Michalke, M. Lucio, K. Nowomiejska, U. Schlötzer-Schrehardt, P. Grieb, R. Rejdak and A. G. M. Junemann, Levels of aqueous humour trace elements in patients with open-angle glaucoma, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2018, **45**, 150–155.
- 111 A. G. M. Junemann, P. Stopa, B. Michalke, A. Chaudhri, U. Reulbach, C. Huchzermeyer, U. Schlotzer-Schrehardt, F. E. Kruse, E. Zrenner and R. Rejdak, Levels of aqueous humour trace elements in patients with non-exudative age-related macular degeneration: A case-control study, *PLoS One*, 2013, **8**, e56734.
- 112 Y. Zhou, F. Hong, X. Wang, J. Feng, D. Zhu, Y. Xu and Y. Tao, Abnormal levels of aqueous humour trace elements in patients with cytomegalovirus retinitis, *Eye*, 2019, **33**, 1606–1612.
- 113 K. Yavuzer and Y. Akinay, Microstructure and chemical analysis in pseudoexfoliation syndrome, *Curr. Eye Res.*, 2021, **46**, 490–495.
- 114 M. Vázquez, I. Ibarra, A. Sibón and M. D. Pérez-Cárceles, Multi-element Analysis of Vitreous Humour Samples by ICP-MS and ICP-OES, *At. Spectrosc.*, 2017, **38**, 124–132.
- 115 J. C. S. Junior, P. C. M. Filho, R. B. F. Guidugli, M. N. Eberlin, G. de Souza Pessa, E. Gomes da Silva, M. A. Z. Arruda and N. F. Hoehr, Metals and (metallo) proteins identification in vitreous humour focusing on post-mortem biochemistry, *Metallomics*, 2014, **6**, 1801–1807.
- 116 R. González de Vega, M. L. Fernández-Sánchez, H. G. Iglesias, M. C. Prados and A. Sanz-Medel, Quantitative selenium speciation by HPLC-ICP-MS (IDA) and simultaneous activity measurements in human vitreous humour, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **407**, 2405–2413.
- 117 A. Wójtowicz, R. Wietecha-Posłuszny and M. Snamina, Contemporary trends in drug analysis of vitreous humour: a critical review, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2020, **129**, 115935.
- 118 A. L. Galusha, A. C. Haig, M. S. Bloom, P. C. Kruger, A. McGough, N. Lenhart, R. Wong, V. Y. Fujimoto, E. Mok-Lind and P. J. Parsons, Ultra-trace element analysis of human follicular fluid by ICP-MS/MS: pre-analytical challenges, contamination control, and matrix effects, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 741–752.
- 119 B. Markiewicz, A. Sajnog, W. Lorenc, A. Hanć, I. Komorowicz, J. Suliburska, R. Kocylowski and D. Baralkiewicz, Multielemental analysis of 18 essential and toxic elements in amniotic fluid samples by ICP-MS: Full procedure validation and estimation of measurement uncertainty, *Talanta*, 2017, **174**, 122–130.
- 120 A. Sajnog, M. Tkaczyk, M. Stanczyk, K. Szaflik, J. Suliburska, R. Kocylowski and D. Baralkiewicz, A new procedure for the determination of 21 macro- and trace elements in human fetal urine using an inductively coupled plasma mass spectrometry with dynamic reaction cell (ICP-DRC-MS)

- equipped with a micro-flow nebulizer, *Talanta*, 2021, **222**, 121672.
- 121 L. Lemoine, E. Thijssen, J.-P. Noben, P. Adriaensens, R. Carleer and K. Van der Speeten, A validated inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) method for the quantification of total platinum content in plasma, plasma ultrafiltrate, urine and peritoneal fluid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **152**, 39–46.
- 122 F. Moyano, E. Verni, H. Tamashiro, S. Digenaro, L. D. Martinez and R. A. Gil, Single-step procedure for trace element determination in synovial fluid by dynamic reaction cell-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.*, 2014, **112**, 17–24.
- 123 B. D. Kerger, R. Gerads, H. Gurleyuk, A. Urban and D. J. Paustenbach, Total cobalt determination in human blood and synovial fluid using inductively coupled plasma mass spectrometry: method validation and evaluation of performance variables affecting metal hip implant patient samples, *Toxicol. Environ. Chem.*, 2015, **97**, 1145–1163.
- 124 P. Li, Y. Zhong, X. Jiang, C. Wang, Z. Zuo and A. Sha, Seminal plasma metals concentration with respect to semen quality, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2012, **148**, 1–6.
- 125 M. Katayama, S. Kaneko, K. Takamatsu, T. Tsukimura and T. Togawa, Determination of trace metals in human seminal plasma using inductively coupled plasma mass spectrometry and multivariate statistical analyses for sperm parameters, *J. Mol. Biomarkers Diagn.*, 2013, **4**, 1000147.
- 126 T. Zivkovic, B. Tariba and A. Pizent, Multielement analysis of human seminal plasma by octopole reaction cell ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 2114–2126.
- 127 S. S. Tan, G. L. Khor, E. Stoutjesdijk, K. W. T. Ng, I. Khouw, M. Bragt, A. Schaafsma, D. A. J. Dijk-Brouwer and F. A. J. Muskiet, Case study of temporal changes in maternal dietary intake and the association with breast milk mineral contents, *J. Food Compos. Anal.*, 2020, **89**, 103468.
- 128 M. Levi, C. Hjelm, F. Harari and M. Vahter, ICP-MS measurement of toxic and essential elements in human breast milk. A comparison of alkali dilution and acid digestion sample preparation methods, *Clin. Biochem.*, 2018, **53**, 81–87.
- 129 M. L. Astolfi, D. Marotta, V. Cammalleri, E. Marconi, A. Antonucci, P. Avino, S. Canepari, M. Vitali and C. Protano, Determination of 40 elements in powdered infant formulas and related risk assessment, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, **18**, 5073.
- 130 S. Subashchandrabose, E. R. Pereira-Filho and G. L. Donati, Trace element analysis of urine by ICP-MS/MS to identify urinary tract infection, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2017, **32**, 1590–1594.
- 131 A. Sarmiento-González, J. M. Marchante-Gayón, J. M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jiménez and A. Sanz-Medel, High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 2583–2589.
- 132 M. G. Minnich, D. C. Miller and P. J. Parsons, Determination of As, Cd, Pb, and Hg in urine using inductively coupled plasma mass spectrometry with the direct injection high efficiency nebulizer, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2008, **63**, 389–395.
- 133 D. R. Jones, J. M. Jarrett, D. Stukes, A. Baer, M. McMichael, K. Wallon, G. Xiao and R. L. Jones, Development and validation of a biomonitoring method to measure As, Cr, and Ni in human urine samples by ICP-UCT-MS, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2021, **234**, 113713.
- 134 E. Robotti, F. Quasso, M. Manfredi, F. Gosetti, E. Mazzucco, C. Isidoro and E. Marengo, Determination by ICP-MS and multivariate data analysis of elemental urine excretion profile during the EDTA chelation therapy: A case study, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2020, **62**, 126608.
- 135 M. V. Zoriy, C. Pickhardt, P. Ostapczuk, R. Hille and J. S. Becker, Determination of Pu in urine at ultratrace level by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Mater. Sci.*, 2004, **232**, 217–224.
- 136 S. Salou, D. Larivière, C.-M. Cirtiu and N. Fleury, Quantification of titanium dioxide nanoparticles in human urine by single-particle ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, **413**, 171–181.
- 137 K. Badalova, P. Herbello-Hermelo, P. Bermejo-Barrera and A. Moreda-Piñeiro, Possibilities of single particle-ICP-MS for determining/characterizing titanium dioxide and silver nanoparticles in human urine, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2019, **54**, 55–61.
- 138 S. Fernández-Trujillo, M. Jiménez-Moreno, A. Ríos and R. C. R. Martín-Doimeadós, A simple analytical methodology for platinum nanoparticles control in complex clinical matrices via SP-ICP-MS, *Talanta*, 2021, **231**, 122370.
- 139 F. Romano, A. Castiblanco, F. Spadotto, F. Di Scipio, M. Malandrino, G. N. Berta and M. Aimetti, ICP-mass-spectrometry ionic profile of whole saliva in patients with untreated and treated periodontitis, *Biomedicines*, 2020, **8**, 354.
- 140 E. Inonu, S. S. Hakki, S. A. Kayis and F. H. Nielsen, The Association Between Some Macro and Trace Elements in Saliva and Periodontal Status, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2020, **197**, 35–42.
- 141 M. Watanabe, M. Asatsuma, A. Ikui, M. Ikeda, Y. Yamada, S. Nomura and A. Igarashi, Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder, *Chem. Senses*, 2005, **30**, 121–125.
- 142 H. Reis de Souza Schacher and L. Macedo de Menezes, Metal ion quantification in the saliva of patients with lingual arch appliances using silver solder, laser, or TIG welding, *Clinical Oral Investigations*, 2020, **24**, 2109–2120.
- 143 Y.-J. Kim, Y.-K. Kim and H.-S. Kho, Effects of smoking on trace metal levels in saliva, *Oral Dis.*, 2010, **16**, 823–830.

- 144 L. M. Martínez, D. M. Pagán and P. L. Jornet, Trace elements in saliva as markers of type 2 diabetes mellitus, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2018, **186**, 354–360.
- 145 J. F. Staff, A.-H. Harding, J. Morton, K. Jones, E. Guice and T. McCormick, Investigation of saliva as an alternative matrix for the biological monitoring of inorganic lead, *Toxicol. Lett.*, 2014, **231**, 270–276.
- 146 E. P. Duktiewicz and P. L. Urban, Quantitative mass spectrometry of unconventional human biological matrices, *Philos. Trans. R. Soc., A*, 2016, **374**, 20150380.
- 147 W. Ngo, J. Chen, S. Panthi, K. K. Nichols and J. J. Nichols, Comparison of collection methods for the measure of human meibum and tear film-derived lipids using mass spectrometry, *Curr. Eye Res.*, 2018, **43**, 1244–1252.
- 148 E. Ponzini, C. Santambrogio, A. De Palma, P. Mauri, S. Tavazzi and R. Grandori, Mass spectrometry-based tear proteomics for non-invasive biomarker discovery, *Mass Spectrom. Rev.*, 2021, 1–19.
- 149 I. Cicalini, C. Rossi, D. Pieragostino, L. Agnifili, L. Mastropasqua, M. di Ioia, G. De Luca, M. Onofri, L. Federici and P. Del Boccio, Integrated lipidomics and metabolomics analysis of tears in multiple sclerosis: An insight into diagnostic potential of lacrimal fluid, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 1265.
- 150 A. Cancarini, J. Fostinelli, L. Napoli, M. E. Gilberti, P. Apostoli and F. Semeraro, Trace elements diabetes: Assessment of levels in tears and serum, *Exp. Eye Res.*, 2017, **154**, 47–52.
- 151 F. Semeraro, C. Costagliola, A. Cancarini, E. Gilberti, E. Tosco and P. Apostoli, Defining reference values of trace elements in the tear film: Diagnostic methods and possible applications, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2012, **80**, 190–194.
- 152 A. Louveau, I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris and J. Kipnis, Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels, *Nature*, 2015, **523**, 337–341.
- 153 C. García-Cabo, P. Llano-Suárez, L. Benavente-Fernández, S. Calleja-Puerta, M. T. Fernández-Abedul and J. M. Costa-Fernández, Obtaining information from the brain in a non-invasive way: determination of iron in nasal exudate to differentiate hemorrhagic and ischemic strokes, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, **58**, 847–853.
- 154 C. García-Cabo, P. Llano-Suárez, L. B. Fernández, J. M. Costa-Fernández, M. T. Fernández-Abedul and S. Calleja-Puerta, Iron measured in nasal exudate samples as a new and useful biomarker in the differential diagnosis of patients with acute stroke, *Cerebrovasc. Dis.*, 2020, **49**, 625–631.
- 155 M. Sampedro, M. Aliste, S. Arranz, S. Alicia, N. Unceta, G. Alberto, A. Vallejo, M. Aliste, S. Arranz, A. Sánchez-Ortega, M. C. Sampedro, N. Unceta, A. Gómez-Caballero, A. Vallejo, M. A. Goicolea and R. J. Barrio, Particle analysis for the detection of gunshot residue (GSR) in nasal samples using scanning laser ablation and inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Forensic Sci.*, 2020, **65**, 1094–1101.
- 156 J. N. Hussain, N. Mantri and M. M. Cohen, Working Up a Good Sweat – The challenges of standardising sweat collection for metabolomics analysis, *Clin. Biochem. Rev.*, 2017, **38**, 13–34.
- 157 S. J. Genuis, D. Birkholz, I. Rodushkin and S. Beesoon, Blood, urine, and sweat (BUS) study: Monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2011, **61**, 344–357.
- 158 J. Siquier-Coll, I. Bartolomé, M. Pérez-Quintero, D. Muñoz, M. C. Robles and M. Maynar-Mariño, Effect of exposure to high temperatures in the excretion of cadmium and lead, *J. Therm. Biol.*, 2020, **89**, 102545.
- 159 T. Saran, M. Zawadka, S. Chmiel and A. Mazur, Sweat iron concentration during 4-week exercise training, *AAEM*, 2018, **25**, 500–503.
- 160 J. Siquier-Coll, I. Bartolomé, M. Pérez-Quintero, F. J. Grijota, D. Muñoz and M. Maynar-Mariño, Effect of heat exposure and physical exercise until exhaustion in normothermic and hyperthermic conditions on serum, sweat and urinary concentrations of magnesium and phosphorus, *J. Therm. Biol.*, 2019, **84**, 176–184.
- 161 J. T. Collie, R. J. Massie, O. A. H. Jones, P. D. Morrison and R. F. Greaves, A candidate reference method using ICP-MS for sweat chloride quantification, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, **54**, 561–567.
- 162 A. Marvelli, B. Campi, G. Mergni, M. E. Di Cicco, P. Turini, P. Scardina, R. Zucchi, M. Pifferi, G. Taccetti, A. Paolicchi, G. la Marca and A. Saba, Sweat chloride assay by inductively coupled plasma mass spectrometry: a confirmation test for cystic fibrosis diagnosis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 6909–6916.
- 163 E. Mavrikis and S. A. Pergantis, Chip-based microfluidics on-line with inductively coupled plasma - mass spectrometry for standard dilution analysis, *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1179**, 338830.



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

**Departamento de Química Física y Analítica**

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

**Nuevas metodologías basadas en espectrometría  
de masas elemental para el estudio de elementos  
esenciales y (metalo)-proteínas implicados en  
enfermedades oculares neurodegenerativas  
asociadas a la edad**

**TESIS DOCTORAL**

**EVA VALENCIA AGUDO**

**Oviedo, 2022**



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

**Departament of Physical and Analytical Chemistry**

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

**New elemental mass spectrometry-based  
methodologies to investigate essential elements  
and (metallo)-proteins involved in age-related  
neurodegenerative eye diseases**

**Ph.D. THESIS**

**EVA VALENCIA AGUDO**

**Oviedo, 2022**