



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

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

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

TESIS DOCTORAL

Ana Lores Padín

Oviedo

2022



UNIVERSITY OF OVIEDO

Department of Physical and Analytical Chemistry

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

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

PhD. Thesis

Ana Lores Padín

Oviedo

2022



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

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

RESUMEN (en español)

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

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

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



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

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

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

RESUMEN (en Inglés)

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

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



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

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

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

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

ÍNDICE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XXXI
A. INTRODUCCIÓN	1
A.1. ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	3
A.1.1. Estructura y fisiología del ojo	4
A.1.2. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE).....	7
A.1.2.1. Proteínas de interés y su relación con la DMAE.....	11
A.2. MÉTODOS TRADICIONALMENTE EMPLEADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	15
A.2.1. Métodos espectrofotométricos.....	15
A.2.2. Métodos basados en el empleo de anticuerpos específicos.....	17
A.2.2.1. Aspectos generales.....	18
A.2.2.2. Los inmunoensayos tipo ELISA	19
A.2.2.3. Western Blot	23
A.2.2.4. Metodologías de imaging convencional: Inmunohistoquímica /Immunocitoquímica e inmunofluorescencia convencional	24
A.3. ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS ...	30
A.3.1. DETECCIÓN ELEMENTAL EMPLEANDO ICP-MS	31
A.3.1.1. Aspectos generales.....	31
A.3.1.2. ICP-MS como herramienta para la detección elemental e isotópica en el estudio de enfermedades.....	33

A.3.2. Determinación de biomoléculas mediante icp-ms: estrategias de marcaje	35
A.3.2.1. Etiquetas metálicas empleadas para detección de proteínas por ICP-MS	37
A.3.2.2. Nanopartículas metálicas como etiquetas elementales	40
A.3.2.3. Estrategias de purificación y caracterización de NPs	42
A.3.2.4. Estrategias de bioconjugación de NPs	43
A.3.2.5. Caracterización de la inmunosonda metálica	45
A.3.2.6. Empleo de las NPs como marcas de inmunosondas: aplicaciones para la determinación de proteínas	46
A.3.2.7. Los Nanoclústeres metálicos	48
A.4. ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS EN CÉLULAS INDIVIDUALES Y SECCIONES DE TEJIDOS EMPLEANDO MNCS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELEMENTAL	55
A.4.1. Análisis de células individuales mediante ICP-MS	55
A.4.1.1. El punto de partida para el análisis de cultivos celulares: la heterogeneidad celular	56
A.4.1.2. Características generales de la técnica de sc-ICP-MS	57
A.4.1.3. Determinación de proteínas mediante <i>single cell</i> -ICP-MS	61
A.4.2. Análisis con resolución espacial empleando espectrometría de masas	65
A.4.2.1. Estudios de <i>imaging</i> empleando ablación láser ICP-MS	67
A.4.2.2. Estrategias de cuantificación por LA-ICP-MS	69
B. OBJETIVOS	3
C. EXPERIMENTAL GENERAL	88
C.1. INSTRUMENTACIÓN	89
C.1.1. Instrumentación empleada en la caracterización de los MNCs	89
C.1.1.1. Dispersión Dinámica de la luz (DLS)	89
C.1.1.2. Medidas por espectroscopía	91

C.1.1.3. Microscopía electrónica: HR-TEM y EDX	92
C.1.2. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA PARA LA DETECCIÓN DE LAS INMUNOSONDAS POR MS Y FLUORESCENCIA	93
C.1.2.1. Espectrometría de masas elemental: ICP-MS.....	93
C.1.2.2. Sistemas de ablación laser	98
C.1.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL	100
C.1.3. Instrumentación general	101
C.2. MATERIALES Y REACTIVOS	103
C.2.1. Material general	103
C.2.1.1. Material empleado en los cultivos celulares	104
C.2.2. Reactivos generales	104
C.2.2.1. Reactivos para la síntesis de las inmunosondas metálicas.....	105
C.2.2.2. Reactivos para los análisis por ICP-MS & LA-ICP-MS.....	106
C.2.2.3. Reactivos empleados en inmunoensayos, IHC e ICC.....	107
C.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS	108
C.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	109
C.4.1. Síntesis de MNCs solubles en agua mediante una estrategia <i>bottom-up</i>	110
C.4.1.1. Protocolo de purificación de los MNCs por ultracentrifugación	113
C.4.1.2. Almacenamiento de los MNCs	113
C.4.2. Digestión ácida de los MNCs para su detección por ICP-MS.....	114
C.4.3. Caracterización de los MNCs.....	115
C.4.3.1. Caracterización óptica.....	115
C.4.3.2. Caracterización morfológica y estructural.....	116
C.4.3.3. Análisis por ICP-MS: rendimiento de la síntesis & concentración de los MNCs.....	118
C.4.4. Síntesis de las inmunosondas metálicas: estrategia de bioconjugación mediante el enlace de la carbodiimida	118
C.4.5. Caracterización de las inmunosondas metálicas: cálculo del factor de amplificación.....	120

C.4.6. Protocolo de desparafinación de los tejidos FFPE	122
C.4.7. Protocolos de cultivo y tratamiento de la línea celular HRPEsv40	122
C.4.7.1. Descongelación y expansión de la línea celular.....	122
C.4.7.2. Conteo celular manual con el hemocitómetro.....	123
C.4.7.3. Tratamiento inflamatorio de las células HRPEsv40 con Interleuquina 1 α	124
C.4.8. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa	125
D. CAPÍTULO I.....	128
D.1. INTRODUCCIÓN	131
D.2. OBJETIVOS.....	139
D.3. EXPERIMENTAL.....	140
D.3.1. Materiales y reactivos.....	140
D.3.2. Instrumentación	141
D.3.3. Procedimientos experimentales	142
D.3.3.1. Síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs	142
D.3.3.2. Optimización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs	143
D.3.3.3. Inmunoensayo ELISA competitivo.....	144
D.3.3.4. Determinación de IgE en muestras de suero humano	147
D.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	148
D.4.1. Síntesis y caracterización de PtNCs fluorescentes.....	148
D.4.2. Caracterización espectroscópica de los PtNCs	149
D.4.3. Optimización de la síntesis de PtNCs	151
D.4.4. Caracterización estructural de los PtNCs.....	156
D.4.5. Estudios de estabilidad de los PtNCs	160
D.4.6. Estudio y elección de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs	163
D.4.7. Determinación de IgE mediante un inmunoensayo competitivo en placa basado en la detección bimodal de PtNCs	168

D.5. CONCLUSIONES.....	173
E. CAPÍTULO II.....	177
E.1. INTRODUCCIÓN	179
E.2. OBJETIVOS.....	184
E.3. EXPERIMENTAL.....	185
E.3.1. Materiales y reactivos.....	185
E.3.1.1. Síntesis y caracterización de las inmunosondas metálicas	185
E.3.2. Instrumentación	186
E.3.3. Procedimientos experimentales	189
E.3.3.1. Síntesis de los MNCs (PtNCs, AuNCs, y AgNCs).....	189
E.3.3.2. Síntesis y bloqueo de las inmunosondas metálicas	189
E.3.3.3. Caracterización de las inmunosondas	191
E.3.3.4. Protocolos para los inmunoensayos en tejidos empleando las inmunosondas marcadas con MNCs y fluoróforos.....	191
E.3.3.5. <i>Imaging</i> de proteínas en secciones de tejido ocular mediante LA-ICP-MS	195
E.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	199
E.4.1. Optimización de los procedimientos de bioconjugación e IHC utilizando PtNCs como marca	199
E.4.2. <i>Imaging</i> de proteínas en tejidos oculares por LA-ICP-MS empleando PtNCs como marca elemental	201
E.4.3. Microarrays de expresión de las proteínas y estudios por inmunofluorescencia empleando Fluor Alexa®	203
E.4.4. Optimización de las condiciones para el <i>imaging</i> múltiple de proteínas por LA-ICP-MS.....	207
E.4.4.1. Optimización del método de adquisición del ICP-MS	207
E.4.4.2. Optimización de los parámetros de ablación.....	209
E.4.5. <i>Imaging</i> múltiple de proteínas en secciones de ojo humano.....	213

E.4.5.1. Caracterización de las inmunosondas	213
E.4.5.2. Caracterización de los patrones de laboratorio de gelatina	218
E.4.5.3. Estudio sobre la penetración de la inmunosonda en las secciones de tejido.....	219
E.4.5.4. <i>Imaging</i> cuantitativo de proteínas por LA-ICP-MS.....	221
E.5. CONCLUSIONES.....	225
F. CAPÍTULO III.....	227
F.1. INTRODUCCIÓN	229
F.2. OBJETIVOS.....	233
F.3. EXPERIMENTAL.....	235
F.3.1. Materiales y reactivos.....	235
F.3.1.1. Síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas.....	235
F.3.1.2. Cultivo y expansión de la línea celular y tratamientos inflamatorios de las células.....	236
F.3.1.3. Protocolos de inmunocitoquímica.....	236
F.3.1.4. Análisis mediante qRT-PCR.....	236
F.3.1.5. Kits ELISA cuantitativos para la MT2A y APOE.....	237
F.3.2. Instrumentación.....	237
F.3.3. Procedimientos experimentales.....	239
F.3.3.1. Protocolo para la síntesis de AuNCs monodispersos.....	239
F.3.3.2. Síntesis y caracterización de las inmunosondas.....	240
F.3.3.3. Cultivo de células HRPEsv40 y tratamientos inflamatorios.....	241
F.3.3.4. Preparación de las células HRPEsv40 para qRT-PCR.....	243
F.3.3.5. Preparación de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante inmunoensayo ELISA.....	244
F.3.3.6. Preparación de las células HRPEsv40 para inmunocitoquímica.....	245
F.3.3.7. Protocolo de ICC para la inmunolocalización de APOE y MT2A en células HRPEsv40 fijadas.....	246

F.3.3.8. <i>Imaging</i> de proteínas en células individuales mediante LA-ICP-MS.....	248
F.3.3.9. Preparación de los patrones de calibración unicelulares (HRPEsv@AuNCs)	249
F.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	252
F.4.1. Síntesis de AuNCs monodispersos	252
F.4.1.1. Evaluación del índice de polidispersidad (PDI).....	252
F.4.1.2. Caracterización estructural de los AuNCs@LA y AuNCS@DHHLA....	254
F.4.1.3. Caracterización elemental de los AuNCs@LA y AuNCS@DHHLA por ICP-MS.....	255
F.4.2. Elección del tratamiento inflamatorio para las células HRPEsv40: análisis qRT-PCR y ELISA	256
F.4.2.1. Análisis de la expresión genética por qRT-PCR (APOE y MT2A).....	257
F.4.2.2. Determinación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 por ELISA	259
F.4.3. Optimizaciones previas del ensayo inmunocitoquímico para la detección de APOE y MT2A.....	260
F.4.3.1. Caracterización de las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h- MT2A:AuNCs	261
F.4.3.2. Optimización la concentración de los anticuerpos primarios	262
F.4.3.3. Evaluación de la penetración de la inmunosonda en las células por microscopía confocal.....	265
F.4.1. Inmunolocalización de las proteínas citosólicas en células HRPEsv individuales mediante LA-ICP-MS	269
F.4.2. Desarrollo de una nueva estrategia de cuantificación <i>matrix-matched</i> para determinar proteínas en células por LA-ICP-MS	274
F.4.3. Cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 mediante LA- ICP-MS utilizando patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs	280
F.5. CONCLUSIONES.....	286
 G. CAPÍTULO IV	 289

G.1. INTRODUCCIÓN	290
G.2. OBJETIVOS.....	294
G.3. EXPERIMENTAL.....	296
G.3.1. Materiales y reactivos.....	296
G.3.1.1. Síntesis de las inmunosondas metálicas: Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs	296
G.3.1.2. Expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular e inmunoensayo de las células en suspensión.....	296
G.3.1.3. Reactivos para el análisis por <i>single-cell</i> -ICP-MS.	296
G.3.2. Instrumentación	297
G.3.3. Procedimientos experimentales	298
G.3.3.1. Preparación de las células HRPEsv40 en suspensión.....	298
G.3.3.2. Protocolo de inmunoensayo en células HRPEsv40 en suspensión empleando inmunosondas con AuNCs	301
G.3.3.3. Análisis por sc-ICP-MS y procesamiento de los datos	302
G.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	306
G.4.1. Preparación de la muestra para la detección de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 intactas mediante sc-ICP-MS	306
G.4.1.1. Monitorización de un elemento intrínseco de las células HRPEsv40..	306
G.4.1.2. Protocolo para la fijación de las células HRPEsv40	308
G.4.1.3. Optimización del inmunoensayo para la detección de proteínas empleando AuNCs como marca elemental	309
G.4.1.4. Configuración del sistema de introducción de muestra	312
G.4.2. Selección del tiempo de adquisición en el ICP-MS	314
G.4.3. Optimización de la dilución de la muestra para el análisis de células HRPEsc40 por sc-ICP-MS.....	315
G.4.4. Tratamiento de los datos: criterios para la discriminación de eventos celulares siguiendo las señales de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$	318

G.4.5. Determinación de APOE y MT2A en células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs: células CT y tratadas con IL-1 α	321
G.4.5.1. Determinación de MT2A en células HRPEsv40.....	321
G.4.5.2. Determinación de APOE en células HRPEsv40	325
G.5. CONCLUSIONES.....	330
H. CONCLUSIONES GENERALES.....	333
I. ANEXO 1.....	339

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema visual de la anatomía del ojo humano donde se muestra un corte transversal del globo ocular y una ampliación de la zona anterior del ojo, esquema hecho con Biorender.com.	4
Figura 2: Estructura de las capas celulares de la retina (esquema hecho con BioRender.com).....	5
Figura 3: Campo visual de una persona sin patologías oculares (imagen izquierda) y visión de los pacientes con DMAE (imagen derecha).....	7
Figura 4: Esquema resumen de las manifestaciones y tipos de DMAE resultantes del avance de la enfermedad que implica el deterioro y muerte celular de la región fotorreceptores-EPR-MBr-coroides. (esquema hecho con BioRender.com)	10
Figura 5: Esquema de la patogénesis de la DMAE y su relación con las proteínas APOE, MT2, APP y CFH. Esquema adaptado de la ref. ¹⁶	13
Figura 6: Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia tras el etiquetado inmunohistoquímico con anticuerpos específicos de proteínas que identifican acumulación en las drusas (círculos de hidroxapatita en violeta) de: a) proteína APP (rojo) y CFH (verde), c) mezcla de las imágenes: rojo (APP), verde (CFH) y amarillo que corresponde a otra proteína, la vitronectina. (Barras de escala: 2 μ m). Imagen adaptada de la ref ²⁴	14
Figura 7: Estructura de una inmunoglobulina G, anticuerpo.	19
Figura 8: Esquemas de los diferentes tipos de inmunoensayos ELISA. a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA tipo sándwich, y d) ELISA competitivo.....	22
Figura 9: Esquemas de los protocolos habitualmente empleados en IHC según el tipo de marcaje. a) IHC convencional empleando cromógenos, y b) inmunofluorescencia.	25

Figura 10: Fluoróforos empleados en IHC por IF. a) Línea temporal de los distintos fluoróforos empleados en IF (y citometría de flujo). Abreviaturas de las moléculas orgánicas de gran tamaño que poseen varios fluorocromos: phycoerytrin (PE), allophycocyanin (AP) – imagen adaptada de la ref , y b) Espectros de emisión de los fluoróforos Alexa Fluor® - imagen adaptada de la ref..... 28

Figura 11: Ejemplos de imagings empleando etiquetas fluorescentes para la identificación de proteínas en células mediante inmunofluorescencia. En la imagen a) adaptada de la ref. se emplean dos marcas Alexa Fluor® 488 y 647 para detectar un biomarcador cis-golgi (GM130) en células Hela (en rojo, Alexa® 647) y la α -tubulina (en verde, Alexa® 488). En la imagen b) adaptada de la ref.⁵⁰ se emplean diferentes QDs (emisión a 565, 605, y 655 nm siendo la detección verde, amarilla y roja, respectivamente) para identificar 3 biomarcadores diferente en linfoblastos (fosfo TDP, TDP-43 y α -tubulina)..... 29

Figura 12: Esquema de las etapas de la estrategia analítica de marcaje a seguir con una inmunosonda para la determinación de biomoléculas por ICP-MS: (I) preparación de la inmunosonda metálica, (II) reacción de reconocimiento de la proteína, y (III) posibilidades de detección por ICP-MS..... 37

Figura 13: Resumen de las diferentes aproximaciones de etiquetado de un anticuerpo con una nanopartícula metálica..... 44

Figura 14: Esquema de las bandas de energía típicas en NPs metálicas y NCs, donde se observa como al reducir su tamaño se produce la creación de los niveles de energía discretos. 49

Figura 15: Tipos de moléculas empleadas como agentes estabilizantes en la síntesis de MNCs..... 52

Figura 16: Esquema resumen donde se muestran las diferentes estrategias que se pueden seguir para la síntesis de MNCs..... 53

Figura 17: Esquema de los dos tipos de estrategias que se pueden realizar para determinar el contenido total de un analito en un cultivo celular empleando ICP-MS.

En la parte superior se indica el procedimiento a seguir para conocer el contenido total promedio del analito en la población celular, mientras que en la parte inferior se muestra el tipo de información que se obtiene para cada célula individual. 56

Figura 18: Esquema general donde se muestra comparativamente como son los análisis por ICP-MS con nebulización convencional y single cell – ICP-MS. En la imagen superior se muestra la intensidad obtenida al analizar una disolución homogénea del analito (Neb. Conv.-ICP-MS) frente al análisis mediante sc-ICP-MS de células individuales de una suspensión celular que se muestra en la imagen inferior. 59

Figura 19: Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al.¹⁷¹. 64

Figura 20: Esquema de la configuración de un sistema láser acoplado a ICP-MS. 68

Figura 21: Flujo de trabajo de la técnica de imaging empleando citometría de masas (CyTOF™). Imagen adaptada de la referencia Giensen et al.¹⁹⁸. 77

Figura 22: Imágenes cuantitativas obtenidas para la distribución de MTs 1/2 en secciones de retina humana por LA-ICP-MS empleando como etiqueta metálica AuNCs. La imagen A corresponde a la imagen óptica del tejido antes de su análisis por LA-ICP-MS. Las imágenes B-E muestran la concentración de proteína MT1/2 en diferentes secciones de un donante control. Imagen adaptada de la ref. 201 78

Figura 23: Sistema de introducción de muestra para sc-ICP-MS empleado para la determinación de proteínas en células individuales. En la imagen se muestra el nebulizador de bajo volumen de Meinhard®, y una cámara de nebulización concéntrica Asperon® de consumo total de Perkin Elmer. 96

Figura 24: Esquema del sistema ICP-MS de sector magnético. 97

Figura 25: Esquema general de la síntesis de MNCs siguiendo la estrategia bottom-up. En el ejemplo se emplea el ácido lipoico como ligando tiolado y agente estabilizante. 111

Figura 26: Esquema de las etapas requeridas para la síntesis de AuNCs, AgNCs y PtNCs.	113
Figura 27: Esquema general de la reacción de la carbodiimida para establecer un enlace amida entre el grupo carboxílico del MNCs y el grupo amino del Ab (esquema modificado de la ref ¹⁶)	119
Figura 28: Esquema donde se resumen las diferentes etapas del inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo diseñado para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas metálicas (Anti-h-Ab:MNCs).....	121
Figura 29: Esquema de los cuadrantes de la cámara Neubauer y explicación del cálculo de la concentración celular.....	124
Figura 30: Esquema del mecanismo de hipersensibilidad tipo I por el que se desencadena una reacción alérgica mediada por la Inmunoglobulina E (IgE), siendo este el biomarcador. Cuando un individuo está en presencia del alérgeno se produce un aumento en la producción (concentración) de IgE.....	136
Figura 31: Estudio para optimizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs. Esquema de las etapas del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto para evaluar la pérdida de funcionalidad del Ab específico al ser bioconjugado con diferentes relaciones molares de PtNCs.	144
Figura 32: Esquema de las etapas del inmunoensayo competitivo empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs para la detección directa de la proteína (IgE) por microscopía de fluorescencia confocal.	145
Figura 33: Esquema donde se recoge cómo es la última etapa del protocolo experimental para el inmunoensayo con detección por MS elemental. En la imagen se muestra cómo es la recogida y digestión de la muestra para su análisis por ICP-MS con nebulización convencional.	146
Figura 34: Caracterización espectroscópica de la síntesis de PtNCs. a) Espectros de absorbancia de los reactivos utilizados para la síntesis de los PtNCs, así como de la suspensión de PtNCs sintetizada (línea negra continua: PtNCs, línea negra	

punteada: H_2PtCl_6 , y línea gris continua: ácido lipoico). Todos los reactivos han sido diluidos 1:6 en agua desionizada para llevar a cabo las medidas, b) Espectros de fluorescencia molecular característicos obtenidos para los PtNCs, y c) Fotografía de las disoluciones de síntesis tras 15 h de reacción, al inicio de la síntesis (0 h), y blanco de síntesis..... 151

Figura 35: Efecto del tiempo de síntesis en la señal de fluorescencia de los PtNCs para una relación molar Pt:LA: NaBH_4 de 1:5:1 (intensidades normalizadas; dado el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima obtenida para 13 h). Las incertidumbres representan la desviación estándar de la media de tres medidas para de tres síntesis diferentes de PtNCs..... 153

Figura 36: Emisión fluorescente de los PtNCs sintetizados con diferentes volúmenes de NaOH (2 M) añadido a la mezcla de síntesis. Para fines comparativos, la fluorescencia se midió al mismo pH (pH final 3) para las tres síntesis. $\lambda_{\text{ex}}=455$ nm. 154

Figura 37: Histogramas obtenidos a partir de las imágenes por HR-TEM de las suspensiones coloidales de PtNCs sintetizados donde se muestra la distribución del diámetro empleando: (a) 20 μL de NaOH, y (b) 30 μL de NaOH. Los diámetros han sido medidos con el software Fiji-ImageJ..... 157

Figura 38: Imágenes obtenidas para la caracterización estructural de los PtNCs sintetizados empleando 30 μL de NaOH 2M, a) imagen de HR-TEM (10 nm de escala), b) Imagen de HR-TEM (5 nm de escala), c) gráfico EDX con la composición elemental, d) patrón SAED, y e) zoom de la imagen de HR-TEM donde se observan los planos atómicos de la estructura cristalina (dLspacing)..... 159

Figura 39: Gráficas donde se puede observar la influencia del pH en la emisión fluorescente y estabilidad de los PtNCs sintetizados y purificados. a) Influencia del pH en la fluorescencia de los PtNCs, y b) Medidas del potencial-Z (medida indirecta de la estabilidad de los PtNCs) a los diferentes valores de pH. Las barras de error en la figura a) representan la desviación estándar de tres medidas de fluorescencia para tres síntesis de PtNCs diferentes..... 161

Figura 40: Gráfico comparativo de la fluorescencia medida a 620 nm para las suspensiones de PtNCs purificadas y almacenadas en diferentes condiciones a lo largo de tres meses. TA= temperatura ambiente. 162

Figura 41: Gráfico de la evolución de la emisión fluorescente de los PtNCs (620 nm) monitorizada durante 2 h (7200 s) con excitación constante a 455 nm. 163

Figura 42: Estudio de la funcionalidad de la inmunosonda con las diferentes relaciones molares ensayadas Ab:PtNCs (1:0-1:50) mediante la medida de la absorbancia a 450 nm para el producto resultante tras el revelado colorimétrico del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de medida para cada relación molar. 164

Figura 43: Caracterización fluorescente de los PtNCs libres y los bioconjugados Ab:PtNCs con res relaciones molares diferentes (1:1, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs). La medida de la fluorescencia se realiza a 620 nm. 165

Figura 44: Estudio de la inmunosonda Ab:PtNCs empleando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs mediante medidas por fluorescencia e ICP-MS. a) Relación lineal observada entre la fluorescencia detectada en los bioconjugados en disolución y la relación molar real Ab:PtNCs, y b) Relación entre la masa de Pt detectada por ICP-MS en los pocillos ELISA de los experimentos recogidos en la Fig. 44a y la relación molar real Ab:PtNCs. Las desviaciones corresponden a la desviación de n=3 pocillos (réplicas del inmunoensayo). 167

Figura 45: Curvas de calibración obtenidas para la determinación de IgE empleando un inmunoensayo con formato competitivo en el que se utiliza la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs (relación molar 1:11,13 Ab:PtNCs). (a) Gráfico de calibración por detección de fluorescencia con microscopía láser confocal ($\lambda_{ex}=470$ nm, rango $\lambda_{em}=610-650$ nm). El eje Y de la gráfica corresponde a la densidad integrada normalizada de la señal de fluorescencia de los PtNCs en cada pocillo empleando el programa ImageJ. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de dos medidas independientes, (b) Gráfico de calibración por ICP-MS (isótopo medido ^{195}Pt). El eje Y corresponde a la concentración de Pt,

calculada mediante una curva de calibración externa con patrón interno (^{193}Ir). Las marcas negras circulares corresponden a los estándares de proteína IgE en solución PBS para construir la curva de calibración, mientras que las marcas con forma de rombo corresponden a los sueros enriquecidos (con diferentes concentraciones de estándar IgE). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de la media de tres medidas independientes..... 170

Figura 46: Factor de amplificación de la detección de IgE: representación de los moles de Pt determinados por ICP-MS por pocillo de la placa ELISA frente a los moles de IgE incubados durante el inmunoensayo competitivo..... 171

Figura 47: Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión para una sección de tejido ocular procedente de un donante que padece DMAE donde se pueden visualizar las acumulaciones de drusas en la región del EPR. a) Drusas individuales (señaladas con una flecha) y acumulación grupal de drusas (cuadrado) - zoom 20x, y b) Zoom 40x del grupo de drusas marcado en la imagen a). 179

Figura 48: Esquema del protocolo ICH empleado con las inmunosondas metálicas para detección de las proteínas de interés por LA-ICP-MS (se monitorizan las señales $^{195}\text{Pt}^+$, $^{197}\text{Au}^+$ y $^{107}\text{Ag}^+$). a) Imaging individual empleando los PtNCs bioconjugados a cada uno de los anticuerpos primarios, y b) Imaging múltiple empleando AuNCs, AgNCs, y PtNCs para crear tres inmunosondas independientes para cada proteína (Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs). 193

Figura 49: Esquema del protocolo de IHC seguido con los tejidos oculares para la detección fluorescente de las proteínas. a) Empleando un fluoróforo Alexa® 594, y b) Empleando la inmunsonda Anti-h-MT1/2:AuNCs donde se realiza la detección directa de la fluorescencia de los AuNCs. TA = temperatura ambiente. 195

Figura 50: Protocolo llevado a cabo para preparar los patrones de gelatina para realizar la calibración por LA-ICP-MS. La gelatina es suplementada con los

metales (Au, Pt y Ag) que ha sido empleados como marcas en las inmunosondas con MNCs..... 197

Figura 51: Perfil obtenido para la señal de $^{195}\text{Pt}^+$ en el análisis por LA-ICP-MS de una línea de ablación a lo largo de las capas de la retina en secciones consecutivas de tejido ocular humano control tras el protocolo de IHC empleando la inmunosonda Anti-h-APP:PtMCs y utilizando diferentes relaciones molares PtNCs:hidroxilamina: a) 1:0, b) 1:20, c) 1:50, y d) 1:100. La longitud de las líneas de ablación en los tejidos oculares oscila entre 165 mm y 285 mm. 201

Figura 52: Distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las capas de la retina en tres secciones consecutivas de tejido ocular humano de un donante control empleando los PtNCs como etiqueta en la inmunosonda y detección por LA-ICP-MS. La columna 1 muestra en todos los casos las imágenes ópticas de la región analizada obtenidas con la cámara del sistema láser. La columna 2 muestra la imagen elemental de $^{195}\text{Pt}^+$ (señal de intensidad en cps) obtenida por LA-ICP-MS para la detección individual de tres proteínas (14 líneas ablación): a) MT1/2, b) CFH, y c) APP..... 202

Figura 53: Perfil de expresión génica de las isoformas MT1/2 (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M Y MT1X, y MT2A), CFH, y APP en diferentes regiones de tejidos oculares humanos [cuerpo ciliar (CB), retina, epitelio pigmentario de la retina (EPR), y esclera]. La señal de hibridación relativa obtenida para cada gen se normalizó con los controles internos y se expresó como unidades arbitrarias (u.a.). La barra de escala de MT1/2 corresponde al eje secundario. 204

Figura 54: Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia para MT1/2, APP, y CFH en diferentes regiones de tejidos oculares humanos (donante control) donde se ha llevado a cabo IHC empleando anticuerpos secundarios de cada suero primario marcados con Alexa® 594 (emisión roja) y tinción DAPI de los núcleos celulares (emisión azul). Las imágenes a) y b) muestran la región de la retina neurosensorial, mientras que las imágenes c-f muestran la zona de los cuerpos ciliares (zona pars plicata). a) CFH, b) APP, c) APP, d) CFH, e) MT1/2, y f) Control negativo donde se

ven zonas con autofluorescencia (zonas pigmentadas). CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado. 206

Figura 55: Imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, APP, y CFH en la región de la retina de un donante control obtenidas por LA-ICP-MS empleando los MNCs como marca elemental. Las imágenes de la fila superior han sido obtenidas con el método de ICP-MS de adquisición individual (3 secciones de retina adyacentes, monitorizando sólo 1 isótopo por región; tiempo de adquisición = 0.23 s). Las imágenes de la fila inferior fueron obtenidas empleado el método del ICP-MS de adquisición múltiple (1 sola región en un solo tejido, monitorizando 3 isótopos secuencialmente; tiempo de adquisición = 1,74s). 209

Figura 56: Estudio del efecto que tiene el flujo de He (gas portador) en la intensidad de las señales ($^{107}\text{Ag}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$, y $^{197}\text{Au}^+$) para el análisis en un patrón de gelatina ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por LA-ICP-MS. Las intensidades representan la señal promedio obtenida para la señal neta de cada isótopo al ablacionar una línea en la gelatina con una duración de 250 s. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar del valor promedio de la intensidad a lo largo de una línea de ablación. 210

Figura 57: Imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las regiones adyacentes de la pars plicata del cuerpo ciliar de un donante humano control tras el protocolo de IHC con inmunosondas marcadas con MNCs (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). La primera columna recoge en todos los casos la imagen óptica de la región analizada. La fila superior corresponde a las condiciones criogénicas de ablación (-20°C) con una velocidad de barrido de $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, la fila intermedia corresponde a los análisis a temperatura ambiente (25°C) con una velocidad de $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, y la fila inferior a condiciones criogénicas (-20°C) y velocidad de $2,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. CS: estroma ciliar; PCE: epitelio ciliar pigmentado; NPCE: epitelio ciliar no pigmentado. 212

Figura 58: Esquema de las etapas experimentales llevadas a cabo para obtener el imaging cuantitativo de proteínas en secciones de tejidos biológicos empleando LA-ICP-MS y MNCs como marca elemental. Como se muestra en la parte de la

izquierda del esquema, previamente al análisis por ICP-MS es necesario realizar la caracterización de las inmunosondas marcadas para conocer el factor de amplificación de cada inmunosonda. 214

Figura 59: Curva de calibrado empleada para la caracterización de las inmunosondas Anti-h-CFH:AgNCs y Anti-h-APP:PtNCs. La representación muestra la curva de calibrado de patrón IgG de conejo para la cuantificación del Ab disponible en las inmunosondas. 215

Figura 60: Curvas de calibrado obtenidas por ICP-MS para determinar la concentración de Au, Pt, y Ag en las Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes..... 217

Figura 61: a) Perfil de ablación obtenido para el análisis de un patrón de gelatina por LA-ICP-MS empleando las condiciones optimizadas para el imaging de proteínas, y b) Curvas de calibración obtenidas para el Au, Pt, y Ag obtenidas tras el análisis por LA-ICP-MS de los patrones de gelatina dopadas con los tres metales (la concentración metálica en la gelatina fue determinada previamente por ICP-MS con nebulización convencional – **Tabla 10**). Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes..... 219

Figura 62: Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para la región de la retina neurosensorial en u tejido ocular (donante control) para estudiar la penetración de la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs en todo el espesor del tejido. La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de MT1/2) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). a) Imágen de máxima intensidad construida a partir de las 45 secciones realizadas cada de 0,4 μm de profundidad, b) y c) Imágenes en profundidad de 10 μm de espesor justo en la INL de la retina (región marcada con línea amarilla), d) y e) Imágenes de una sección transversal yz donde se observa la distribución de la MT1/2 a lo alrgo de las diferentes capas de la retina (corte marcado con línea naranja)..... 220

Figura 63: Imaging cuantitativo de proteínas obtenido por LA-ICP-MS para un tejido ocular en la región del EPR de un donante control tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs) (60 líneas de ablación). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. Las imágenes 2D se construyeron con el software Image J después de convertir las señales de intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, $^{107}\text{Ag}^+$ y $^{195}\text{Pt}^+$ en concentración de proteínas (con el programa Excel). 222

Figura 64: Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (60 líneas de ablación)... 223

Figura 65: Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). a) MT1/2, b) CFH, y c) APP. La acumulación de proteínas observada en las drusas está marcada con flechas en las imágenes. (30 líneas de ablación)... 223

Figura 66: Esquema resumen de las diferentes estrategias ensayadas para la síntesis (bottom-up) de AuNCs monodispersos. 240

Figura 67: Etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección directa de los AuNCs por LA-ICP-MS o fluorescencia empleando las inmunosondas Anti-h-APOE: AuNCs o Anti-h-MT2A: AuNCs. 247

Figura 68: Esquema de las etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección indirecta empleando anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa®. 248

Figura 69: Resumen de las etapas necesarias para llevar a cabo la determinación de proteínas (APOE y MT2A) en células HRPEsv40 empleando LA-ICP-MS y marcaje de las células con AuNCs. La estrategia de calibración propuesta está basada en la síntesis y caracterización de patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs con la misma matriz de la muestra. A la izquierda (en naranja) se resumen las etapas necesarias para preparar y caracterizar los patrones de calibración unicelulares, y a la derecha (en azul) los pasos seguidos para obtener el imaging con la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40. 251

Figura 70: Caracterización de la síntesis de AuNCs empleando diferentes tiempos de reacción (temperatura ambiente). a) Índice de polidispersidad (PDI) en función del tiempo de síntesis, y b) Emisión fluorescente a 720 nm. La raya discontinua horizontal en la gráfica a, denota el nivel máximo al cual se considera una disolución coloidal moderadamente polidispersa (valores más altos de 0.25 no son aceptados)..... 253

Figura 71: Micrografías obtenidas por HR-TEM para la caracterización estructural de las síntesis de AuNCs. a-c) AuNCs @DHLA, y d-f) AuNCs@LA-aging. Las imágenes e y f se corresponden con las imágenes obtenidas para el patrón SAED. 255

Figura 72: Resultados de qRT-PCR para los genes de APOE y MT2A tras varios tratamientos inflamatorios: TGFB1, IL-1 α y DEX empleando diferentes concentraciones y tiempo de incubación. Empleo del gen GUSB como control endógeno para la normalización. Las barras de error corresponden a los números de ciclos de expresión obtenidos para RQ máximo y RQ mínimo. RQ: cuantificación relativa. 259

Figura 73: Concentración de proteína (expresada en fg de proteína por célula) obtenida mediante un enzoinmunoensayo ELISA (kit comercial) para las células HRPEsv40 CT y sometidas a un tratamiento inflamatorio con IL-1 α (24 h y 48 h). a) APOE, y b) MT2A. Las barras de error corresponden a la desviación propagada

para la cuantificación de 3 muestras y las desviaciones asociadas al conteo del número de células para cada suspensión celular (conteo manual 3 veces)..... 260

Figura 74: Imágenes de fluorescencia obtenidas para el fluoroinmunoanálisis indirecto en células HRPEsv40 utilizando Fluor Alexa® (el color verde se debe al Fluor Alexa® 488, mientras que el color rojo se debe al Fluor Alexa® 594). Estos estudios se han realizado para la optimización de la concentración de los anticuerpos primarios en las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs. a) Anti-h-APOE, control negativo (sin Ab primario), b) Dilución 1:50 Anti-h-APOE, c) Dilución 1:100 Anti-h-APOE, d) Dilución 1:200 Anti-h-APOE, e) Anti-h-MT2A, control negativo (sin Ab primario), f) Dilución 1:23 Anti-h-MT2A, g) Dilución 1:46 Anti-h-MT2A, y h) Dilución 1:115 Anti-h-MT2A..... 264

Figura 75: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 α (c y d). La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de APOE: inmunosonda Anti-h-APOE:AuNcs) y la emisión azul a la tinción DAPI (núcleo de las células). Las imágenes a y c corresponden con la superposición de la emisión de DAPI y la inmunosonda, y las imágenes b y d sólo muestran la emisión de la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. Las imágenes de plano XZ corresponden al estudio de penetración de la inmunosonda y son las imágenes en profundidad de las células marcadas con línea blanca discontinua en a y c. (AuNCs (rojo): λ_{ex} =405 y λ_{em} =680-730 nm y DAPI (azul): λ_{ex} =405 y λ_{em} =450-470 nm) 266

Figura 76: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 α (c y d). Las imágenes a y c corresponden con la superposición del canal DAPI (azul) y del canal verde correspondiente a la emisión del Ab secundario fluor Alexa®488 (distribución de APOE en verde), y las imágenes b y d corresponden con la distribución de APOE (Ab secundario fluor Alexa®488). Las imágenes XZ de la derecha corresponden a los perfiles en profundidad en las células marcadas con las

líneas blancas discontinuas en las imágenes a y c. (Alexa®488 (verde): $\lambda_{ex}=488$ y $\lambda_{em}=500-520$ nm y DAPI (azul): $\lambda_{ex}=405$ y $\lambda_{em}=450-470$ nm)..... 267

Figura 77: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal de los controles negativos del inmunoensayo empleando AuNCs como etiqueta de fluorescencia. Para realizar estas medidas se añadieron AuNCs libres (i.e., no conjugados) a las células HRPEsv40. a y b) Células HRPEsv40 CT y, c y d) Células HRPEsv40 tratadas con IL-1 α . Las imágenes a y d presentan la superposición de los canales rojo (AuNCs) y azul (DAPI), y las imágenes c y d además superponen el canal de contraste de fase (gris)..... 268

Figura 78: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. a) Distribución de APOE en células CT, b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de APOE en células tratadas con IL-1 α , b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células tratadas con IL-1 α antes del muestreo por LA. 270

Figura 79: Histogramas (frecuencia de pixeles frente a intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, en cps) obtenidos para el análisis de APOE en células HRPEsv40 CT (células #1 y #2) y tratadas con IL-1 α (células #4 y #5) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína APOE..... 271

Figura 80: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. a) Distribución de MT2A en células CT, b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de MT2A en células tratadas con IL-1 α , b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células tratadas con IL-1 α antes del muestreo por LA. 273

Figura 81: Histogramas (frecuencia de pixeles frente a intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, en cps) obtenidos para el análisis de MT2A en células HRPEsv40 CT (células #1,

#2, y #3) y tratadas con IL-1a (células #5, #8, y #11) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-h-MT2a: AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para la detección de la proteína MT2A. 274

Figura 82: Estudios de viabilidad celular para preparar los patrones HRPEsv@AuNCs unicelulares. En la gráfica y la figura se muestran los valores obtenidos para el número de células al con concentraciones de AuNCs en el rango entre 0-350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las desviaciones estándar corresponden a tres conteos de alícuotas diferentes de la misma suplementación. 276

Figura 83: Representación gráfica de la relación observada entre las concentraciones de AuNCs empleadas para la suplementación de las células HRPEsv40 (0-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y los fg de Au por célula para los patrones HRPEsv@AuNCs tras análisis por ICP-MS. Las desviaciones estándar corresponden a 3 réplicas de la suplementadas con la misma concentración. 276

Figura 84: Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv@AuNCs empleando el imaging de 3 células (suplementadas con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs) analizadas por LA-ICP-MS. 278

Figura 85: Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv@AuNCs empleando el imaging de 2 células analizadas por LA-ICP-MS. Imágenes de la izquierda a-d) Suplementción de las células con 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs, e imágenes de la derecha a-d) Suplementción de las células con 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs. 278

Figura 86: Gráfico de cajas que representa el promedio de las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ por célula (determinada por LA-ICP-MS) para los diferentes patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs obtenidos tras la suplementación de las HRPEsv con diferentes concentraciones de AuNCs (0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las barras de error corresponden a la desviación calculada tras el análisis de 30 células por condición. 279

Figura 87: Gráfica de calibración obtenida empleando los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs que es empleada para la determinación de la concentración de proteínas en las células HRPEsv40 tras su análisis por LA-ICP-MS (se utilizazn las inmunosonda con AuNCs como etiqueta específica de cada proteína). La intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ por píxel para cada célula (determinada por LA-ICP-MS) se representó frente a la concentración de Au de los patrones HRPEsv@AuNCs para cada condición de suplementación con AuNCs (determinada por ICP-MS). Las barras de error del eje x corresponden a la desviación estándar del análisis de 30 células, mientras que las barras de error del eje Y corresponden a la desviación estándar calculada para el análisis de las $1 \cdot 10^6$ células digeridas por condición. 280

Figura 88: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. La escala de color en unidades de cps y fg APOE/píxel para la célula #4 ejemplifica cómo se puede hacer la cuantificación de las imágenes cualitativas obtenidas por LA-ICP-MS empleando la metodología propuesta. En la imagen de la izquierda se muestra la distribución de APOE en células CT y en la de la derecha la superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA. 283

Figura 89: Diagrama de las etapas llevadas a cabo para el tratamiento de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante análisis por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs. 299

Figura 90: Esquema de las etapas experimentales para realizar el inmunoensayo en suspensión con las células HRPEsv40. Las incubaciones con las inmunosondas se realizan por separado y paralelamente para detectar MT2A o APOE (Anti-h-MT2A:AuNCs o Anti-h-APOE, respectivamente). TA: temperatura ambiente. 302

Figura 91: Esquema de los cálculos necesarios para transformar la señal de las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ en cps detectada en el ICP-MS (i.e., detección de los eventos

celulares) en masa de proteína por célula (expresada como fg de proteínas por célula).
..... 304

Figura 92: Perfiles de tiempo resuelto para $^{56}\text{Fe}^+$ y $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 CT tras realizar el inmunoensayo para la determinación de APOE utilizando una incubación con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs durante toda la noche. a) Perfil para el $^{56}\text{Fe}^+$, y b) Perfil para el $^{197}\text{Au}^+$. El perfil ampliado en la imagen b) muestra un zoom del nivel de fondo para la señal de intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ 311

Figura 93: Fotografías de los montajes experimentales empleados para la introducción de muestra (suspensión celular) en el ICP-MS. a) flujo de introducción de muestra controlado por una bomba peristáltica externa (flujo de $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), y b) sistema de autoaspiración (flujo de $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). 313

Figura 94: Ejemplo del perfil obtenido para un evento celular adquirido monitorizando la señal de $^{197}\text{Au}^+$ y empleando 10 ms como tiempo de integración ($1\cdot 10^5 \text{ células}\cdot\text{mL}^{-1}$ y un flujo de $40 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). 315

Figura 95: Ensayo de dilución para células HRPEsv 40 CT donde se muestran los perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de las células (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). Se aplicaron diluciones en serie empleando el tampón TRIZMA 0,1% NaCl (pH 7,4). a) 0 células mL^{-1} , b) $1\cdot 10^4$ células mL^{-1} , c) $1\cdot 10^5$ células mL^{-1} , d) $2,5\cdot 10^5$ células mL^{-1} , e) $5\cdot 10^5$ células mL^{-1} , y f) $1\cdot 10^6$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ 316

Figura 96: Resultados obtenidos para el ensayo de dilución de la suspensión de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). En el gráfico se representa en forma de barras la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ para la población celular medida por sc-ICP-MS, así como el número de células detectadas en 175 s de tiempo de adquisición, frente a la concentración de la suspensión celular (i.e., número de células por muestra tras contarlas con el hemocitómetro). 317

Figura 97: Perfil resuelto en el tiempo para el análisis de células individuales empleando sc-ICP-MS donde se monitoriza la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs) para una muestra con una concentración de células HRPEsv40 CT de $1 \cdot 10^6$ célula \cdot mL $^{-1}$ 318

Figura 98: Estudio que ilustra cómo afecta el tratamiento de los datos con los criterios 5σ y 3σ a la señal de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ para el análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando AuNCs como etiqueta metálica en la detección de proteínas. a) Gráfico donde se observa una relación lineal entre el número de eventos celulares detectados frente a la concentración celular aplicando el mismo criterio de discriminación para el tratamiento de los datos: $5\sigma + X$ para el $^{197}\text{Au}^+$ y el $^{56}\text{Fe}^+$, y b) Perfil resuelto en el tiempo para la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ ($1 \cdot 10^5$ células \cdot mL $^{-1}$) obtenido para el análisis de células HRPEsv40 CT por sc-ICP-MS donde se marcan con una línea los umbrales calculados aplicando los criterios 3σ y 5σ (línea roja y gris, respectivamente). Las flechas rojas marcan los eventos celulares que no se tienen en cuenta en caso de aplicar el criterio $5\sigma + x$ 320

Figura 99: Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A:AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL-1 α . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio $5\sigma + x$ 322

Figura 100: Histograma de frecuencia de masa para la MT2A en células HRPEsv40 CT (CT2-R2; línea gris) y células tratadas con IL-1 α (IL3-R2; línea negra) tras su análisis por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A:AuNCs). 325

Figura 101: Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-APOE:AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL-1 α . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio $5\sigma + x$ 326

Figura 102: Histograma de frecuencias de masa para la APOE en células HRPEsv40 CT (CT2-R1; línea gris) y células tratadas con IL-1 α (IL3-R3; línea negra) tras su análisis sc-ICP-MS (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs)..... 328

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cantidades y relaciones molares de los reactivos empleados, así como condiciones de síntesis y almacenamiento, para la formación de AuNCs, AgNCs, y PtNCs..... 114

Tabla 2: Resumen de las características de los diferentes MNCs empleados en la Tesis Doctoral. En la tabla se incluye su concentración, tamaño promedio, la relación molar óptima para la bioconjugación a anticuerpos IgG (Anti-h-Ab:MNCs), y los volúmenes de cada síntesis necesarios para la reacción 120

Tabla 3: Protocolo de desparafinación e hidratación empleada para secciones de tejido ocular de bloques FFPE. 122

Tabla 4: Resumen de estrategias basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación serológica de IgE. En la Tabla se muestra el método y los materiales empleados, así como el límite de detección (LOD) alcanzado para cada uno de ellos. 137

Tabla 5: Tabla resumen donde se indica el volumen de síntesis de PtNCs empleado para llevar a cabo las diferentes bioconjugaciones con diferentes relaciones molares Ab:PtNCs 143

Tabla 6: Rendimiento del etiquetado del Ab con los PtNCs durante la síntesis de la inmunosonda mediante análisis de los bioconjugados una vez purificados por ICP-MS. 166

Tabla 7: Resultados obtenidos para la cuantificación de IgE en muestras de suero humano empleando la metodología desarrollada basada en el empleo de una inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por ICP-MS. Además, se incluye en la Tabla la concentración de IgE obtenida con un Kit ELISA comercial. En ambos casos los valores de la desviación estándar corresponden a la incertidumbre asociada a la medida de tres réplicas independientes de la misma muestra. 172

Tabla 8: Condiciones de operación para los sistemas de ablación láser e ICP-MS para el análisis de proteínas en secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS utilizando inmunosondas con MNCs (AuNCs, PtNCs, y AgNCs)..... 188

Tabla 9: Resultados obtenidos para la caracterización de las inmunosondas metálicas, en términos de concentración de Ab disponible en la inmunosonda determinada por un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo, concentración del metal determinada por ICP-MS, factor de amplificación (N), y relación molar Ab:MNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes. 216

Tabla 10: Concentraciones de Au, Pt, y Ag encontradas en los patrones de laboratorio de gelatina analizados por ICP-MS tras su digestión ácida. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes. 218

Tabla 11: Parámetros empleados para el análisis por nebulización convencional ICP-MS (lisados celulares e inmunosondas metálicas) y para los estudios de imaging por LA-ICP-MA con las células HRPEsv (CT y tratadas con IL1 α) y los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs..... 238

Tabla 12: Resumen de los diferentes experimentos llevados a cabo con las células HRPEsv40. En la Tabla se recoge el soporte empleado para el crecimiento celular, el número de células, y las etapas de procesamiento celular necesarias para realizar los diferentes experimentos. Trip.: tripsinización (tripsina-EDTA al 0,25%), Extr.: extracción..... 242

Tabla 13: Resumen de los diferentes tratamientos inflamatorios ensayados con las células HRPEsv40. TGF β 1: Factor de crecimiento transformante beta humana recombinante, DEX: Dexametasona, IL-1 α : Interleuquina-1 α humana recombinante..... 243

Tabla 14: Resultados obtenidos por ICP-MS para la determinación de la concentración de Au en las síntesis de AuNCs: AuNCs@LA-aging y

AuNCs@DHLA. Rend.: rendimiento de la reacción. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar de tres digestiones ácidas de cada síntesis medida por ICP-MS..... 256

Tabla 15: Resultados obtenidos para la masa de APOE en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1^a) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs..... 282

Tabla 16: Resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPEsv40 (CT & tratadas con IL-1^a) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. 284

Tabla 17: Parámetros optimizados para los análisis de células HRPEs por sc-ICP-MS 298

Tabla 18: Protocolos de fijación empleados con las células HRPEsv40 en suspensión: fijación tradicional vs fijación suave 301

Tabla 19: Resultados experimentales obtenidos por sc-ICP-MS para el análisis de diferentes elementos constituyentes de las células HRPEsv 40 en una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL-1 α). 307

Tabla 20: Resultados obtenidos para la optimización del protocolo de fijación celular (fijación tradicional y fijación suave) en el que se realiza el recuento de células HRPEsv40 empleando la cámara de Neubauer. 309

Tabla 21: Resultados obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 (CT e IL-1 α) tratadas con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs empleando dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos: 5 σ para la señal de ¹⁹⁷Au⁺ y 3 σ y 5 σ para la señal de ⁵⁶Fe⁺. Eventos detectados durante una adquisición de 90 s (n=3 réplicas instrumentales para ¹⁹⁷Au⁺ y n=2 para ⁵⁶Fe⁺). . 319

Tabla 22: Resultados experimentales obtenidos para la determinación de MT2A en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (Rep. Bio.) para cada

condición (CT e IL-1 α) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3). 324

Tabla 23: Resultados experimentales obtenidos para la determinación de APOE en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (Rep. Bio.) para cada condición (CT e IL-1 α) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3). 327

A.INTRODUCCIÓN

La presente Tesis Doctoral intenta abordar la falta de metodologías lo suficientemente sensibles y robustas para la cuantificación de biomoléculas, en particular, de proteínas. Éstas suelen ser pieza clave en la mayoría de los procesos biológicos implicados en el inicio y avance de un amplio abanico de enfermedades. Por ello, en esta introducción se intentará dar una visión general del problema biológico planteado, así como de las estrategias utilizadas actualmente para el estudio de enfermedades, así como de las biomoléculas implicadas desde un punto de vista analítico. Finalmente se hará hincapié en las estrategias de cuantificación de proteínas basadas en la espectrometría de masas elemental.

A.1. ESTUDIO DE BIOMOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Uno de los principales objetivos de la investigación clínica actual en enfermedades neurodegenerativas es mejorar su detección temprana, así como la detección presintomática de la disfunción neuronal. También es una tarea pendiente, evaluar la progresión de la enfermedad para dar un mejor entendimiento de la misma. El cómo, qué, y por qué se desarrollan muchas enfermedades sigue siendo un enigma aún sin resolver. Por ello, uno de los puntos clave de los estudios clínicos se centra en la búsqueda de biomarcadores, es decir, biomoléculas cuyo comportamiento o estado en ciertos procesos biológicos es signo de una afección o de una enfermedad¹. Dentro de este contexto, encontrar un buen candidato es una tarea ardua que requiere de técnicas altamente sensibles que permitan a su vez, su cuantificación en muestras biológicas.

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de proteínas de interés en la enfermedad ocular denominada degeneración macular asociada a la edad (DMAE), relacionada con la disfunción del sentido de la visión. Con el objetivo de poder dar

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

una mejor comprensión de la DMAE, y siendo esta una enfermedad ocular, a continuación, se describe brevemente la estructura y fisiología del sistema visual.

A.1.1. Estructura y fisiología del ojo

El ojo es el principal órgano que compone el sistema visual. Este es responsable de captar y enfocar la luz sobre las capas neurosensoriales de la retina con el objetivo de transformar la energía luminosa en estímulos nerviosos que son transportados a través del nervio óptico hasta la corteza visual del cerebro. Es ahí donde se procesan y se perciben conscientemente las imágenes². Anatómicamente, el ojo humano está formado por tres capas primarias que rodean el globo ocular (**Figura 1**). La túnica fibrosa constituida por la esclera y la córnea (capa más externa), la úvea o túnica vascular compuesta por el iris, los cuerpos ciliares (CB) y la coroides (capa intermedia), y la túnica neurosensorial (la más interna) formada por la retina y su epitelio pigmentario de la retina (EPR). Estas capas rodean el cristalino, el humor acuoso y el cuerpo vítreo.

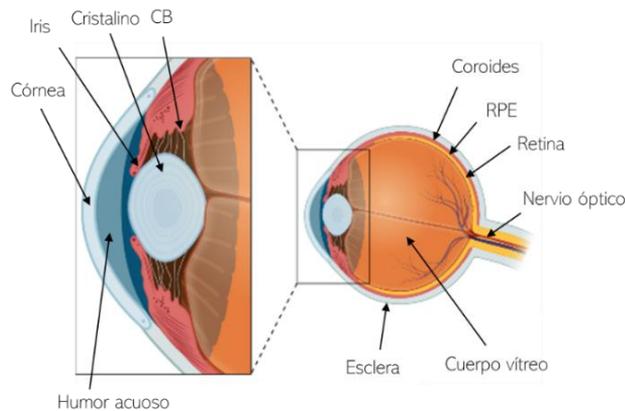


Figura 1: Esquema visual de la anatomía del ojo humano donde se muestra un corte transversal del globo ocular y una ampliación de la zona anterior del ojo, esquema hecho con Biorender.com.

Cada uno de los tejidos y estructuras celulares que conforman el ojo tienen funciones específicas que permiten un buen funcionamiento del sistema visual. Sin

² I. S. Fox, Fisiología Humana, séptima edición. McGraw Hill Interamericana, Madrid (2003). Capítulo 10. Fisiología sensorial.

embargo, es la retina neurosensorial y el EPR, las estructuras directamente relacionadas con el desarrollo de la DMAE y por ello se dará una descripción más detallada de las mismas.

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

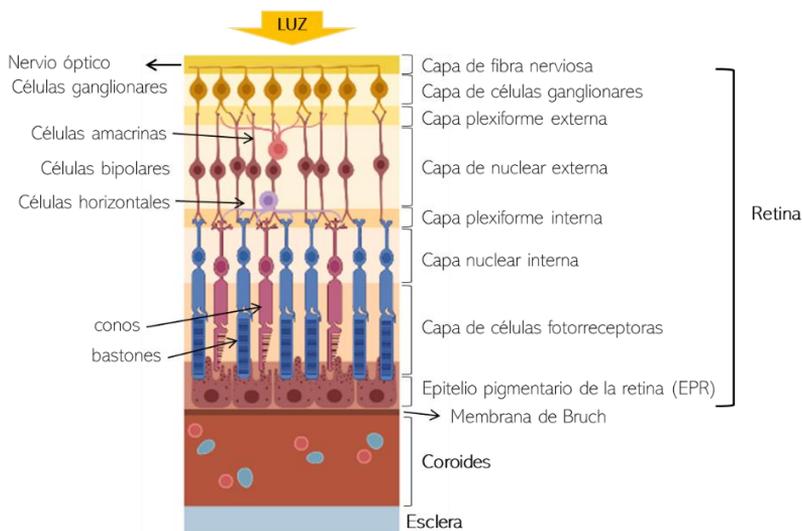


Figura 2: Estructura de las capas celulares de la retina (esquema hecho con BioRender.com).

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

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

El EPR es una monocapa continua de células pigmentadas que se sitúa entre los vasos sanguíneos del coroides y los segmentos externos sensibles a la luz de los fotorreceptores. Sus funciones están estrechamente ligadas con el mantenimiento y viabilidad de las células fotorreceptoras y consiguiente mantenimiento de la retina. De manera resumida, entre sus funciones se encuentran: (1) la absorción de la energía luminosa enfocada por el cristalino en la retina, (2) transporte de iones, agua y productos metabólicos finales desde el espacio subretiniano a la sangre, (3) absorción de nutrientes de la sangre (p.ej., glucosa, retinol y ácidos grasos) para ser entregados a los fotorreceptores, y (4) mantener la excitabilidad de los fotorreceptores por medio de la reisomerización del retinol, asegurar la composición iónica en el espacio subretiniano, fagocitar y digerir los segmentos externos de los fotorreceptores desprendidos o secretar factores de crecimiento como objetivo estructural⁵.

A la vista de sus múltiples funciones, el EPR es esencial para mantener una función visual normal. De ahí que cualquier alteración en sus funciones puede provocar la disfunción de los fotorreceptores y la subsecuente degeneración de la retina, causando pérdida o perturbaciones en la visión que pueden desembocar en ceguera⁵.

A medida que envejecemos, las células, tejidos y órganos de nuestro organismo sufren un deterioro inevitable, afectando este envejecimiento de igual manera a los tejidos y células del órgano visual: el ojo. Esto provoca una pérdida progresiva de su eficacia y funcionalidad lo que juega un papel fundamental en la aparición de patologías oculares relacionadas con el envejecimiento como son las cataratas⁶, el glaucoma⁷ o la DMAE⁸, entre otras.

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

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

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

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

A.1.2. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

La DMAE es la principal causa de ceguera irreversible en la población envejecida (> 60 años) del mundo desarrollado⁸, representando el 6-9% de la ceguera por causa legal a nivel mundial. De hecho, se estima que, en el año 2040, 280 millones de personas padezcan esta enfermedad⁹. La DMAE se caracteriza por un deterioro visual progresivo debido a la neurodegeneración de la región fotorreceptora-EPR, especialmente notable en la región retiniana de la mácula, zona con mayor densidad de células fotorreceptoras. Este hecho implica una pérdida de la agudeza visual en el campo central de la visión⁸. Como ejemplo, en la **Figura 3** se ilustra la percepción visual de una persona sana (imagen de la izquierda) y la percepción visual de un paciente con DMAE en fase avanzada (imagen de la derecha).

El desarrollo de la DMAE está estrechamente relacionado con la edad, aunque es una patología multifactorial donde el tabaquismo, la dieta y factores genéticos son también factores de riesgo. Además, debido a que la retina está continuamente expuesta a radiación solar directa y a un alto consumo de oxígeno, el estrés oxidativo y la inflamación crónica juegan un papel fundamental en la aparición y desarrollo de esta patología¹⁰.



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

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

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

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

Clínicamente la DMAE se clasifica en dos estadios clínicos diferenciados, el temprano que evoluciona progresivamente hasta su fase tardía en el cual, la DMAE se puede manifestar en dos fenotipos patológicos¹¹: DMAE seca (atrofia geográfica) o húmeda (neovascularización). A continuación, y apoyándonos en la (**Figura 4**), se explica de manera más detallada cómo es la evolución y los fenotipos patológicos en los que se puede manifestar la enfermedad en su fase tardía.

□ La DMAE temprana e intermedia

Se identifica clínicamente con la aparición de depósitos extracelulares de tamaño pequeño/medio (denominados drusas) localizados específicamente entre el EPR y la membrana de Bruch (BrM) o como manifestaciones pigmentarias anómalas en el EPR (**Figura 4** DMAE temprana-intermedia). De hecho, en estas primeras etapas la gravedad de la enfermedad se puede estimar atendiendo al tamaño y número de las drusas. Las drusas son depósitos con alta concentración de proteínas, lípidos y minerales que provocan una deficiencia o dificultad en el intercambio metabólico al bloquear la entrada de nutrientes y el flujo de salida de fluidos desde el EPR al coroides.

Los pacientes que evolucionan a la DMAE intermedia presentan al menos una drusa de gran tamaño ($>124 \mu\text{m}$) y numerosas drusas más pequeñas, así como depósitos drusenoides subretinianos. En este caso se produce una atrofia geográfica que no llega a extenderse al centro de la mácula. La aparición de numerosas drusas o de

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

tamaño mayor que obstaculizan el flujo metabólico normal, provoca la inducción de estrés en las células del EPR desencadenando una respuesta inflamatoria crónica que ocasiona la atrofia y muerte de las células fotorreceptoras (DMAE a sus estadios tardíos) y por ende a la pérdida irreversible de la visión¹¹.

□ La DMAE tardía (DMAE seca o húmeda)

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

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

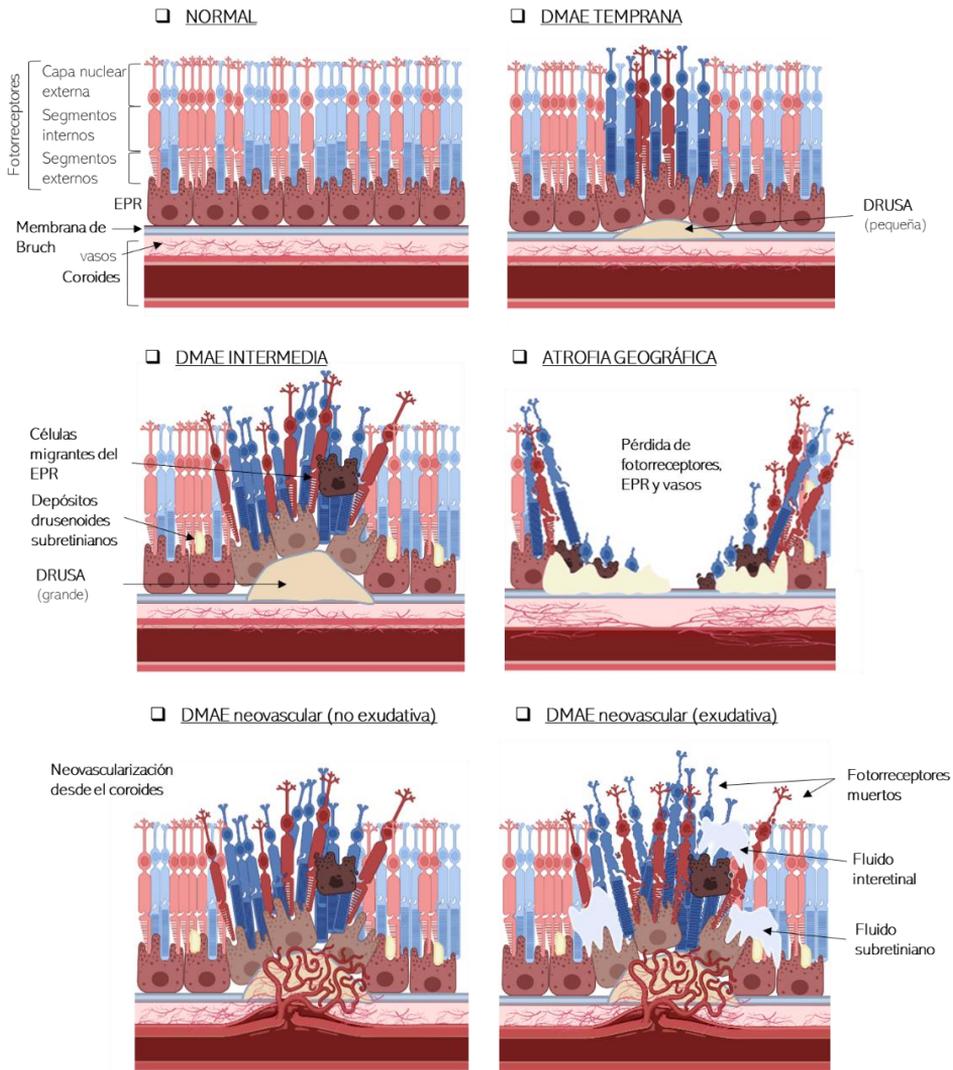


Figura 4: Esquema resumen de las manifestaciones y tipos de DMAE resultantes del avance de la enfermedad que implica el deterioro y muerte celular de la región fotorreceptores-EPR-MBr-coroides. (esquema hecho con BioRender.com)

Siendo una enfermedad degenerativa altamente influenciada por el deterioro celular debido al envejecimiento, existen tratamientos que pueden frenar, disminuir e incluso recuperar la pérdida de visión en aquellos pacientes que sufren de DMAE tipo húmeda (neovascular). De hecho, puede tratarse eficazmente gracias al desarrollo de nuevos fármacos antiangiogénicos, que se inyectan en el interior del ojo (inyecciones intravítreas) y actúan inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular

(anti-VEGF) para impedir la formación de nuevos vasos sanguíneos anómalos¹². A mayor rapidez del tratamiento y en sus estadios más iniciales, por lo general mejor será el pronóstico visual. Sin embargo, respecto a la DMAE seca (atrófica), siendo el fenotipo más frecuente no tiene más tratamiento que el de intentar evitar factores de riesgo (p.ej., hipertensión arterial, tabaquismo o colesterol) y adoptar hábitos saludables. Sin embargo, sigue sin existir un tratamiento efectivo a día de hoy. Por el momento, una opción es la prescripción por parte del oftalmólogo de determinados suplementos de vitaminas antioxidantes, que ayudan a proteger la retina¹³.

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

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

Existen estudios que relacionan varias proteínas con el desarrollo y avance de la DMAE, sea por su implicación directa en procesos biológicos de protección frente al estrés oxidativo o inflamación, en la activación de la cascada del complemento, o por la formación y acumulación directa en los depósitos subretinianos (drusas y drusenoides). Algunas de las proteínas previamente estudiadas en enfermedades oculares y neurodegenerativas son las metalotioneínas (MTs), la proteína precursora amiloide (APP), el factor de crecimiento H (CFH) o la apolipoproteína E (APOE)^{14,15,16}. A continuación, se dará una visión general, su función y su implicación el desarrollo de la DMAE.

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

¹³ H.M. Zając-Pytrus, A. Pilecka, A. Turno-Kręcicka, J. Adamiec-Mroczek, M. Misiuk-Hojło The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The Current Concepts of Pathogenesis and Prospects for Treatment. *Adv Clin Exp Med.* 6, (2015), 1099-104.

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

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

¹⁶ M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between Apolipoprotein E Metabolism and Retinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Life*, 11 (2011), 635

En la **Figura 5** se esquematiza un modelo de patogénesis de DMAE que integra factores de riesgo clave (externos y genéticos) y la implicación de varias proteínas. Por una parte, el intercambio desequilibrado de lipoproteínas (p.ej., APOE) debido a factores de riesgo como el alto consumo de grasas y el tabaquismo, puede dar lugar a la formación de depósitos de drusenoides, que a su vez actúan como focos de inflamación a través de las interacciones entre APOE, β -amiloide (APP) y la consecuente activación de la cascada del complemento¹⁷. Esta activación provoca a su vez la activación microglía y la actividad de los macrófagos infiltrados que promueven un entorno de inflamación crónica bajo la influencia de los polimorfismos genéticos (p.ej. variantes de la CFH). Paralelamente, factores externos como la luz solar provoca estrés oxidativo (aumento de ROS en la región ocular), el cual induce directamente ciclos de inflamación crónica (donde las MTs juegan un papel clave). De manera general, todos estos factores conducen a la degeneración del EPR y de los fotorreceptores, y finalmente al desencadenante de una DMAE avanzada (atrofia geográfica o neovascularización)¹⁶.

Las **metalotioneínas (MT)** son una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) que constan de 4 isoformas, MT1, MT2, MT3 y MT4 (en humanos), siendo las MT1, 2 y 3 las presentes en los tejidos oculares. Tal y como se encuentra recogido en el trabajo de González-Iglesias et al.¹⁵ las MTs presentan elevada abundancia a lo largo de las diferentes regiones oculares y ésto parece indicar su relación directa con la neuroprotección y equilibrio de procesos biológico para mantener un buen funcionamiento del órgano de la visión. De hecho, esta familia de proteínas participa en procesos de homeostasis y transporte de metales (Zn o Cu). En este contexto, el complejo Zn-MT está estrechamente relacionado con la protección frente al estrés oxidativo y la inflamación. Ambas situaciones críticas en el desarrollo de la DMAE. El ciclo redox del complejo Zn-MT es capaz de neutralizar las especies

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

reactivas de oxígeno (ROS), inhibiendo su toxicidad y genotoxicidad cuando se producen etapas de estrés oxidativo. Además, también están implicadas en la eliminación de las citoquinas proinflamatorias liberadas durante procesos inflamatorios¹⁸.

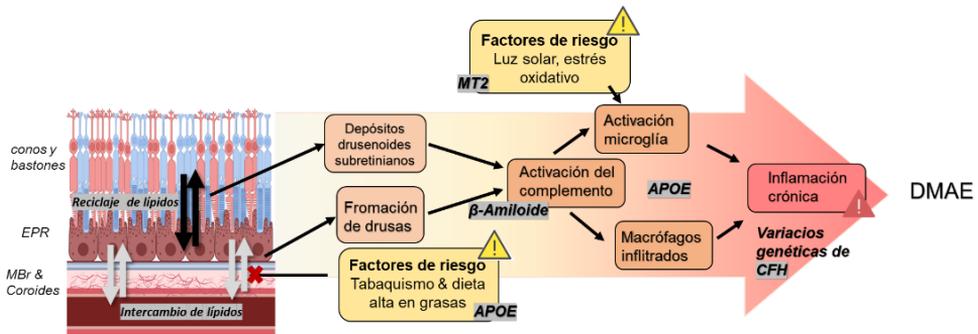


Figura 5: Esquema de la patogénesis de la DMAE y su relación con las proteínas APOE, MT2, APP y CFH. Esquema adaptado de la ref.¹⁶

Por su parte, la **apolipoproteína E (APOE)**, una de las isoformas de las apolipoproteínas, está encargada del transporte de lípidos. Este hecho hace que esté estrechamente relacionada con la formación de las drusas, las cuales acumulan lípidos. El desajuste en el transporte entre el coroides y las células del EPR (**Figura 5**) provoca acumulación lipídica en la zona subretinal.¹⁹ De hecho, se ha observado que la APOE es una de las proteínas más abundantes en la composición de drusas de ojos humanos¹⁶. Además, se ha visto que está involucrada en la activación de la cascada del complemento, la cual provoca inflamación crónica y que está ligada al avance de la DMAE a sus etapas más agresivas. Se ha visto también que con la activación del complemento se induce una acumulación de APOE dependiente del tiempo en las células del EPR²⁰.

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

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

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

Alteraciones genéticas en el gen que codifican **el factor del complemento H (CFH)**, localizadas en el locus CFH-to-F13B, está asociado con mayores niveles de activación del complemento en la interfase EPR-coroides (**Figura 5**).²¹ Paralelamente, la proteína CFH ha sido localizada de manera abundante a lo largo de la región de la retina (células del EPR, fotorreceptores y las células ganglionares)²². Por tanto, también se postula como una proteína implicada en procesos relacionados con el sentido de la vista. Estudios inmunohistoquímicos sugieren que la insuficiencia de CFH en la interfase retina/coroides puede conducir a una activación incontrolada del complemento que provoca inflamación y consiguiente daño celular y tisular²³. Además, la CFH ha sido identificada como proteína de formación de las drusas y los depósitos laminares basales (**Figura 6**)^{Error! Marcador no definido.},²⁴. En cuanto a la proteína **β -amiloide (APP)**, ésta se ha relacionado con funciones de señalización en la activación del complemento^{Error! Marcador no definido.} a la vez que se ha inmunolocalizado de manera abundante en las drusas (**Figura 6**)

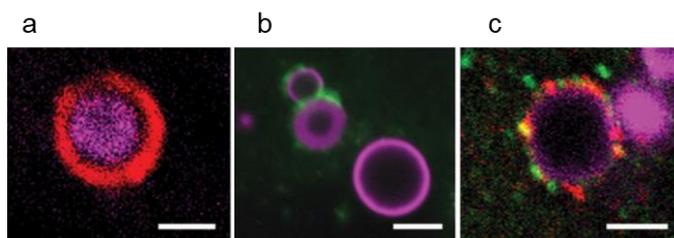


Figura 6: Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia tras el etiquetado inmunohistoquímico con anticuerpos específicos de proteínas que identifican acumulación en las drusas (círculos de hidroxapatita en violeta) de: a) proteína APP (rojo) y CFH (verde), c) mezcla de las imágenes: rojo (APP), verde (CFH) y amarillo que corresponde a otra proteína, la vitronectina. (Barras de escala: 2 μ m). Imagen adaptada de la ref²⁴.

²¹ T.D.L. Keenan, M. Toso, C. Pappas, L. Nichols, P.N. Bishop, G.S. Hageman. Assessment of Proteins Associated with Complement Activation and Inflammation in Maculae of Human Donors Homozygous Risk at Chromosome 1CFH-to-F13B. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, (2015), 4870.

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

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

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

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

La identificación y cuantificación precisa y exacta de proteínas en muestras biológicas es una tarea compleja debido a factores como la baja concentración del analito en las muestras, así como la complejidad de las matrices en las que se encuentran (p.ej., tejidos, suero, células, etc.). Por ello, todavía existe una demanda de técnicas analíticas sensibles, robustas, rápidas y fiables para llevar a cabo esta tarea²⁵. A continuación, se describen los métodos típicamente empleados en los laboratorios bioquímicos para la identificación y cuantificación de estas biomoléculas.

A.2.1. Métodos espectrofotométricos

Tradicionalmente, los métodos espectroscópicos han sido los que más se han utilizado en laboratorios bioquímicos. Estos métodos aprovechan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas para generar una señal detectable en la región ultravioleta-visible (UV/Vis) del espectro electromagnético. Además, dicha señal permite realizar la cuantificación de las proteínas, siendo la señal proporcional a la concentración de proteína en la muestra bajo estudio²⁵. En este tipo de estrategias, se realiza un calibrado externo con un estándar de proteína genérico (p.ej., seroalbúmina bovina, BSA) con el que se calcula la concentración de proteína en la muestra problema. En este contexto se pueden encontrar diferentes métodos:

- ❑ Métodos basados en la absorción intrínseca de los residuos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) del péptido o proteína (p.ej., longitudes de onda a 280 ó 260 nm, o la relación entre las longitudes de onda)²⁵.
- ❑ Métodos basados en la medida óptica de las especies absorbentes generadas por la unión de un reactivo a la proteína al ser añadido a la muestra (o patrón). En este apartado se encuentran los métodos ampliamente

²⁵ Simonian MH. Spectrophotometric determination of protein concentration. Curr. Protoc. Cell Biol. 2002 Appendix 3:Appendix 3B.

conocidos como: (1) el método Bradford²⁶, basado en la unión no covalente entre el tinte *Coomassie blue* G-250 a la proteína, el cual genera un compuesto que absorbe a 590 nm, y (2) los métodos que se basan en la formación de un complejo de Cu⁺ con la proteína. Aprovechando la oxidación del complejo es posible la reducción de sustancias colorimétricas que absorben a longitudes de onda específicas. Aquí se pueden mencionar, el método Lowry²⁷ en el que el reactivo de Folin, tras su reducción, se transforma en una especie que absorbe a 720 nm (o 500 nm), o el basado en el ácido bicinónico BCA²⁸ que, tras su reducción, absorbe a 562 nm.

- Cabe mencionar también, aquellas aproximaciones basadas en la unión de fluoróforos, es decir, en la adición de moléculas que reaccionan con péptidos/proteínas generando un compuesto detectable por emisión fluorescente²⁹. Este tipo de métodos presentan generalmente una mayor sensibilidad que los métodos basados en la absorción de radiación.

Sin embargo, estas metodologías de cuantificación de compuestos proteicos presentan serias limitaciones debido a su baja o nula especificidad, reproducibilidad y sensibilidad (normalmente en el rango $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las interferencias en la detección debida a los reactivos empleados durante los ensayos o de la propia matriz de las muestras (también pueden provocar interferencias en la detección), así como la elevada variabilidad en las uniones establecidas entre las proteínas y los reactivos colorimétricos provocan en general baja fiabilidad en los resultados²⁵.

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

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

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

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

Actualmente, estos métodos se emplean de manera rutinaria para cuantificar la cantidad de proteína total en muestras biológicas previamente lisadas y homogeneizadas. En ocasiones este tipo de análisis se llevan a cabo con el objetivo de normalizar la concentración de una proteína específica en la muestra, determinada por otra técnica/metodología alternativa³⁰. Alternativamente, en el caso de realizar la cuantificación de una única proteína mediante detección por espectrofotometría, la proteína de interés ha de ser aislada y purificada previamente empleando alguna técnica de separación (p.ej., la electroforesis en gel de poliacrilamida - dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)).

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

Convencionalmente los métodos que hacen uso de anticuerpos específicos para la determinación de una determinada proteína emplean una detección espectroscópica, realizando la medida de la absorbancia o la fluorescencia dependiendo del compuesto empleado como marca detectable (una especie cromógena o un fluoróforo, respectivamente). La molécula que genera una señal detectable es unida covalentemente mediante estrategias de bioconjugación (o afinidad biotina-estreptavidina) a una de las biomoléculas que participan en la estrategia (anticuerpo o antígeno) y su señal se relaciona con la concentración de analito (proteína). Sin embargo, a diferencia de los métodos anteriormente descritos en la sección 2.1., la base de estos métodos es la reacción inmunológica antígeno-anticuerpo caracterizada por ser de elevada especificidad y afinidad. Esto hace que estas estrategias sean muy atractivas para la identificación y cuantificación de una proteína (o biomolécula) diana, sin necesidad de una etapa de purificación o aislamiento previa. A continuación, se explicarán las bases de este tipo de estrategias, las biomoléculas implicadas, así como los métodos comúnmente empleados para la identificación y/o determinación de proteínas: Western Blot, los inmunoensayos y las técnicas inmunohistoquímicas (IHC).

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

A.2.2.1. Aspectos generales

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

Los anticuerpos más abundantes (80% del total) y los que se emplean en mayor medida en técnicas de análisis inmunoquímico, son las inmunoglobulinas G o IgG (**Figura 7**). Tienen un peso molecular de 150 kDa, y poseen una estructura en forma de Y, donde dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (50 kDa) y dos ligeras (25 kDa) se unen mediante puentes disulfuro. Además, las cadenas de aminoácidos poseen una región constante formada por 4 dominios y una región variable formada por 2. En la región variable se encuentran los sitios de unión al antígeno, conocidos como parátomos. De forma general los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales según reaccionen con uno o con varios sitios de reconocimiento de sus antígenos (epítomos), respectivamente^{31,32}.

Durante la reacción inmunológica el sitio de reconocimiento del Ab detecta específicamente el epítomo de su antígeno y se establecen enlaces no covalentes entre ambos sitios de reconocimiento. Dichos enlaces pueden ser a través de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Todas ellas tienen carácter cooperativo por lo que la existencia de múltiples interacciones débiles genera una considerable energía de enlace³². Este reconocimiento es la base de los métodos inmunoquímicos y, debido a su gran sensibilidad y especificidad, permite la determinación de antígenos presentes en diferentes tipos de muestras biológicas en concentraciones muy bajas (del orden de $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ – $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

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

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

1). A continuación, se describen brevemente los métodos basados en esta estrategia que son de importancia actualmente en laboratorios bioquímicos para la identificación y cuantificación de proteínas.

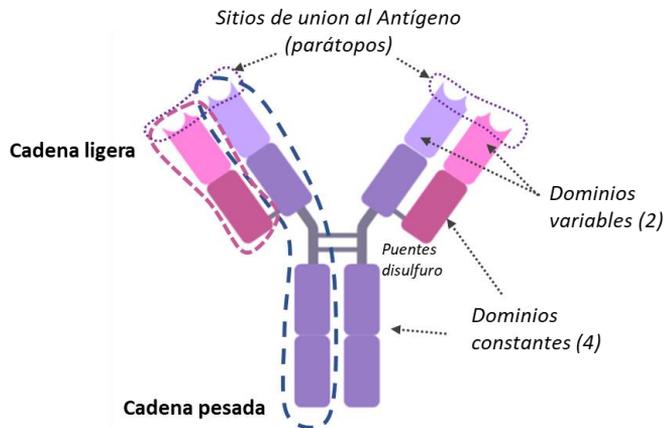


Figura 7: Estructura de una inmunoglobulina G, anticuerpo.

A.2.2.2. Los inmunoensayos tipo ELISA

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

Por una parte, los inmunoensayos que son capaces por sí mismos de indicar la reacción antígeno-anticuerpo son las denominadas técnicas inmunoquímicas sin marcadores. En este grupo se incluyen la inmunoprecipitación, inmunolectroforesis, ensayos de aglutinación, medidas de turbidez y ensayos de fijación del complemento. Sin embargo, estas técnicas sólo dan información cualitativa (i.e., si hay o no hay antígeno). Por el contrario, los métodos cuantitativos requieren de una estrategia que emplea marcadores, es decir, una molécula que se une covalentemente ya sea al Ab o al antígeno (siendo esta última menos frecuente) para poder visualizar la reacción inmunológica. En los inmunoensayos se emplean tradicionalmente como marcadores

fluoróforos, que generan una señal detectable por fluorescencia (fluoroimmunoensayo), o enzimas (enzimoinmunoensayo), las cuales catalizan reacciones que generan un producto coloreado que puede ser detectado espectrofotométricamente (región del UV/Vis).

En este contexto se puede hablar del ensayo inmunoenzimático (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*), ampliamente utilizado y comercializado para la cuantificación de antígenos como proteínas, péptidos, hormonas o anticuerpos específicos en un amplio rango de fluidos y muestras biológicas lisadas y homogeneizadas³³. En este caso, las enzimas más empleadas son la fosfatasa alcalina (AP, *alkaline phosphatase*) o la peroxidasa de rábano picante (HRP, *horse radish peroxidase*). Al añadir el sustrato de cada enzima, éstas catalizan una reacción que genera un producto coloreado, el cual puede ser detectado espectrofotométricamente (p.ej., se mide la absorbancia a una determinada longitud de onda en un lector de placas). La señal se puede relacionar con la concentración del analito, por lo que es una técnica adecuada para la determinación de proteínas

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

- a) **ELISA directo:** una proteína diana (estándar o muestra) se inmoviliza en la superficie de los pocillos de la placa y se incuba con un exceso de Ab específico marcado con la enzima. Tras un lavado (para eliminar el Ab en exceso), se añade el sustrato de la enzima y se detecta espectrofotométricamente mediante la medida de la absorbancia del producto resultante. La señal es proporcional a la concentración de proteína inmovilizada.

³³ S. D. Gan, K. R. Patel, *Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, JID. 133, (2013), 1-3.

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

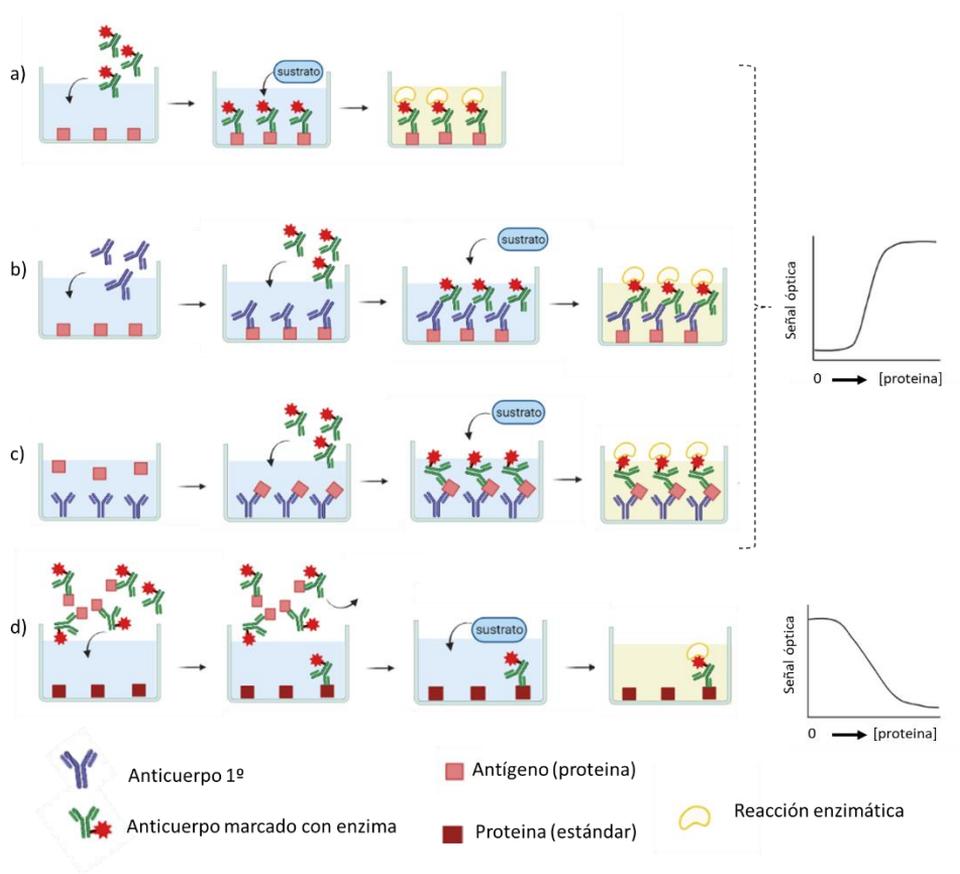


Figura 8: Esquemas de los diferentes tipos de inmunoensayos ELISA. a) ELISA directo, b) ELISA indirecto, c) ELISA tipo sándwich, y d) ELISA competitivo.

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

A.2.2.3. Western Blot

La técnica de *Western Blot* (WB) sigue siendo un ensayo muy utilizado para la identificación y cuantificación de proteínas de interés dentro de una muestra biológica compleja y está basada en el uso de anticuerpos específicos. La utilidad, el bajo coste y la accesibilidad del WB sumada a los avances en la especificidad de los anticuerpos y las nuevas estrategias de detección de la señal (p.ej., fluorescencia frente a las tinciones colorimétricas convencionales, quimioluminiscencia o radioactividad) permiten mejorar en sensibilidad, rango dinámico y facilidad de uso³⁴.

El método tradicional de cuantificación de proteínas por WB implica: (1) lisado de las muestras (en el caso de tejidos, o células) con tampones adecuados con los que poder extraer las proteínas manteniendo sus sitios de reconocimiento intactos, (2) separación electroforética de las proteínas en función de su peso molecular, (3) transferencia de las proteínas estratificadas a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF), y (4) inmunotinción empleando anticuerpos específicos marcados con enzimas o fluoróforos que permitan llevar a cabo la detección de la proteína diana (analito) mediante técnicas espectroscópicas (p.ej., absorbancia o fluorescencia). Sin embargo, la principal desventaja del WB es la necesidad de una normalización de los datos para dar valores cuantitativos fiables. Por lo general, la normalización de la señal de la proteína diana se puede realizar en base a proteínas “*housekeeping*” (proteínas que se expresan en el mismo nivel independientemente del experimento) o en base a la cantidad de proteína total. Con esta segunda opción se consigue aumentar la precisión de la determinación y su fiabilidad^{30,34}.

Cabe mencionar los últimos avances alcanzados en la técnica de WB debido al gran interés que presentan actualmente los estudios a nivel celular. Con el auge de la miniaturización y el desarrollo de los sistemas de microfluídica se han conseguido miniaturizar el WB a nivel celular: *single cell*-Western blot. En este tipo de sistemas, se cargan células en una placa con micropocillos (1 célula por pocillo) o en sistemas de

³⁴ K. Oh, Technical Considerations for Contemporary Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2261, (2021), 457-479.

microfluídica donde las células son dispersadas por el sistema. De esta manera, se realiza una lisis, separación electroforética, inmunotinción y detección de cada célula de manera individual³⁵. Con estas estrategias se intentan resolver los problemas de inespecificidad que presentan técnicas más establecidas para la visualización de proteínas a nivel celular como son la citometría de flujo o las técnicas de inmunohistoquímica (IHC) e inmunocitoquímica (ICC).

A.2.2.4. Metodologías de imaging convencional: Inmunohistoquímica /Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia convencional

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

Tradicionalmente, en clínica los métodos más comunes y ampliamente utilizados son los métodos de inmunohistoquímica (IHC) convencional (con revelado por deposición cromogénica) o inmunofluorescencia (IF). Ambos métodos son específicos ya que se basan en la reacción de alta afinidad antígeno-anticuerpo. El antígeno suele ser una proteína o glicoproteína localizada en uno o más compartimentos subcelulares, como es la membrana celular, el citosol, las mitocondrias y/o el núcleo. Típicamente el protocolo general de ambos métodos es el siguiente (**Figura 9**): (1) un Ab primario reacciona específicamente con el antígeno (biomolécula diana localizada en un tejido o célula), y (2) un Ab secundario se emplea para visualizar la distribución

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

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

de la molécula diana en el tejido o célula por medio de la detección de la señal resultante, la cual es diferente dependiendo del método. Por una parte, la molécula diana en IHC convencional es visualizada gracias al empleo de tintes cromogénicos tras reacciones enzimáticas. Es decir, en este caso el Ab secundario está marcado con una enzima. Por ejemplo, la diaminobencidina (DAB) y el 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) son los sustratos de la HRP, y *Fast Red* (sal sódica del ácido 4-amino-9,10-dihidro-1,3-dihidroxi-9,10-dioxo-2-antracenosulfónico) y NBT/BCIP (cloruro de nitroazul de tetrazolio /5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) para la enzima AP. LA imagen de la tinción resultante se puede observar fácilmente a través de un microscopio óptico³⁷. Por otro lado, el marcaje para medidas por IF utiliza moléculas que emiten fluorescencia (fluoróforos) bioconjugadas al Ab primario o secundario. En este caso, la señal se puede detectar con un microscopio de epifluorescencia convencional o empleando microscopía confocal (esta última permite obtener imágenes con mejor resolución)^{38,39}.

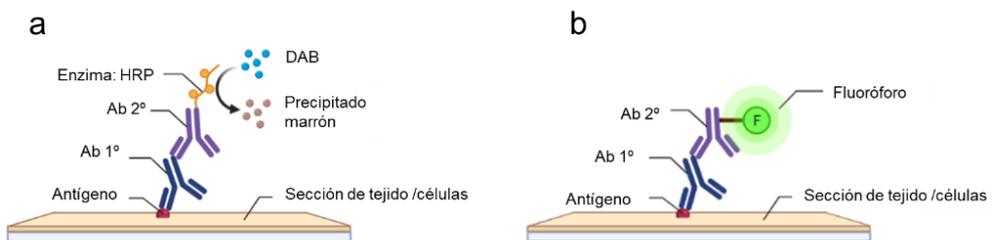


Figura 9: Esquemas de los protocolos habitualmente empleados en IHC según el tipo de marcaje. a) IHC convencional empleando cromógenos, y b) inmunofluorescencia.

Ambas metodologías presentan sus pros y contras, los cuales están brevemente recogidos a continuación. Sin embargo, en primer lugar, se debe tener en cuenta que la aplicación final de cada una de ellas suele ser distinta dependiendo principalmente de la especificidad y resolución lateral requerida en cada caso. Por una

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

³⁸ H. Mori, R.D. Cardiff. Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. In: J. Ursini-Siegel, N. Beauchemin, (eds) *The Tumor Microenvironment. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, NY. 1458. (2016)

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

parte, la IHC convencional es adecuada para analizar la distribución de las células positivas a los marcadores en un área relativamente grande de las muestras de tejidos, mientras que el análisis con detección fluorescente (IF) es más adecuado para la localización subcelular de las moléculas diana³⁸. Los métodos inmunohistoquímicos (IHC) e inmunocitoquímicos (ICC) son metodologías similares que se diferencian en el tipo de muestra. Mientras que en el caso de IHC se emplean secciones de tejido embebidos en parafina o congelados, en ICC lo que se miden son células intactas asiladas o en cultivos. Sin embargo, salvo algunas diferencias en el procesamiento de los tejidos (los cuales son detallados más adelante en esta sección), las etapas experimentales son similares. Por ello, las diferencias de IHC convencional e IF son también aplicables a ICC (convencional e IF) y se hará referencia siempre a IHC (para poder seguir la explicación).

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

IHC por inmunofluorescencia (IF): Los enfoques basados en la detección por fluorescencia presentan la ventaja de ser más selectivos y pueden detectar más de dos antígenos simultáneamente, además de que la resolución de las imágenes es claramente mejor debido en gran medida a los microscopios empleados (epifluorescencia o confocal). Sin embargo, aun superponiéndose a las desventajas de la IHC convencional, presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, la imposibilidad de detección múltiple (>7 parámetros) debido a la superposición de las bandas de emisión de los fluoróforos empleados. Es decir, los amplios espectros de absorción y emisión

limitan el rango dinámico y el número de moléculas que se pueden visualizar simultáneamente^{40,41}. En segundo lugar, las señales de fluorescencia pueden “blanquearse” (efecto *bleaching* o fotodegradación) ya sea por un exceso de exposición a la fuente de luz de alta energía o por un almacenamiento prolongado. Por otro lado, algunos fluoróforos pueden provocar fototoxicidad lo que limita su empleo en estudios *in vivo*. Además de esto, la detección fluorescente en muestras biológicas se ve fuertemente limitada por la autofluorescencia de la muestra que puede afectar a la detección selectiva de las marcas y por tanto imposibilitar la cuantificación⁴². Cabe destacar el gran auge y la necesidad de detección múltiple para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, ha hecho que se desarrollen estrategias de detección múltiple por IHC de inmunofluorescencia (mIHC-IF) tanto para tejidos⁴¹ como para células individuales, la citometría de flujo, basadas en ciclos de tinción de anticuerpos para poder detectar un mayor número de moléculas (>7 parámetros)⁴³. Sin embargo, estas metodologías se ven limitadas a su vez por la eliminación de anticuerpos involuntariamente que pueden provocar ciclos de tinción consecutivos, o que los ciclos sean incompletos y que pueden afectar a la antigenicidad de la biomolécula diana en la muestra^{44,45}.

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

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

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

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

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

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

□ Etiquetas fluorescentes empleadas en IF

En cuanto a los fluoróforos más empleados hoy en día en IF (**Figura 10**), las moléculas orgánicas de pequeño tamaño denominadas Alexa Fluor® (comercializadas por la casa comercial Thermo Fisher Scientific) son frecuentemente utilizadas como marcadores en células y tejidos. Los espectros de excitación y emisión de la serie Alexa Fluor® cubren el espectro visible y se extienden al infrarrojo, estando cada uno de ellos numerado según su máximo de excitación (en nm)⁴⁶.

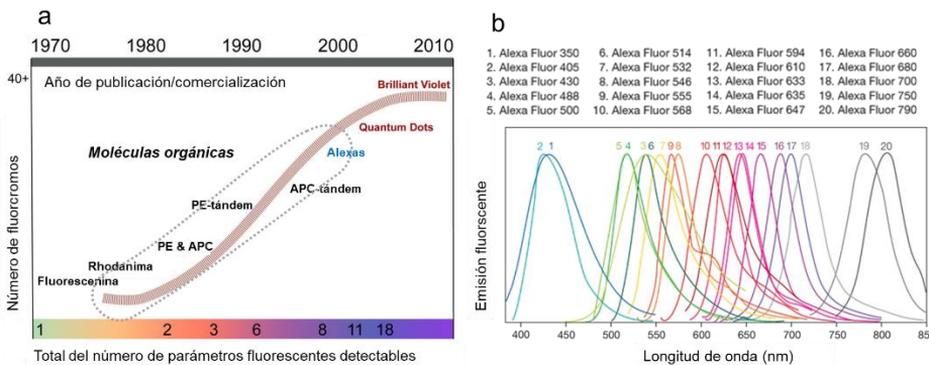


Figura 10: Fluoróforos empleados en IHC por IF. a) Línea temporal de los distintos fluoróforos empleados en IF (y citometría de flujo). Abreviaturas de las moléculas orgánicas de gran tamaño que poseen varios fluorocromos: phycoerythrin (PE), allophycocyanin (AP) – imagen adaptada de la ref⁴⁷, y b) Espectros de emisión de los fluoróforos Alexa Fluor® - imagen adaptada de la ref⁴⁸.

Con el desarrollo de la nanotecnología, se han introducido además como marcas alternativas a los fluoróforos convencionales nanoestructuras fluorescentes. Los Quantum Dots (QDs) (**Figura 10**) son un tipo de nanomaterial semiconductor, con un tamaño entre 2 nm y 10 nm que presentan una serie de ventajas como son una alta emisión fotoluminiscente sintonizable y presentan una gran estabilidad. Sin embargo, puede producirse intermitencia en su emisión fluorescente⁴⁹. Un ejemplo de

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

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

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

⁴⁹ 13. Chattopadhyay PK, et al. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med.*12, (2006) 972–977.

imaging multiparamétrico con detección por fluorescencia empleando QDs se describe en el trabajo de Tosat-Bitrián et al.⁵⁰ donde se utilizan tres QDs bioconjugados con anticuerpos secundarios, los cuales emiten en la región del visible a 565, 605, y 655 nm (rojo, amarillo, y verde, respectivamente), para la determinación de 3 moléculas citoplasmáticas de linfoblastos (**Figura 11b**). Hay numerosas aplicaciones de esta familia para el marcaje de biomoléculas en tejidos y células. En la **Figura 11** se muestran dos ejemplos de la identificación múltiple biomarcadores en células. Por una parte, en la **Figura 11a** se emplean dos ALEXA fluor® diferentes para identificar GM130 y α -tubulina en células HeLa.

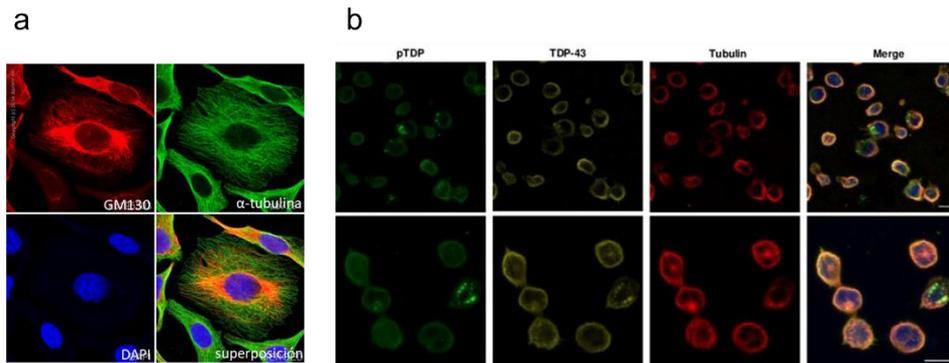


Figura 11: Ejemplos de *imaging*s empleando etiquetas fluorescentes para la identificación de proteínas en células mediante inmunofluorescencia. En la imagen a) adaptada de la ref.⁵¹ se emplean dos marcas Alexa Fluor® 488 y 647 para detectar un biomarcador cis-golgi (GM130) en células HeLa (en rojo, Alexa® 647) y la α -tubulina (en verde, Alexa® 488). En la imagen b) adaptada de la ref.⁵⁰ se emplean diferentes QDs (emisión a 565, 605, y 655 nm siendo la detección verde, amarilla y roja, respectivamente) para identificar 3 biomarcadores diferente en linfoblastos (fosfo TDP, TDP-43 y α -tubulina).

□ Procesamiento de las muestras para IHC e IF

Es importante tener en cuenta que en este tipo de estudios hay que realizar un procesamiento adecuado de las muestras para realizar estudios de *imaging* de biomoléculas de manera correcta. De este modo, en las secciones de tejido o los cultivos

⁵⁰ C. Tosat-Bitrián, A. Avis-Bodas, G. Porras, D. Borrego-Hernández, A. García-Redondo, A. Martín-Requero, V. Palomo. CdSe Quantum Dots in Human Models Derived from ALS Patients: Characterization, Nuclear Penetration Studies and Multiplexing. *Nanomaterials*. 11, (2021), 671.

⁵¹ Abcam <https://www.abcam.com/alexa-fluor-647-gm130-antibody-ep892y-cis-golgi-marker-ab195303.html#lb> (última consulta: 02/05/2022)

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

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

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas de referencia para la identificación y cuantificación de proteínas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la posibilidad de cuantificación está limitada por la influencia de la matriz de la muestra durante la medida (i.e., efectos de matriz). De este modo, aunque técnicas tan conocidas como el *electrospray* (ESI-MS) o *Matrix-Assisted Laser Dissociation/Ionization* (MALDI-MS) se asocian habitualmente con la identificación y determinación de biomoléculas (aportan información estructural y molecular muy valiosa), no son intrínsecamente técnicas cuantitativas^{52,53}. Esto se debe a que en ambos casos se emplean fuentes de ionización “suaves” (que no llegan a atomizar las muestras por completo)

⁵² H. Bin, Y. Zhong-Ping, Detection of native proteins using solid-substrate electrospray ionization mass spectrometry with nonpolar solvents. *Anal. Chim. Acta.* 1004, (2018), 51-57.

⁵³ D.J. Ryan, J.M. Spraggins, R.M. Caprioli. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. *Curr Opin Chem Biol.* 48, (2019) 64-72.

y por ello son dependientes de la naturaleza química del analito y sobre todo de la matriz donde ésta se encuentra⁵⁴.

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

A.3.1. DETECCIÓN ELEMENTAL EMPLEANDO ICP-MS

A.3.1.1. Aspectos generales

En el análisis por nebulización convencional mediante ICP-MS, la muestra en disolución es transformada en un aerosol líquido mediante un sistema de nebulización (nebulizador y cámara de nebulización). El aerosol es conducido mediante un flujo de gas portador (Ar) hasta alcanzar el plasma, a través del tubo central de la antorcha de cuarzo, donde se genera el plasma de Ar. La generación del plasma se produce cuando un flujo de gas es sometido a un campo electromagnético oscilante inducido por una corriente de radiofrecuencias. En el interior del plasma se alcanzan temperaturas de 5000-10000 K, y por ello, cuando el aerosol alcanza el plasma, éste posee energía suficiente para provocar la: (1) desolvatación, (2) vaporización, (3) atomización, e (4) ionización de todos los componentes de la muestra. Todos aquellos elementos con un potencial de ionización menor a 15,76 eV (primer potencial de ionización del Ar) son ionizados, formándose, principalmente, iones monoatómicos

⁵⁴ F. Calderón-Celis, J. Ruiz-Enzinar. A reflection on the role of ICP-MS in proteomics: Update and future perspective. *Journal of Proteomics* 198 (2019) 11–17

y monopositivos^{56,55}. Los iones formados son conducidos hacia el analizador de masas a través de una interfase de extracción, donde son separados en función de su relación masa/carga (m/z) y, finalmente, llegan a un detector donde se mide su señal, la cual es proporcional a su abundancia en la muestra⁵⁶.

Una de las características y ventajas principales que presenta el análisis por ICP-MS es el hecho de que la ionización del elemento/isótopo es independiente de la estructura química del compuesto y por lo tanto independiente de la matriz de la muestra. Para fines cuantitativos es muy ventajoso puesto que no es necesario utilizar estándares específicos para cada analito, ya que cualquier compuesto que contenga el elemento detectable objetivo (a excepción de C, H, N y O, por trabajar el plasma ICP a presión atmosférica) es útil como estándar de cuantificación (p.ej., sales inorgánicas). Sin embargo, se debe tener en cuenta que esta ventaja que presenta la técnica ICP-MS puede llegar a ser también una limitación en ciertas aplicaciones, ya que al atomizar por completo la muestra se pierde la información estructural de los analitos (importante en el caso de las proteínas y otro tipo de biomoléculas)^{54,56}.

El uso del ICP-MS como una potente técnica analítica para la determinación de trazas y ultratrazas de elementos metálicos en muestras biológicas (de amplia naturaleza) no radica sólo en su posibilidad de cuantificación, sino también en las excepcionales características analíticas que posee la técnica: elevada especificidad y sensibilidad, tanto elemental como isotópica; bajos límites de detección en el rango de los $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$ - $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para la mayoría de los elementos de la tabla periódica; capacidad multielemental y multiisotópica; amplio rango dinámico lineal (6-8 órdenes de magnitud); y gran robustez, ya que la señal obtenida es prácticamente independiente de la estructura del analito y la composición de la matriz⁵⁶.

⁵⁵ D. Pröfrock, A. Prange, Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: A review of challenges, solutions, and trends, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 843–868.

⁵⁶ J.R. Dean, *Practical Inductively Coupled Plasma Spectrometry*, Wiley, (2019).

Adicionalmente, los avances llevados a cabo a lo largo de los años en cuanto al desarrollo de diferentes analizadores de masa, por ejemplo, el ICP-MS de tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción, el ICP-MS de doble enfoque o el ICP-MS/MS (en tándem) permiten reducir las interferencias espectrales, mientras que ICP-MS con un analizador de masas tipo tiempo de vuelo permite el análisis multi-elemental quasi-simultáneo. Por otra parte, las mejoras en la electrónica para la adquisición rápida de datos hacen que el ICP-MS permita realizar análisis con resolución temporal, para aplicaciones como la detección de una sola partícula (*single particle*, sp) o de una sola célula (*single-cell*, sc)⁵⁷. Por otra parte, los instrumentos con detección simultánea como el ICP-MS tipo multicolelector (ICP-MC-MS) permiten obtener información de relaciones isotópicas de los elementos en estudio⁵⁸.

Todos estos avances en la técnica ICP-MS han contribuido a mejorar la comprensión del papel de los elementos traza y ultratrazas en diferentes procesos biológicos, así como bajo diferentes condiciones médicas⁵⁹.

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

Es bien sabido que el metabolismo de algunos elementos esenciales puede verse afectado por ciertas enfermedades, lo que provoca alteraciones en los niveles de concentración de los elementos. Por ello, su determinación en los fluidos biológicos puede proporcionar información sobre el estado de salud de los individuos^{60,61}. Han sido numerosas las publicaciones que se centran en el estudio de alteraciones en la composición elemental de ciertos minerales esenciales para relacionarlos con enfermedades degenerativas, en especial centradas en el análisis de muestras de

⁵⁷S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger L. Mueller, N. Jakubowski. Single-cell analysis by use of ICP-MS Check for updates, *J. Anal. At. Spectrom.*, 35, (2020) 1784-1813.

⁵⁸K. Sullivan, J.A. Kidder, T. Junqueira, F. Vanhaecke, M. I. Leybourne, Emerging applications of high-precision Cu isotopic analysis by MC-ICP-MS, *Sci. Total Environ.*, (2022), 156084.

⁵⁹K. Planeta, A. Kubala-Kukus, A., Drozd, A. et al. The assessment of the usability of selected instrumental techniques for the elemental analysis of biomedical samples. *Sci Rep* 11, (2021), 3704.

⁶⁰P. Zatta, R. Lucchini, S.J. Van Rensburg, A. Taylor. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull.* 62, (2003), 15–28.

⁶¹G. Perry, L.M. Sayre, C.S. Atwood, R.J. Castellani, A.D. Cash, C.A. Rottkamp, et al. Copper in the aetiology of neurodegenerative disorders. *CNS Drugs.* 16, (2002) 339–52.

suero^{60,62}. Por ejemplo, Jünemann et al.⁶³ investigaron los niveles de Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Mn y Se en muestras de humor acuoso de pacientes con DMAE (DMAE seca vs controles) mostrando que pacientes con DMAE presentaban concentraciones significativamente mayores de Cd, Co, Fe y Zn y menores de Cu al comparlas con muestras control (no diferencias para Se). Por otro lado, Aranaz et al.⁶⁴ han relacionado recientemente una concentración significativamente elevada de Mg y P en muestras de humor acuoso con una patología ocular como el glaucoma (pacientes con dos tipos de glaucoma vs pacientes control).

Paralelamente, resulta interesante también en este campo el análisis isotópico de alta precisión empleando ICP-MS tipo multicolector para la determinación de elementos minerales esenciales (p.ej., Ca, Mg, Cu, Fe, y Zn). En este caso los estudios proporcionan otro enfoque para evaluar la influencia de las enfermedades en la homeostasis de los metales esenciales⁶⁵. Varios estudios muestran que enfermedades como la cirrosis hepática y el cáncer hepatocelular, colorrectal y de mama dan lugar a variaciones isotópicas en las abundancias del Cu (⁶³Cu y ⁶⁵Cu) al ser comparadas con las muestras de suero de un grupo control⁶⁶⁻⁶⁸.

⁶² T.N. Abduljabbar, B.L. Sharp, H.J. Reid, N. Barzegar-Befroeid, T. Peto, I. Lengye Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro-sampling ICP-MS and sample dilution *Talanta*, 204 (2019), 663-66.

⁶³ A.G.M. Jünemann, P. Stopa, B. Michalke, A. Chaudhri, U. Reulbach, C. Huchzermeyer, U. Schlötzer-Schrehardt, F.E. Kruse, E. Zrenner, R. Rejdak Levels of aqueous humor trace elements in patients with non-exudative age-related macular degeneration: a case-control study *PLoS One*, 8 (2013), 56734.

⁶⁴ M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, F. Vanhaecke. Homeostatic alterations related to total antioxidant capacity, elemental concentrations and isotopic compositions in aqueous humor of glaucoma patients. *Anal Bioanal Chem* 414, (2022) 515–524.

⁶⁵ M. Aranaz, M. Costas-Rodríguez, L. Lobo, H. González-Iglesias, F. Vanhaecke, R. Pereiro, Pilot study of homeostatic alterations of mineral elements in serum of patients with age-related macular degeneration via elemental and isotopic analysis using ICP-mass spectrometry, *J. Pharma. Biomed.* 177, (2020), 112857.

⁶⁶ M. Costas-Rodríguez, Y. Anoshkina, S. Lauwens, H. van Vlierberghe, J. Delanghe, F. Vanhaecke. Isotopic analysis of Cu in blood serum by multi-collector ICP-mass spectrometry: a new approach for the diagnosis and prognosis of liver cirrhosis? *Metallomics*, 7 (2015), 491-498.

⁶⁷ V. Balter, A. Nogueira da Costa, V.P. Bondanese, K. Jaouen, A. Lamboux, S. Sangrajrang, N. Vicent, F. Fourel, P. Télouk, M. Gigou, C. Lécuyer, P. Srivatanakul, C. Bréchet, F. Albarède, P. Hainaut Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 112 (2015), 982-985.

⁶⁸ P. Télouk, A. Puisieux, T. Fujii, V. Balter, V.P. Bondanese, A.P. Morel, G. Clapissou, A. Lamboux, F. Albarède Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study *Metallomics*, 7 (2015), 299-308.

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

A.3.2. Determinación de biomoléculas mediante icp-ms: estrategias de marcaje

Hasta ahora se ha mostrado el potencial del ICP-MS como técnica de análisis elemental, sin embargo, también es posible obtener información sobre diferentes biomoléculas presentes en matrices biológicas. Por ejemplo, se pueden detectar proteínas midiendo heteroátomos como el S, Se, o P y los posibles átomos metálicos (p.ej., Fe, Cu, Zn) presentes de forma natural en las biomoléculas. También, se puede realizar un etiquetado elemental (o isotópico) exógeno con un metal o metaloide para que la molécula o moléculas de interés sean más fácilmente detectables por ICP-MS⁶⁴. Sin embargo, la complejidad intrínseca de las muestras biológicas (fluidos, células, y tejidos) hace que la determinación de biomoléculas mediante la medición de elementos, tanto endógenos como exógenos, requiera del aislamiento riguroso del analito mediante técnicas cromatográficas o electroforéticas previamente a la detección por ICP-MS.

Alternativamente, como estrategia para la cuantificación de biomoléculas por ICP-MS, se presenta el empleo de las reacciones antígeno-anticuerpo, para detectar específicamente la biomolécula diana. Para ello se requiere del etiquetado de un Ab de reconocimiento con un elemento metálico o con un nucleido estable detectable directamente por ICP-MS^{69,70}. Este tipo de metodologías, son conocidas como las

⁶⁹ R. Liu, P. Wu, L. Yang, X. Hou, Y. Liv, Inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay: a review, *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2014) 373-393.

⁷⁰ C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays, *Spectrochim. Acta B* 76(2012) 27-39.

estrategias basadas en el uso de inmunosondas metálicas específicas de proteínas diana.

Para entender este tipo de estrategias de marcaje, en la **Figura 12** se representa a modo de resumen las principales etapas a realizar. Éstas engloban en una primera etapa (i) la selección/construcción de la inmunosonda metálica (p.ej., un Ab) etiquetada con una molécula que contiene uno o varios átomos de un metal determinado (p.ej., un complejo metálico, un polímero que contiene varios complejos metálicos o una nanopartícula), así como su correcta purificación y caracterización; (ii) a continuación tiene lugar el inmunoensayo para reconocer el analito por la inmunosonda (reacción antígeno-anticuerpo), y finalmente (iii) se realiza la detección del metal de la marca por ICP-MS. Este último paso dependerá de la naturaleza de la muestra (p.ej., fluido, digerido de una muestra biológica, suspensión celular, sección de tejido, células fijadas, etc.) así como del tipo de información requerida. Por ejemplo, un cultivo celular puede ser digerido y homogeneizado para su detección por nebulización convencional-ICP-MS. Por otro lado, las células pueden ser suspendidas en un tampón salino para introducirlas de manera intacta en un sistema de *single-cell*-ICP-MS para su detección individual, o bien las células pueden ser fijadas en un porta muestras y medidas directamente con un sistema de ablación láser (LA) acoplado al ICP-MS para determinar la distribución de las proteínas en las células. En todos los casos (ICP-MS, sc-ICP-MS, y LA-ICP-MS), la identificación de la proteína diana en las células se lleva a cabo siguiendo el metal empleado en la etiqueta de la inmunosonda.

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

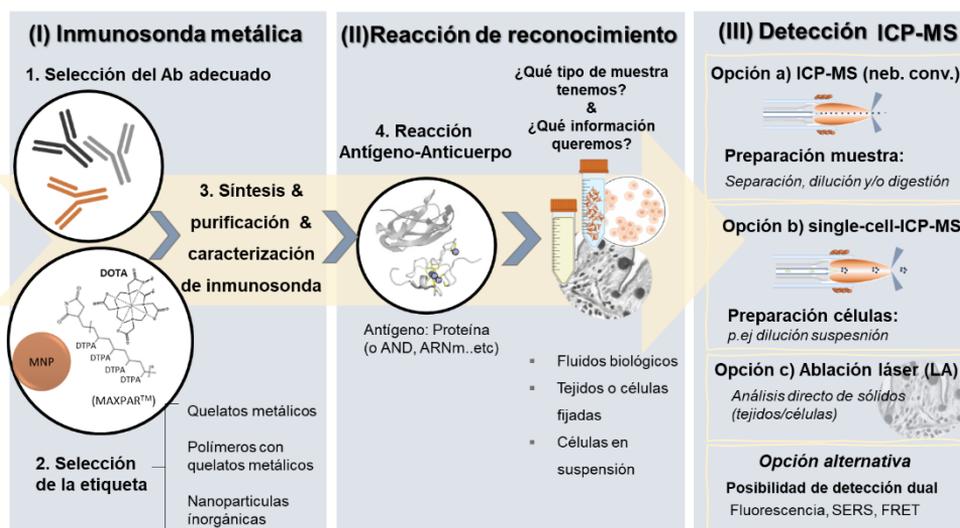


Figura 12: Esquema de las etapas de la estrategia analítica de marcaje a seguir con una inmunosonda para la determinación de biomoléculas por ICP-MS: (I) preparación de la inmunosonda metálica, (II) reacción de reconocimiento de la proteína, y (III) posibilidades de detección por ICP-MS.

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

En cuanto a las etiquetas metálicas para el desarrollo de las inmunosondas específicas para la detección de biomoléculas por ICP-MS, se ha propuesto una gran variedad de ellas desde el primer trabajo publicado en 2001 por Zhang et al. para la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero humano⁷¹. En este método, el analito fue capturado por el Ab anti-TSH inmovilizado en un soporte. A continuación, se añadieron el Ab anti-TSH biotinilado y la estreptavidina (SA) marcada con Eu^{3+} para formar el inmunocomplejo “[Ab de captura]-[TSH_{analito}]-[Ab biotinilado anti-TSH]-[Eu^{3+} -SA]”. Tras eliminar los reactivos no unidos, el Eu unido al inmunocomplejo se extrajo empleando ácido nítrico diluido y se midió por ICP-MS. En este trabajo, la señal de Eu^{3+} era proporcional a la concentración de la molécula TSH. Un aspecto importante a tener en cuenta en este tipo de análisis es que para llevar a cabo no solo la identificación de la biomolécula, sino también la

⁷¹ C. Zhang, F. Wu, Y. Zhang, X. Wang, X. Zhang, A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum, *J. Anal. At. Spectrom.* 16, (2001), 1393-1396.

determinación de la misma es necesario conocer la estequiometría de la inmunosonda (i.e., el número de marcas metálicas por molécula de Ab).

Las características que debe poseer una buena etiqueta metálica para ser usada en este tipo de aplicaciones con detección por ICP-MS están resumidas a continuación:

- En cuanto al **metal/elemento que compone la etiqueta** se puede hablar de dos aspectos:
 - a) teniendo en cuenta el tipo de muestras, la etiqueta debe ser un elemento que no esté presente en las muestras biológicas (i.e., se deben evitar elementos constituyentes como los minerales esenciales: Fe, Zn, Cu etc.), y
 - b) atendiendo a la técnica de detección, la etiqueta ha de cumplir los siguientes requisitos: (i) la eficiencia de ionización en ICP-MS del isótopo debería ser elevada, (ii) se deben evitar isótopos que presenten interferencias espectrales, y (iii) en cuanto a las abundancias isotópicas se puede elegir un elemento con un isótopo muy abundante para su monitorización con el objetivo de maximizar la sensibilidad de la detección o bien optar por la elección de un elemento que presente varios isótopos con la posibilidad de realizar detección múltiple.
- En cuanto a la **estructura de la etiqueta**, con el objetivo de conseguir una gran amplificación de la señal, lo ideal es optar por aquellas marcas que estén constituidas por varios átomos de un mismo metal a la vez que presenten un volumen reducido. Es decir, que la relación metal detectable:volumen de la etiqueta sea máxima. Este aspecto es crítico en la funcionalidad de la inmunosonda. Al unir la etiqueta metálica a la molécula de reconocimiento, cuando mayor sea el volumen de la etiqueta mayor impedimento estérico, lo que conlleva a una mayor posibilidad de bloqueo o impedimento en el sitio de unión el Ab, dificultando la detección de la biomolécula de interés (antígeno).

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

El empleo de lantánidos (Ln) como elementos detectables en ICP-MS, como emplearon Zhang et al.⁷¹, ha sido una estrategia muy recurrida ya que su uso está abalado por tres motivos principales. Por una parte, las muestras biológicas no presentan Ln en su matriz, por lo que los fondos de detección para los Ln son insignificantes en el ICP-MS. Además, las elevadas eficiencias de ionización de los Ln en ICP-MS⁷², así como la posibilidad que presentan para estudios de análisis múltiple (la serie de los Ln consta de 14 elementos estables con sus correspondientes isótopos) hacen de estos unos elementos ideales para su detección por MS. En este sentido, el marcaje de un determinado Ab con Ln se hace por medio de compuestos quelantes bifuncionales que son capaces de unirse a la biomolécula de reconocimiento⁷³. En cuanto al grupo quelante, éste puede ser un compuesto macrocíclico como el ácido 1,4,7,10-tetraazacyclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), los cuales forman complejos de inclusión muy estables con iones trivalentes de los Ln en un amplio rango de pH y de concentraciones salinas⁷⁴⁻⁷⁶. Sin embargo, estas estructuras sólo adoptan un átomo por complejo quelante, por lo que, con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la detección, se ha propuesto el uso de

⁷² T.C. de Bang, S. Husted, Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45-52.

⁷³ A. Tholey, D. Schaumloffel, Metal labeling for quantitative protein and proteome analysis using inductively coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 29, (2010), 399-408

⁷⁴G. Schwarz, L. Mueller, S. Becka, M.W. Linscheid, DOTA based metal labels for protein quantification: a review, *J. Anal. At. Spectrom.* 29, (2014), 221-233.

⁷⁵ N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatachalam, A. von Bohlen, P.H. Roos, A. Manz, Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 23, (2008), 1497-1507.

⁷⁶ C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83, (2011), 8177-8183.

microesferas de polímero que contienen varios Ln (2 mm de diámetro)⁷⁷. La alternativa más recurrida en la actualidad está basada en el uso de polímeros que contienen varias unidades de DOTA⁷⁸ o DTPA (estructuras recogidas en la **Figura 12**). En concreto, este último enfoque ha dado lugar a los reactivos comerciales de etiquetado denominados MAXPAR®, que se utilizan en múltiples aplicaciones por detección con ICP-MS. En concreto, con el auge de las técnicas de análisis cuasisimultáneo (citometría de masas, CyTOF™) y debido a la posibilidad de detección múltiple (disponibilidad de hasta 34 Ln diferentes y sus isótopos)⁷⁹.

A.3.2.2. Nanopartículas metálicas como etiquetas elementales

Con el desarrollo y últimos avances en el campo de la nanotecnología se ha impulsado enormemente el uso de partículas inorgánicas de tamaño nanométrico, nanopartículas (NPs), como etiquetas para la detección por ICP-MS. De hecho, paralelamente al uso del Ln como marca, en el año 2002 se publicaron varios trabajos utilizando NPs de oro (AuNPs)^{80,81}.

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

⁷⁷ A.I. Abdelrahman, S. Dai, S.C. Thickett, O. Ornatsky, D. Bandura, V. Baranov, M.A. Winnik, Lanthanide-containing polymer microspheres by multiphase dispersion polymerization for highly multiplexed bioassays, *J. Am. Chem. Soc.* 131, (2009), 15276-15283.

⁷⁸ X. Lou, G. Zhang, I. Herrera, R. Kinach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays, *Angew. Chem. Int.* 46, (2007), 6111-6114.

⁷⁹ D.R. Bandura, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J.E. Dick, S.D. Tanner, Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6813-6822.

⁸⁰ C. Zhang, Z. Zhang, B. Yu, J. Shi, X. Zhang, Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 74, (2002), 96-99.

⁸¹ V.I. Baranov, Z. Quinn, D.R. Bandura, S.D. Tanner, A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection, *Anal. Chem.* 74, (2002), 1629-1636.

Es importante mencionar que la sensibilidad conseguida por ICP-MS empleando NPs se verá afectada por las características de detección del metal seleccionado para la medida (p.ej., la eficiencia de ionización) y por el número de átomos de metal por etiqueta. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la unión de las NPs de manera incontrolada a un Ab puede producir efectos negativos en el comportamiento fisicoquímico de dicho Ab en comparación con etiquetas más pequeñas como son los quelatos metálicos simples. Entre las posibles limitaciones que presenta el empleo de las NPs cabe mencionar la posible disminución de la eficacia del Ab como biomolécula de reconocimiento debido al bloqueo de los sitios de reconocimiento o a restricciones de accesibilidad a la biomolécula diana (particularmente críticas en el caso de los tejidos biológicos)⁸². Por tanto, en la selección de la marca se debe llegar a un compromiso entre poder de amplificación y funcionalidad de la inmunosonda metálica.

Tal y como se adelanta en el esquema de la **Figura 12**, una de las etapas clave en estas estrategias, a la vez que un gran reto, es la determinación exacta y precisa de la composición elemental de las NPs así como la determinación de la relación NPs:Ab o el factor de amplificación (i.e., estequiometría de la inmunosonda: número de átomos de metal por molécula de Ab disponible). De esta manera, tras la síntesis de las NPs y de la inmunosonda (NPs:Ab) se requiere una correcta caracterización de la misma para la determinación exacta y precisa de la concentración de la biomolécula de interés por ICP-MS. Además, una etapa clave es también la purificación correcta de las inmunosondas. Debido a la importancia que presentan estas etapas en el desarrollo de metodologías analíticas de cuantificación de biomoléculas por ICP-MS, a continuación, se describen las técnicas analíticas más comúnmente empleadas. Además, se describen diferentes aproximaciones de bioconjugación para realizar la síntesis de inmunosondas metálicas.

⁸² M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411, (2019), 549-558.

A.3.2.3. Estrategias de purificación y caracterización de NPs

Las NPs sintetizadas en el laboratorio (y, en muchos casos, las NPs comerciales) deben ser purificadas para eliminar los restos de otros reactivos que podrían interferir en sus futuras aplicaciones. Para ello, se puede utilizar la centrifugación, la ultrafiltración o la diálisis como técnicas de purificación más habitualmente empleadas. Además, para ciertas aplicaciones es conveniente aislar las NPs monodispersas de las NPs polidispersas. Para dicho aislamiento, son otro tipo de técnicas de separación más potentes, como la cromatografía^{83,84}, la electroforesis⁸⁵ y el fraccionamiento asimétrico por flujo de campo (*asymmetric flow field flow fractionation*, AF4)^{84,86} las estrategias más recurridas.

En cuanto a la caracterización de las NPs, ésta puede realizarse en función de varios parámetros, como son el tamaño medio, distribución de tamaños, estado de agregación/aglomeración, forma, estructura cristalina, estabilidad, solubilidad, composición química, grupos funcionales, número de átomos por NP, concentración, etc. Para llevar a cabo estas caracterizaciones se emplean técnicas de dispersión (p.ej., dispersión de luz dinámica - DLS, potencial zeta, y difracción de rayos X), microscopía electrónica, técnicas espectroscópicas (p.ej., absorbancia, y luminiscencia), análisis térmico y MS (p.ej., ICP-MS, o electrospray-MS)⁸⁷. Cabe destacar además que los recientes avances instrumentales y los nuevos métodos desarrollados en la técnica de partícula única (*single particle, sp*) ICP-MS permiten la medición fiable del

⁸³ L. Pitkanen, A.R.M. Bustos, K.E. Murphy, M.R. Winchester, A.M. Striegel, Quantitative characterization of gold nanoparticles by size-exclusion and hydrodynamic chromatography, coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC/ICP-MS and HDC/ICP-MS) and quasi-elastic light scattering (HDC/QELS), *J. Chromatogr. A* 1511 (2017) 59-67.

⁸⁴ E.P. Gray, T.P. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532-1539.

⁸⁵ N. Surugau, P.L. Urban, Electrophoretic methods for separation of nanoparticles, *J. Separ. Sci.* 32, (2009), 1889-1906.

⁸⁶ M. Menendez-Miranda, M.T. Fernandez-Arguelles, J.M. Costa-Fernandez, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, Elemental ratios for characterization of quantum-dots populations in complex mixtures by asymmetrical flow field flow fractionation online coupled to fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 839, (2014), 8-13.

⁸⁷ K.E. Sapsford, K.M. Tyner, B.J. Dair, J.R. Deschamps, I.L. Medintz, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4453-4488.

tamaño y la distribución del tamaño de las NPs en suspensión, así como la concentración de NPs^{88,89}. La intensidad de la señal es función del tamaño de la NP y el número de los eventos (o *spikes*) está correlacionada con el número de partículas. Además, el acoplamiento en línea de técnicas de separación al *sp*-ICP-MS, como la electroforesis capilar o el AF4, permite distinguir las NPs por su forma o caracterizar NPs con diferentes recubrimientos⁹⁰.

A.3.2.4. Estrategias de bioconjugación de NPs

La unión no covalente es una forma sencilla de etiquetar biomoléculas con NPs, ya que éstas se pueden unir electrostáticamente, a través de interacciones hidrofóbicas, o por afinidad de unión específica como las interacciones "avidina-biotina" y "SA-biotina"⁹¹. Alternativamente, las principales estrategias de bioconjugación incluyen la unión directa de una biomolécula tiolada a la superficie de las NPs (normalmente de Au)⁹² o a través de reactivos intermedios como el enlace entre una amina y un ácido carboxílico (reacción de la carbodiimida)⁹³. Por otro lado, la reacción de bioconjugación puede realizarse empleando la reacción de la maleimida para conjugar aminas primarias con grupos tiol⁹⁴ y la química Click⁹⁵ (**Figura 13**).

⁸⁸ M.D. Montano, J.W. Olesik, A.G. Barber, K. Challis, J.F. Ranville, Single particle ICP-MS: advances toward routine analysis of nanomaterials, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5053-5074.

⁸⁹ F. Laborda, E. Bolea, J. Jimenez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2013) 2270-2278.

⁹⁰ K.A. Huynh, E. Siska, E. Heithmar, S. Tadjiki, S.A. Pergantis, Detection and quantification of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations using asymmetric flow field-flow fractionation online with single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4909-4916.

⁹¹ Q. He, Z. Zhu, L. Jin, L. Peng, W. Guo, S. Hua, Detection of HIV-1 p24 antigen using streptavidin-biotin and gold nanoparticles-based immunoassay by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1477-1482.

⁹² J.R. Reimers, M.J. Ford, A. Halder, J. Ulstrup, N.S. Hush, Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)ethyl species and are destroyed when Au(I)ethiolates form, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 113 (2016), 1424-1433.

⁹³ F. Song, W.C.W. Chan, Principles of conjugating quantum dots to proteins via carbodiimide chemistry, *Nanotechnology* 22 (2011) 494006.

⁹⁴ J. Pichaandi, G. Zhao, A. Bouzekri, E. Lu, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Lanthanide nanoparticles for high sensitivity multiparameter single cell analysis, *Chem. Sci.* 10 (2019) 2965-2974.

⁹⁵ N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today* 5 (2010), 213-230.

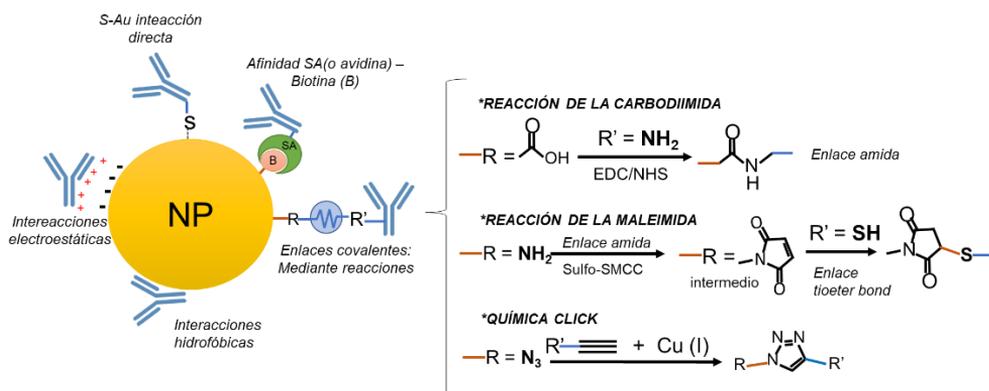


Figura 13: Resumen de las diferentes aproximaciones de etiquetado de un anticuerpo con una nanopartícula metálica.

Para la síntesis de las inmunosondas marcadas es importante elegir la estrategia de bioconjugación adecuada para unir las moléculas de reconocimiento a las NPs. Aunque las biomoléculas se adsorben espontáneamente a la superficie de las NPs debido a las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, esta estrategia presenta varias limitaciones como la necesidad de una alta concentración de la molécula de reconocimiento, la orientación aleatoria, la fuerza de la unión inestable en función del pH y la fuerza iónica, y la debilidad de la interacción que puede provocar sustitución por otras moléculas⁹⁶. El sistema avidina-biotina y las estrategias covalentes mediante reacciones intermedias (p.ej., las estrategias maleimida o carbodiimida) permiten resolver los inconvenientes anteriormente citados. Sin embargo, en algunos casos una incorrecta bioconjugación de las sondas de reconocimiento en la superficie de la NPs (debido a la incapacidad de controlar la orientación de la biomolécula en la superficie de la NP) puede ser una desventaja,⁹⁷ ya que la orientación de la unión maximiza la disponibilidad funcional de la sonda de reconocimiento⁹⁸. En este con-

⁹⁶ M.H. Jazayeri, H. Amani, A.A. Pourfatollah, H. Pazoki-Toroudi, nB. Sedighimoghaddam, Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies, *Sens. Bio-Sens. Res.* 9 (2016) 17-22.

⁹⁷ M.K. Greene, D.A. Richards, J.C.F. Nogueira, K. Campbell, P. Smyth, M. Fernandez, J.S. Christopher, V. Chudasama, Forming next generation antibody-nanoparticle conjugates through the oriented installation of non-engineered antibody fragments, *Chem. Sci.* 9 (2018) 79-87.

⁹⁸ S. Kumar, J. Aaron, K. Sokolov, Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 314-320.

texto, la estrategia de química de Click (generalmente basada en una reacción de cicloadición [3 + 2] entre un alquino terminal y un azida utilizando Cu (I) como catalizador) está siendo bastante empleada en los últimos años ya que permite un mayor control sobre la orientación de la unión^{97,99}.

A.3.2.5. Caracterización de la inmunosonda metálica

Las biomoléculas marcadas que se van a emplear como sondas de detección deben aislarse del exceso de reactivos y subproductos, y deben caracterizarse adecuadamente antes de su uso posterior. El aislamiento de los productos del exceso de reactivos puede llevarse a cabo mediante técnicas de separación similares a las empleadas para la purificación de las NPs, como son la ultrafiltración, electroforesis, cromatografía, AF4, etc.⁸⁷. Por otro lado, la eficacia o rendimiento de la reacción puede calcularse midiendo las concentraciones de metal en las fracciones separadas/aisladas (i.e., las NPs libres y las NPs bioconjugadas) utilizando ICP-MS.

Además, para llevar a cabo una caracterización completa de la inmunosonda y conocer su factor de amplificación, se debe conocer: la estequiometría de la inmunosonda (número de NPs por inmunosonda), la actividad de la biomolécula de reconocimiento tras la unión de las NPs, y la estabilidad con el tiempo de la sonda marcada a lo largo de la aplicación prevista. La separación de las inmunosondas marcadas con diferentes estequiometrías puede resultar compleja¹⁰⁰ y, por ello, de cara a su aplicación se suele emplear el valor promedio de la relación estequiométrica NPs:Ab. Dicha relación puede estimarse determinando las concentraciones molares de Ab y NPs en la sonda etiquetada una vez purificada. Para ello, los ensayos ELISA cuantitativos (en

⁹⁹ Y. He, D. Esteban-Fernandez, M.W. Linscheid, Novel approach for labeling of biopolymers with DOTA complexes using in situ click chemistry for quantification, *Talanta* 134 (2015) 468-475.

¹⁰⁰ D. Bouzas-Ramos, J.I. García-Alonso, J.M. Costa-Fernandez, J.R. Encinar, Quantitative assessment of individual populations present in nanoparticle-antibody conjugate mixtures using AF4-ICP-MS/MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 3567-4574.

el caso de antígenos o anticuerpos unidos al bioconjugado) se emplean para determinar la concentración de biomoléculas disponibles en la inmunosonda marcada para su posterior reacción con el analito¹⁰¹.

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

Las NPs más usadas en combinación con ICP-MS para determinación de biomoléculas han sido sin duda las NPs metálicas (MNPs) y en especial las de oro (AuNPs). En este contexto, las AuNPs se han bioconjugado a diferentes anticuerpos para la determinación de antígenos considerados en muchos de los casos biomarcadores de enfermedades, utilizando para ello como muestra diferentes fluidos biológicos. La detección de estos biomarcadores se presenta en muchos casos como un reto, puesto que sus concentraciones en las muestras biológicas suelen ser bajas. Por ello, el empleo de NPs como etiquetas se presenta como una alternativa ventajosa para lograr una amplificación significativa de la señal y, por lo tanto, conseguir una detección sensible. Por ejemplo, las AuNPs se han empleado con éxito para la cuantificación de biomarcadores tumorales (p.ej., PSA¹⁰², CA19-9¹⁰³, CEA¹⁰⁴ y AFP¹⁰⁵),

¹⁰¹ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. Gonzalez-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145e12151.

¹⁰² J.M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science* 301 (2003) 1884.

¹⁰³ J. Ko, H.B. Lim, Multicore magnetic nanoparticles (MMNPs) doped with Cs and FITC for the determination of biomarker in serum using ICP-MS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4140-4144.

¹⁰⁴ X. Zhang, B. Chen, M. He, Y. Zhang, G. Xiao, B. Hu, Magnetic immunoassay coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for simultaneous quantification of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum, *Spectrochim. Acta B* 106 (2015) 20-27.

¹⁰⁵ X. Li, B. Chen, M. He, G. Xiao, B. Hu, Gold nanoparticle labelling with tyramide signal amplification for highly sensitive detection of alpha fetoprotein in human serum by ICP-MS, *Talanta* 176 (2018) 40-46

bacterias (p.ej., *E. coli*¹⁰⁶ o *salmonella*¹⁰⁷), virus y viriones (p.ej., viriones de la gripe aviar A (H9N2)¹⁰⁸), y toxinas (p.ej., aflatoxina M1¹⁰⁹).

El uso de otro tipo de NPs inorgánicas como etiquetas de un Ab ha sido también investigado en los últimos años y se pueden encontrar aplicaciones empleando QDs, NPs de conversión ascendente (UCNPs)¹¹⁰ o NPs de sílice dopadas con metales (SNPs)¹¹¹. Algunas de estas NPs, como los QDs, permiten la posibilidad de llevar a cabo una detección dual de las biomoléculas objetivo empleando fluorescencia y MS¹¹². Por ejemplo, Chem et al. mostraron una aplicación donde CdSe@ZnS QDs se emplearon para la detección de IgG en suero, monitorizando el Cd¹¹³ por ICP-MS, y para detectar la hormona progesterona en leche de vaca, en este caso de manera dual (ICP-MS, monitorizando Cd y detectando también la fluorescencia)¹¹³. Otra aplicación empleando QDs como etiquetas bimodales se puede ver en el trabajo de García-Cortes et al. donde se realiza la determinación de PSA en suero humano por medio de Mn-dopado-ZnS QDs (detección por ICP-MS y fosforescencia)¹¹⁴. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el empleo de marcas no puras, como es el caso

¹⁰⁶ F. Li, Q. Zhao, C. Wang, X. Lu, X.-F. Li, X.C. Le, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle labelling and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3399-3403.

¹⁰⁷ Y. Lin, A.T. Hamme II, Gold nanoparticle labeling based ICP-MS detection/measurement of bacteria, and their quantitative photothermal destruction, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3573-3582.

¹⁰⁸ X. Zhang, G. Xiao, B. Chen, M. He, B. Hu, Lectin affinity based elemental labelling with hybridization chain reaction for the sensitive determination of avian influenza A (H9N2) virions, *Talanta* 188 (2018) 442-447.

¹⁰⁹ E. Perez, P. Martínez-Peinado, F. Marco, L. Gras, J.M. Sempere, J. Mora, G. Grindlay, Determination of aflatoxin M1 in milk samples by means of an inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassay, *Food Chem.* 230 (2017) 721-727.

¹¹⁰ B. Yang, Y. Zhang, B. Chen, M. He, X. Yin, H. Wang, X. Li, B. Hu, A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells, *Biosens. Bioelectron* 96 (2017) 77-83.

¹¹¹ X. Yin, B. Chen, M. He, B. Hu, Simultaneous determination of two phosphorylated p53 proteins in SCC-7 cells by an ICP-MS immunoassay using apoferritin-templated europium(III) and lutetium(III) phosphate nanoparticles as labels, *Microchim. Acta* 185 (2019) 424.

¹¹² A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella Alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Elemental and molecular detection for quantum dots-based immunoassays: a critical appraisal, *Biosens. Bioelectron* 33 (2012) 165-171.

¹¹³ B. Chen, H. Peng, F. Zheng, B. Hu, M. He, W. Zhao, D. Pang, Immunoaffinity monolithic capillary microextraction coupled with ICP-MS for immunoassay with quantum dot labels, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 1674-1681.

¹¹⁴ M. García-Cortes, J.R. Encinar, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Highly sensitive nanoparticle-based immunoassays with elemental detection: application to prostate-specific antigen quantification, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 128-134.

de los QDs (constituidos por más de un elemento medible por MS), disminuye el número de átomos detectables por marca lo que conlleva a una disminución en la amplificación.

Dentro de este contexto, hay un tipo de NPs que se presentan como excelentes candidatos para ser empleados como etiquetas en inmunosondas. Los nanoclústeres metálicos (MNCs), un tipo concreto de NPs metálicas (< 3 nm), poseen unas extraordinarias propiedades ópticas (fluorescencia), actividad electroquímica, y son marcas puras (i.e., están compuestos por único elemento). Esto implica no sólo obtener una buena amplificación de la señal (si se comparan con marcas no puras), sino también la posibilidad de realizar una detección multimodal (p.ej., MS, fluorescencia y técnicas electroquímicas). Debido a la importancia que este tipo de marcas ha cobrado en los últimos años, a continuación, se explica con un poco más en detalle el empleo de los MNCs: su síntesis, características y propiedades y, finalmente, se recogen algunos ejemplos representativos de aplicaciones en el campo biomédico.

A.3.2.7. Los Nanoclústeres metálicos

Los nanoclústeres metálicos (MNCs) son un tipo de NP caracterizada por su pequeño tamaño (0,2 a 3 nm), el cual le confiere propiedades únicas distintas de las NPs de mayor tamaño y por supuesto del metal en estado macroscópico. Típicamente, su núcleo metálico está compuesto desde unos pocos átomos hasta las pocas centenas de un metal¹¹⁵. Los MNCs son, por definición, un tipo de NP metálica que, cuando su tamaño comienza a ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón, la estructura en bandas se divide en niveles discretos de energía (**Figura 14**) debido a que en ese momento tanto el tamaño del MNC como el número de átomos comienza a ser limitado (se produce un confinamiento cuántico).

¹¹⁵ L. Zhang, E. Wang, Metal nanoclusters: new fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* 9 (2014), 132–157

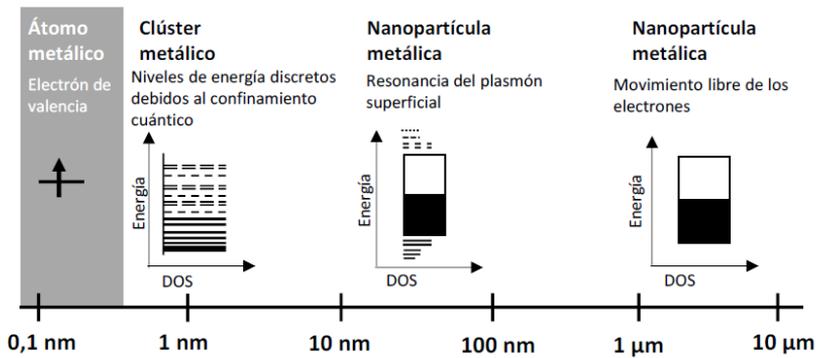


Figura 14: Esquema de las bandas de energía típicas en NPs metálicas y NCs, donde se observa como al reducir su tamaño se produce la creación de los niveles de energía discretos.

Por tanto, las propiedades y características más conocidas de los metales en su tamaño macroscópico (p.ej. conductividad debida a los electrones deslocalizados los cuales presentan un movimiento libre), desaparecen con la disminución del tamaño de la partícula metálica. Tal y como se observa en la **Figura 14**, existen dos niveles diferenciados y caracterizados por las propiedades ópticas de las nanoestructuras resultantes. Por un lado, las NPs más grandes (10-100 nm) presentan propiedades ópticas dominadas por la oscilación colectiva de los electrones deslocalizados de la superficie, (al interactuar con un campo electromagnético), dando lugar al fenómeno de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). De esta manera, estas NPs se caracterizan por absorber fuertemente la luz y no presentar luminiscencia¹¹⁶. En cuanto a los NCs, se ha visto que presentan niveles de energía electrónica discretos y esto provoca el confinamiento cuántico de los electrones, por lo que la banda de plasmón superficial desaparece (no hay electrones libres) observándose la aparición de una emisión fluorescente. Además, como consecuencia a este confinamiento cuántico, los NCs dejan de ser conductores. Es decir, los NCs se alejan de su homólogo macroscópico acercándose a las características moleculares.

□ Propiedades de los MNCs

¹¹⁶ X. Jiang, B. Du, Y. Huang, J. Zheng. Ultrasmall noble metal nanoparticles: Breakthroughs and biomedical implications. *Nano Today*, 21, (2018) 106-125.

Como se ha indicado, la emisión fluorescente es la propiedad más destacable de los MNCs. Esta está influenciada por varios parámetros, como la naturaleza del metal, el tamaño de la nanoestructura¹¹⁷, la estructura cristalina, el estado de oxidación, el tipo de ligando, y las condiciones del medio en el que se encuentra (p.ej., el disolvente, temperatura, pH, y fuerza iónica). Por otra parte, este tipo de nanomateriales presenta ausencia en la intermitencia en la emisión (*blinking*), absorción de dos fotones, buenos rendimientos cuánticos de la fluorescencia (hasta de un 20%), largos desplazamientos de Stokes, una relación superficie-volumen elevada, y propiedades catalíticas¹¹⁸.

Debido especialmente a sus propiedades ópticas, los MNCs han sido etiquetas muy recurridas en múltiples aplicaciones bioanalíticas¹¹⁹. Sin embargo, el mecanismo por el cual los MNCs poseen luminiscencia es todavía objeto de debate. Se cree que la fluorescencia se produce por combinación de varios factores. Por una parte, la ya comentada reducción del tamaño del nanomaterial que provoca la formación de niveles de energía discretos que hace que cuando los NCs interactúan con la radiación electromagnética se producen diferentes transiciones electrónicas intra- e interbanda, produciendo así la aparición de espectros de emisión. Aunque también se ha propuesto que la emisión se puede producir por fenómenos de transferencia de energía ligando-metal e interacciones metal-metal. De este modo, la longitud de onda de emisión fluorescente depende fuertemente tanto del propio núcleo metálico y su tamaño¹²⁰ (por efectos intrínsecos de la cuantización) como de la superficie de la partícula (interacciones metal-ligando)¹²¹. Otros estudios abalan que el ligando o las moléculas estabilizadoras empleadas para generar los MNCs afectan notablemente a las

¹¹⁷ V. Biju. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43, (2014), 744-764

¹¹⁸ H.C. Chang, Y.F. Chang, N.C. Fan, J.A.A. Ho, Facile preparation of high-quantum-yield gold nanoclusters: application to probing mercuric ions and biothiols. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6, (2014), 18824-18831.

¹¹⁹ L.B. Zhang, E.K. Wang, Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today*, 9, (2014), 132-157.

¹²⁰ V. Biju, Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chemical Society Reviews*, 43, (2014), 744-764.

¹²¹ Y. Lu, W. Chen. Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chemical Society Reviews*, 41, (2012), 3594-3623.

propiedades fluorescentes¹²². En particular, se pueden obtener AuNCs y AgNCs con longitudes de onda de emisión fluorescente diferentes atendiendo al ligando protector utilizado durante su síntesis.

□ Rutas de síntesis de MNCs

Los métodos existentes se basan en la reducción del ion metálico (precursor del metal nuclear) en presencia de un agente estabilizante (ligando o plantilla). El uso del agente de estabilización es crucial para proteger la nanoestructura metálica frente al medio, así como evitar el aumento de su tamaño. Además, como se ha visto en el apartado anterior, la naturaleza de los ligandos utilizados para cubrir la superficie de la partícula puede afectar notablemente a sus propiedades de emisión. Por lo tanto, la elección de agentes adecuados capaces de estabilizar el núcleo para evitar la agregación de los NCs y, de esta manera mejorar su fluorescencia, es de vital importancia para obtener MNCs altamente fluorescentes. Dentro de los tipos de agentes estabilizantes se puede distinguir entre aquellos que ejercen como plantillas y los que ejercen a modo de ligandos protectores (**Figura 15**). En el caso de la síntesis asistida por plantilla se usan moléculas en cuyo interior crecen los MNCs. Las moléculas específicas para este tipo de síntesis suelen ser oligonucleótidos de ADN¹²³, proteínas¹²⁴, estructuras tipo dendrímeros como el PAMAM¹²⁵, o polímeros¹²⁶. Sin embargo, este tipo de estrategias incrementan notablemente el volumen hidrodinámico final de la nanoestructura, por lo que su empleo se ve limitado a unas pocas aplicaciones). Estas

¹²² C.A.J. Lin, C.H. Lee, J.T. Hsieh, H.H. Wang, J.K. Li, J.L. Shen, W.H. Chang. Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: recent progress and present challenges. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 29, (2009), 276-283.

¹²³ B. Han, E. Wang, E. DNA-templated fluorescent silver nanoclusters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, (2012), 129-138.

¹²⁴ N. El-Sayed, M.Schneider. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of protein-stabilized gold nanoclusters *J. Mater. Chem. B*, (2020),8, 8952-8971.

¹²⁵ Y. C. Jao, M.K. Chen, S.Y. Lin, Enhanced quantum yield of dendrimer-entrapped gold nanodots by a specific ion-pair association and microwave irradiation for bioimaging. *Chemical Communications*, 46, (2010), 2626-2628.

¹²⁶ B. Santiago-Gonzalez, M.J. Rodriguez, C. Blanco, J. Rivas, M.A. López-Quintela, J.M.G. Martinho. One step synthesis of the smallest photoluminescent and paramagnetic PVP-protected gold atomic clusters. *Nano Letters*, 10, (2010), 4217-4221

estructuras debido al impedimento estérico podrían bloquear e impedir el reconocimiento eficiente del antígeno (p.ej., en el marcaje de moléculas pequeñas).

Por otra parte, se pueden emplear ligandos protectores, los cuales normalmente contienen un grupo tiol (-S). Al ser moléculas de pequeño tamaño, no presentan las limitaciones de las plantillas poliméricas anteriormente citadas. En este caso se produce una fuerte interacción entre los grupos tiol y el metal de la superficie de la nanoestructura sintetizada¹²⁷. Los ligandos tiolados más comúnmente empleados son el ácido lipoico (o DHLA que es su forma reducida)¹³¹ o el glutatión (GSH). Los MNCs sintetizados con este tipo de ligandos suelen ser estables con un radio hidrodinámico pequeño. Además, cabe destacar la bifuncionalidad de estos ligandos, que al poseer grupos reactivos en sus extremos permiten la fácil funcionalización de la nanoestructura mediante reacciones covalentes (p.ej., reacción de la carbodiimida para su bioconjugación a un Ab).

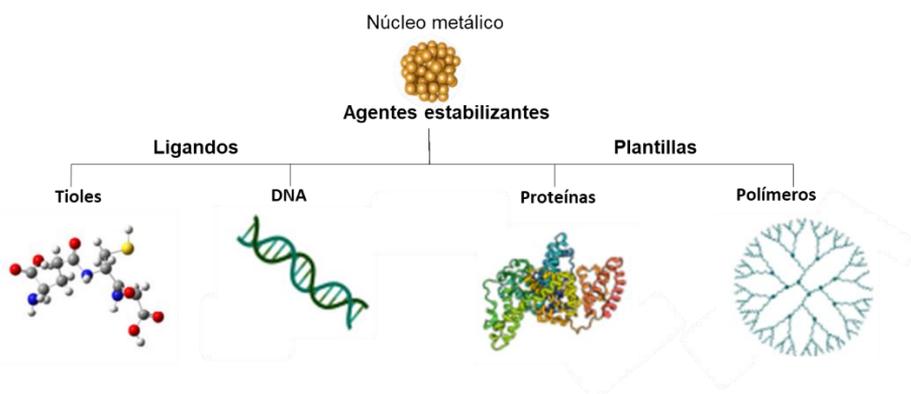


Figura 15: Tipos de moléculas empleadas como agentes estabilizantes en la síntesis de MNCs.

De manera general, la síntesis de MNCs y por tanto la reducción del metal, se puede realizar atendiendo a dos aproximaciones (**Figura 16**): *bottom up* y *top-down*. En el primer caso se parte de átomo a átomo para construir la nanoestructura deseada, mientras que en el caso de las síntesis *top-down*, lo que se hace es partir de NPs más

¹²⁷ L. Shang, N. Azadfar, F. Stockmar, W. Send, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G.U. Nienhaus, One-Pot Synthesis of Near-Infrared Fluorescent Gold Clusters for Cellular Fluorescence Lifetime Imaging. *Small*, 7, (2011), 2614-2620.

grandes a las que se le modula su tamaño empleando un exceso de ligandos (*chemical-etching*). En la **Figura 16**, se recogen las estrategias más comunes de síntesis de MNCs. Se pueden observar desde las más novedosas basadas en la química verde (empleo de algas, bacterias, etc.), hasta las estrategias más usadas como son las de reducción química. En este caso, la síntesis de MNCs proporciona un tipo de MNCs muy estable y que presentan alta luminiscencia (comparado con el resto de los métodos de síntesis para un mismo metal), siendo el reductor más común el borohidruro de sodio¹²⁸.



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

□ Aplicaciones de los MNCs

Los MNCs se presentan actualmente como una excelente alternativa al empleo de los fluoróforos convencionales (particularmente, a las moléculas orgánicas luminiscentes) en varios campos de la bioanalítica. Por ejemplo, los MNCs se pueden emplear para la detección de metales pesados (p.ej., Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , y Cu^{2+}) actuando como sensores químicos ópticos. La estrategia se basa en la desactivación de la fluorescencia de los MNCs cuando los iones metálicos interactúan con la superficie del MNCs. Este tipo de estudios se muestra en el trabajo de Bian et al.¹²⁹ para el

¹²⁸ H. Li, Y. Guo, L. Xiao, B. Chen, Selective and sensitive detection of acetylcholinesterase activity using denatured protein-protected gold nanoclusters as a label-free probe. *Analyst*, 139, (2014), 285-289.

¹²⁹ R.X. Bian, X.T. Wu, F. Chai, L. Li, L.Y. Zhang, T.T. Wang, C.C. Wang, M.S. Zhong, Z.M. Su, Z.M. Facile preparation of fluorescent Au nanoclusters-based test papers for recyclable detection of Hg^{2+} and Pb^{2+} . *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241 (2017) 592-600.

desarrollo de un sensor selectivo de Hg^{2+} basado en la desactivación de la fluorescencia de CuNCs (λ_{em} , 455 nm) a concentraciones crecientes del ion.

Otro campo en el que se pueden emplear los MNCs fluorescentes es como marcas en fluoroinmunoensayos (apartado A.2.2.2). Desde la primera aplicación en el año 2006 donde los AuNCs se emplearon en un inmunoensayo para la determinación de IgG humana¹³⁰, numerosas publicaciones han empleado diferentes MNCs con éxito. Por ejemplo, en el trabajo de Valencia et al.¹³¹ se describe una metodología para la cuantificación de CFH en suero humano empleando AgNCs como marcas fluorescentes en un inmunoensayo competitivo en placa.

Sin embargo, cabe destacar que el gran auge de los MNCs radica en parte en su uso como marcas fluorescentes y altamente biocompatibles para llevar a cabo estudios de *imaging* molecular. De hecho, gracias a sus atractivas características ópticas los MNCs se presentan como una alternativa a los fluoróforos convencionales (colorantes orgánicos o proteínas fluorescentes), los cuales poseen una fotoestabilidad reducida que provoca la pérdida de la señal luminiscente en experimentos a largo plazo. Como ejemplo de este tipo de aplicaciones, cabe mencionar el uso de CuNCs estabilizados con BSA para el *imaging* de células CAL-27 con el objetivo de evaluar la internalización celular, así como la distribución intracelular de los CuNCs¹³². Otra aproximación interesante de *imaging* celular es el presentado por Tanaka et al.¹³³ en el que se emplean PtNCs para detectar células tumorales. En dicho trabajo se muestra que es posible detectar específicamente los receptores CXCR4, sobreexpresados en células tumorales Hela, siguiendo la emisión fluorescente. Cruz-Alonso et al. emplearon AuNCs estabilizados con ligandos tiolados (ácido lipoico) para obtener la

¹³⁰ Triulzi, R.C., Micic, M., Giordani, S., Serry, M., Chiou, W.A, Leblanc, R.M. (2006). Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex. *Chemical Communications*, 48, 5068-5070.

¹³¹ E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim. Acta* 186 (2019) 429.

¹³² C. Wang, L. Xu, H. Cheng, Q. Lin, C. Zhang, Protein-directed synthesis of pH-responsive red fluorescent copper nanoclusters and their applications in cellular imaging and catalysis. *Nanoscale*, 6, (2014), 1775-1781

¹³³ S.I. Tanaka, J. Miyazaki, D.K. Tiwari, T. Jin, Y. Inouye, Fluorescent Platinum Nanoclusters: Synthesis, Purification, Characterization, and Application to Bioimaging *Angew. Chem.* 49, (2010), 1–6.

distribución espacial de metalotioneína-1/2 en tejidos de retina humana¹³⁴. Paralelamente, también se han empleado los MNCs en aplicaciones de imaging *in vivo*. En estos casos, las emisiones de los MNCs empleados deben ser cercanas a la región del infrarrojo cercano (NIR), para evitar así el daño en las muestras biológicas y reducir posibles interferencias debido a autofluorescencia. Un ejemplo de este tipo de aplicación fue presentado por Liu et al.¹³⁵ con la síntesis de dos AuNCs con dos recubrimientos diferentes (con PEG y GSH) para emplearlos con el fin de evaluar su especificidad a tumores y para ellos se utilizaron ratones portadores de tumores MCF-7 como sistema modelo y se midió la biodistribución de las AuNP@PEG y AuNCs@GSH en los ratones a diferentes de tiempos de incubación mediante.

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

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

Para la determinación de biomoléculas empleando las metodologías convencionales en muestras celulares provenientes de un tejido o cultivo celular, las muestras deben ser previamente lisadas o digeridas y el analito de interés (p.ej., una proteína) es cuantificado en el lisado o digerido resultante tras el tratamiento de la muestra. La concentración de analito obtenida se puede normalizar al contenido celular de partida empleando parámetros como el número de células, el peso seco o la concentración proteica total, determinados todos ellos previamente tal y como se esquematiza en la **Figura 17**. Sin embargo, este tipo de aproximaciones proporciona información del

¹³⁴ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Peireiro, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags, *Microchim. Acta* 185 (2018) 64.

¹³⁵ J. Liu, M. Yu, X. Ning, C. Zhou, S. Yang, J. Zheng, PEGylation and zwitterionization: pros and cons in the renal clearance and tumor targeting of near-IR-emitting gold nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 125, (2013), 12804-12808.

contenido promedio del analito en la muestra, asumiendo el comportamiento homogéneo de todas las células de la población celular. Sin embargo, el comportamiento conjunto de la población celular no siempre es representativo del comportamiento de las células individuales que componen dicha población, de hecho, tal y como se ejemplifica en la **Figura 17** para la suspensión celular de células individuales intactas, existe una elevada variabilidad célula a célula (en el ejemplo se observa como la concentración del analito por célula, expresado en fg, varía dentro de la misma población celular entre los 20 y los 220 fg/célula)^{136,137}.

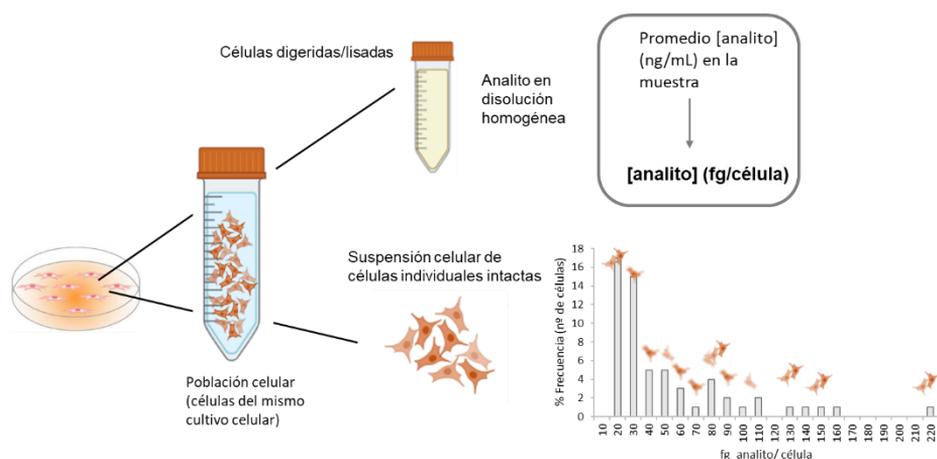


Figura 17: Esquema de los dos tipos de estrategias que se pueden realizar para determinar el contenido total de un analito en un cultivo celular empleando ICP-MS. En la parte superior se indica el procedimiento a seguir para conocer el contenido total promedio del analito en la población celular, mientras que en la parte inferior se muestra el tipo de información que se obtiene para cada célula individual.

A.4.1.1. El punto de partida para el análisis de cultivos celulares: la heterogeneidad celular

La heterogeneidad celular es una característica fundamental y bien conocida que implica variabilidad en la composición o morfología entre las distintas células

¹³⁶ A. Gough, A.M. Stern, J. Maier, T. Lezon, T.Y. Shun, C. Chennubhotla, M.E. Schurdak, S.A. Hancy, D. Lansing Taylor, Biologically relevant heterogeneity: Metrics and practical insights, *SLAS Discov.* 22, (2017), 213–237.

¹³⁷ S.J. Altschuler, L.F. Wu, Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference?, *Cell.* 141, (2010), 559–563.

que forman parte una determinada población celular^{136,138}. Es decir, dentro de una misma población siempre están presentes variaciones célula a célula, que se manifiestan a diferentes niveles (p.ej., genómico, epigenómico, transcriptómico o proteómico, entre otros)¹³⁷. Estas diferencias pueden tener origen genético y/o epigenético, o pueden producirse debido a estímulos internos o externos¹³⁹. Por tanto, células con el mismo genoma y sometidas a los mismos estímulos pueden presentar diferencias significativas en cuanto a su composición elemental y/o molecular. Este hecho es crítico cuando se intentan estudiar procesos biológicos, o más concretamente el contenido de una biomolécula implicada en un proceso biológico, como posible biomarcador de una enfermedad¹⁴⁰.

Por ello, en la actualidad existe un gran interés en el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación de elementos y biomoléculas (p.ej. proteínas) a nivel de células individuales para generar información más valiosa y realista¹⁴¹. Sin embargo, pese al interés actual por el análisis de células individuales, existen aún pocas metodologías que reúnan las características analíticas adecuadas para llevar a cabo este tipo de análisis con exactitud y precisión. Este hecho puede atribuirse principalmente a la necesidad de un proceso adecuado de preparación de la muestra que permita la individualización de las células en el momento de la medida, y a la poca cantidad de analito presente en una única célula (dado su pequeño tamaño y volumen). Además, las células se encuentran en una matriz muy compleja, por lo que se necesitan técnicas que ofrezcan una elevada sensibilidad y selectividad¹⁴².

A.4.1.2. Características generales de la técnica de sc-ICP-MS

¹³⁸ M.A. Walling, J.R.E. Shepard, Cellular heterogeneity and live cell arrays, *Chem. Soc. Rev.* 40, (2011), 4049–4076.

¹³⁹ M. Guo, Y. Peng, A. Gao, C. Du, J.G. Herman, Epigenetic heterogeneity in cancer, *Biomark. Res.* 7 (2019) 23.

¹⁴⁰ K. Cyll, E. Ersvær, L. Vlatkovic, M. Pradhan, W. Kildal, M. Avranden Kjær, A. Kleppe, T.S. Hveem, B. Carlsen, S. Gill, S. Löffeler, E.S. Haug, H. Wæhre, P. Sooriakumaran, H.E. Danielsen, Tumour heterogeneity poses a significant challenge to cancer biomarker research, *Br. J. Cancer.* 117 (2017) 367–375.

¹⁴¹ L. Yin, Z. Zhang, Y. Liu, Y. Gao, J. Gu, Recent advances in single-cell analysis by mass spectrometry, *Analyst.* 144 (2019) 824–845.

¹⁴² N. Slavov, Single-cell protein analysis by mass spectrometry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 60 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.018>.

Dentro de este contexto, gracias a las mejoras en la electrónica de los equipos de ICP-MS que permiten la adquisición rápida de datos (*dwell time* <10 ms) es posible llevar a cabo análisis en disolución con resolución temporal (*time-resolved analysis*), lo que ha permitido la detección de una sola partícula (*single particle*, sp) o de una sola célula (*single-cell*, sc), ambos tipos de análisis basados en el mismo concepto de medida. Este hecho sumado a las características intrínsecas de la técnica ICP-MS permiten llevar a cabo un análisis célula a célula con elevada sensibilidad¹⁴³.

Como se observa en el esquema superior de la **Figura 18**, en los análisis por ICP-MS empleando como sistema de introducción de la muestra nebulización convencional, un analito es introducido en el plasma ICP de manera homogénea al estar distribuido en la muestra en disolución (digerida o lisada como se mostraba en la **Figura 17**). Por tanto, el analito entra de manera constante al plasma, generando así una señal continua y estable durante todo el tiempo de medida. Sin embargo, si en lugar de una disolución homogénea del analito, se analiza una suspensión de células lo suficientemente diluida como para que las células de la suspensión lleguen de forma individual al plasma (**Figura 18**, imagen inferior), cada célula generará un conjunto de iones cuando es vaporizada, atomizada e ionizada en el plasma, generando una señal de muy corta duración conocida como evento, o *spike*.¹⁴⁴ Estos eventos adquiridos presentan una duración típicamente de entre 100-500 μ s para una célula (aunque este tiempo depende del tamaño de la célula u organismo en cuestión), por lo que el *dwell time* fijado en el ICP-MS para la detección de los iones del analito debe ser lo suficientemente pequeño como para que cada evento registrado sea debido a una sola célula (generalmente se emplean *dwell time* menores de 10 ms)¹⁴⁵.

Cuando se realiza un análisis por sc-ICP-MS se pueden sacar varias conclusiones: a) el número de eventos detectado (**Figura 18**, imagen inferior) se corresponde

¹⁴³ F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk, Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1407–1413

¹⁴⁴ L. Armbrrecht, P.S. Dittrich, Recent Advances in the Analysis of Single Cells, *Anal. chem.* 89 (2017) 2–21.

¹⁴⁵ A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, Royal Society of Chemistry, 29, (2014) 1252–1257.

directamente con el número de células presentes en la suspensión celular analizada, b) la intensidad de los eventos es proporcional a la masa del analito presente en la célula, y c) la señal del fondo se relaciona con la concentración del analito disuelto en la suspensión celular y que no forma parte de las células individuales^{145,146}.

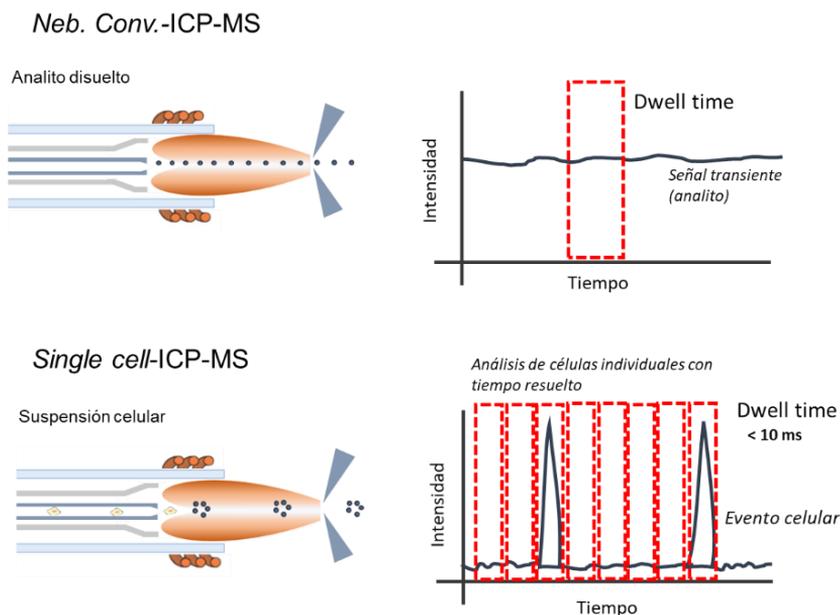


Figura 18: Esquema general donde se muestra comparativamente como son los análisis por ICP-MS con nebulización convencional y single cell – ICP-MS. En la imagen superior se muestra la intensidad obtenida al analizar una disolución homogénea del analito (Neb. Conv.-ICP-MS) frente al análisis mediante sc-ICP-MS de células individuales de una suspensión celular que se muestra en la imagen inferior.

Aparte de realizar una correcta selección del *dwell time*, otro aspecto crítico de la técnica sc-ICP-MS es asegurar un correcto transporte de la suspensión celular al plasma ICP para generar resultados fiables y reproducibles. Esto va ligado a dos cuestiones principalmente: mantener la integridad celular, es decir, que no haya rotura de las membranas celulares durante el transporte hasta el ICP-MS, y conseguir una

¹⁴⁶ J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: Determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, J. Anal. At. Spectrom. 27 (2012) 1143–1155.

buena eficiencia del transporte de las células hasta el plasma (en nebulización convencional la eficiencia de transporte es generalmente menor al 5%)^{144,147}. Para cumplir estos requisitos, en los análisis por sc-ICP-MS se debe disponer de sistemas de introducción de muestra adecuados. En la mayor parte de las aplicaciones se emplean micronebulizadores de alta eficiencia, que permiten un transporte elevado de muestras líquidas al plasma utilizando flujos de introducción de muestra muy bajos (en el rango de 10-45 $\mu\text{L min}^{-1}$), sin comprometer la integridad de las membranas y paredes celulares. Estos micronebulizadores se emplean acoplados a cámaras de nebulización de flujo laminar de consumo total y bajo volumen, que utiliza un flujo de Ar adicional a mayor velocidad para prevenir la deposición de las células en las paredes de la cámara, a la vez que permite un buen lavado entre muestras (eficiencias de transporte adecuadas y bajos efectos de memoria)¹⁴⁸. Además, actualmente se pueden encontrar también sistemas automatizados que emplean automuestreadores y permiten el análisis más rápido de las muestras (p. ej. el sistema *MicroFAST* de la casa comercial Elemental Scientific)¹⁴⁹.

En cuanto a los analizadores de masas empleados en el análisis de células individuales por ICP-MS, los más comunes son los de tipo cuadrupolo, los de doble enfoque y los de tiempo de vuelo. Se debe tener en cuenta que en los analizadores secuenciales es necesario un tiempo de acondicionamiento entre medidas de dos relaciones m/z distintas (conocido como *settling time*) que limita la posibilidad de determinación de varios elementos en un único evento procedente de una célula^{147,150}. Por ello parece que los equipos con analizadores quasi-simultáneos como los que emplean analizadores tipo tiempo de vuelo (con una alta resolución temporal de pocos μs) son más adecuados para la medida multielemental de señales transitorias muy

¹⁴⁷ M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116042.

¹⁴⁸ X. Yu, M. He, B. Chen, B. Hu, Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A review, *Anal. Chim. Acta.* 1137 (2020) 191–207.

¹⁴⁹ Elemental Scientific <https://www.icpms.com/products/microfast-singlecell.php> (visitada 25.05.2022)

¹⁵⁰ S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 1784–1813.

cortas, como las que se obtienen en el análisis de células individuales por sc-ICP-MS¹⁵¹. No obstante, se debe tener en cuenta que la sensibilidad de estos equipos disminuye notablemente (hasta uno o dos órdenes de magnitud menor) comparados con los ICP-MS que emplean analizadores de masas tipo cuadrupolo o de doble enfoque¹⁵².

A.4.1.3. Determinación de proteínas mediante *single cell*-ICP-MS

Hasta la fecha, la técnica sc-ICP-MS se ha aplicado fundamentalmente en la cuantificación de elementos metálicos y no metálicos presentes en células individuales. Estos elementos pueden estar presentes en las células de forma natural (i.e., como elementos constituyentes), como es el caso de K, Ca, Fe, Co, Cu, Mn, Zn, P, y S,^{153,154} o bien como elementos externos introducidos artificialmente debido a internalización del metal (p.ej., estudios de viabilidad^{155,156}), o con el objetivo de estudiar la incorporación celular de metalofármacos^{157,158} o de NPs metálicas^{159,160}.

¹⁵¹ L. Hendriks, L.M. Skjolding, Single-Cell Analysis by Inductively Coupled Plasma-Time-of-Flight Mass Spectrometry to Quantify Algal Cell Interaction with Nanoparticles by Their Elemental Fingerprint, n.d. www.tofwerk.com (consultada 30 Abril, 2022).

¹⁵² L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, B. Hattendorf, D. Günther, Characterization of a new ICP-TOFMS instrument with continuous and discrete introduction of solutions, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 548–561.

¹⁵³ K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 637e645.

¹⁵⁴ Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper insingle human red blood cells, *Talanta* 206 (2020) 120174.

¹⁵⁵ E. Mavrakis, L. Mavrouidakis, N. Lydakakis-Simantiris, S.A. Pergantis, Investigating the uptake of arsenate by *chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and easy ambient sonicspray ionization-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 9590e9598

¹⁵⁶ S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, *Metallomics.* 10 (2018) 73–76.

¹⁵⁷ Y. Zhou, H. Wang, E. Tse, H. Li, H. Sun, Cell Cycle-Dependent Uptake and Cytotoxicity of Arsenic Based Drugs in Single Leukemia Cells, *Anal. Chem.* 90 (2018) 10465–10471.

¹⁵⁸ M. Corte Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.* 89 (2017) 11491e11497

¹⁵⁹ R.C. Merrifield, C. Stephan, J.R. Lead, Quantification of Au nanoparticle biouptake and distribution to freshwater algae using single cell - ICP-MS, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 2271e2277.

¹⁶⁰ Z. Chen, B. Chen, M. He, B. Hu, Droplet-splitting microchip online coupled with time-resolved ICPMS for analysis of released Fe and Pt in single cells treated with FePt nanoparticles, *Anal. Chem.* 92 (2020) 12208e12215.

En cuanto a la determinación de proteínas empleando sc-ICP-MS, las metodologías desarrolladas siguen las mismas directrices que las descritas en los análisis por ICP-MS con nebulización convencional. Es decir, las biomoléculas pueden ser detectadas de manera directa midiendo un heteroátomo presente en la estructura de la misma, como puede ser un metal en las metaloproteínas o Se en las selenoproteínas¹⁵⁶. Por otro lado, las estrategias de detección indirecta basadas en el uso de inmunosondas metálicas, es decir, anticuerpos específicos etiquetados con un heteroátomo que reconocen específicamente la proteína de interés mediante una reacción antígeno-anticuerpo, son las que se emplean con más frecuencia para el estudio de biomoléculas. Sin embargo, estas estrategias continúan siendo un reto puesto que la realización de un inmunoensayo en células suspendidas puede comprometer la integridad de las células. Además, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, para la determinación de proteínas es necesario conocer el factor de amplificación, por lo que la inmunosonda debe ser adecuadamente caracterizada.

Hasta ahora, se han publicado varios trabajos para la detección de proteínas que combinan estas estrategias de inmunoensayo empleando inmunosondas metálicas y análisis de células por sc-ICP-MS. La mayor parte de las publicaciones usan anticuerpos específicos de las proteínas de interés marcados con isótopos de Ln. Dentro de este contexto, Corte-Rodríguez et al.¹⁶¹ hicieron uso de un Ab marcado con Nd (etiqueta MAXPAR® con 21 átomos de Nd por inmunosonda) para la cuantificación de un biomarcador de la membrana celular (transferrina receptor-1) en dos líneas celulares humanas diferentes. También de forma similar, utilizando MAXPAR® marcado con Lu, se determinó otro biomarcador (HER2) en mezclas de líneas celulares humanas¹⁶². Por otra parte, Liu et al.¹⁶³ han propuesto el uso de una etiqueta de detección bimodal como es la aminofluoresceína-DOTA-Nd para la detección

¹⁶¹ M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15532e15538,

¹⁶² A.F. Asensio, M. Corte-Rodríguez, J. Bettmer, L.M. Sierra, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, Targeting HER2 protein in individual cells using ICP-MS detection and its potential as prognostic and predictive breast cancer biomarker, *Talanta* 235 (2021) 122773,

¹⁶³ C. Liu, S. Lu, L. Yang, P. Chen, P. Bai, Q. Wang, Near-infrared neodymium tag for quantifying targeted biomarker and counting its host circulating tumor cells, *Anal. Chem.* 89 (2017) 9239e9246.

por MS e infrarrojo cercano (NIR). En dicho trabajo se llevó a cabo la identificación y determinación de un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en células tumorales circulantes. Alternativamente, Yua et al.¹⁶⁴ han desarrollado una detección empleando NPs similares a los virus que proporcionan una amplificación significativa de la señal para la detección de un biomarcador de membrana.

En este punto cabe destacar la importancia que ha adquirido en los últimos años el empleo de la estrategia de marcaje con Ln (mediadas por el reactivo quelante MAXPAR®) a anticuerpos específicos junto con la capacidad de determinación multielemental a nivel de célula individual que permiten los equipos de ICP-MS que emplean un analizador de masas tipo tiempo de vuelo (TOF). Esto ha dado lugar al desarrollo de una técnica conocida como citometría de masas (comercialmente CyTOF)¹⁶⁵. Esta técnica, similar a la citometría de flujo, utiliza anticuerpos marcados con diferentes isótopos de Ln y detección mediante ICP-TOF-MS, en lugar de anticuerpos marcados con fluoróforos para el reconocimiento de proteínas y detección fluorescente. La citometría de flujo convencional se limita al análisis simultáneo de unas 10 proteínas, debido al menor número de fluoróforos disponibles en el mercado y al solapamiento espectral entre las señales fluorescentes de los diferentes fluoróforos que pueden ser utilizados simultáneamente¹⁶⁶. Sin embargo, el marcaje elemental utilizado en citometría de masas ha llegado ha permitido el análisis de hasta 40 parámetros celulares de forma simultánea con resolución unicelular^{167,168}.

¹⁶⁴ R. Yuan, F. Ge, Y. Liang, Y. Zhou, L. Yang, Q. Wang, Viruslike element-tagged nanoparticle inductively coupled plasma mass spectrometry signal multiplier: membrane biomarker mediated cell counting, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4948-4952.

¹⁶⁵ S.D. Tanner, D.R. Bandura, O. Ornatsky, V.I. Baranov, M. Nitz, M.A. Winnik, Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay, in: *Pure Appl. Chem.*, De Gruyter, 80 (2008), 2627-2641.

¹⁶⁶ R. Gadalla, B. Noamani, B.L. MacLeod, R.J. Dickson, M. Guo, W. Xu, S. Lukhele, H.J. Elsaesser, A.R.A. Razak, N. Hirano, T.L. McGaha, B. Wang, M. Butler, C.J. Guidos, P.S. Ohashi, L.L. Siu, D.G. Brooks, Validation of CyTOF Against Flow Cytometry for Immunological Studies and Monitoring of Human Cancer Clinical Trials, *Front. Oncol.* 9 (2019) 415.

¹⁶⁷ M.H. Spitzer, G.P. Nolan, Mass cytometry: single cells, many Features, *Cell* 165 (2016)

¹⁶⁸ D.E. Carvajal-Hausdorf, J. Patsenker, K.P. Stanton, F. Villarroel-Espindola, A. Esch, R.R. Montgomery, A. Psyrrí, K.T. Kalogeras, V. Kotoula, G. Foutzilias, K.A. Schalper, Y. Kluger, D.L. Rimm, Multiplexed (18-Plex) measurement of signaling targets and cytotoxic T cells in Trastuzumab-treated patients using imaging mass cytometry, *Clin. Cancer Res.* 25 (2019) 3054-3062.

La **Figura 19** recoge un diagrama donde se resume cómo se lleva a cabo un análisis por citometría de masas. Dicha técnica se basa en la incubación de las células con anticuerpos específicos de las proteínas de interés etiquetados con isótopos de Ln (mediante el reactivo MAXPAR®). Los anticuerpos marcados reconocen y se unen a las proteínas diana presentes en las células (generalmente se trabaja con proteínas de la superficie celular). Adicionalmente, las células también pueden incubarse con moléculas, que contienen elementos como el Rh o Ir, las cuales son capaces de entrar en la célula e intercalarse en el ADN. La detección de estos elementos funcionaría como patrón interno para validar la detección de eventos celulares a la vez que se puede obtener información del contenido en ADN. Después de la incubación, las células en suspensión son introducidas en el plasma en forma de aerosol. Las nubes iónicas formadas se transfieren al analizador de masas de tiempo de vuelo, donde es posible realizar la detección cuasisimultánea de los diferentes isótopos utilizados como marcas en las señales transitorias (eventos) que genera cada célula¹⁶⁹.

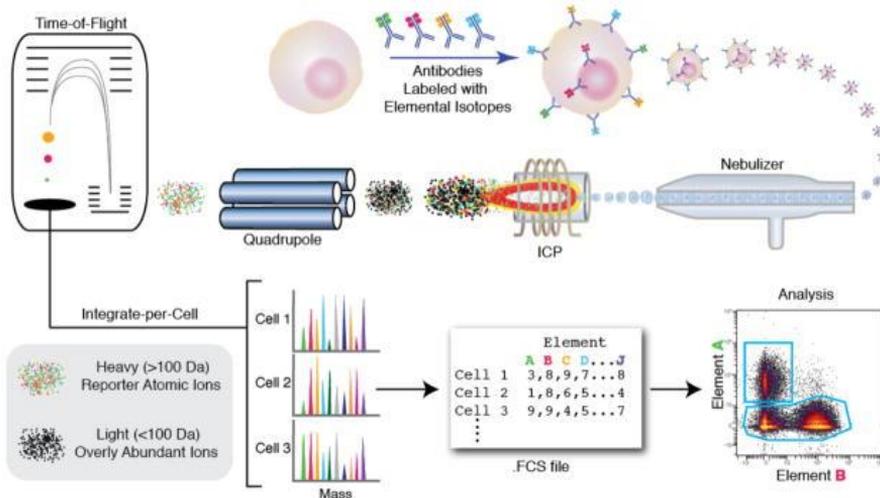


Figura 19: Esquema de la técnica de citometría de masas. Adaptado de Bendall et al.¹⁶⁹.

¹⁶⁹ S.C. Bendall, G.P. Nolan, M. Roederer, P.K. Chattopadhyay, A deep profiler's guide to cytometry. Trends in immunology, 33 (2012), 323–332.

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

En los apartados anteriores se ha comentado cómo la cuantificación de elementos esenciales y/o biomoléculas en muestras en disolución (fluidos o muestras digeridas/liofilizadas o suspensiones celulares) aporta información muy valiosa en los estudios biológicos y clínicos. Sin embargo, la posibilidad de obtener imágenes de la distribución espacial de los analitos directamente sobre tejidos o células en cultivo proporciona un punto de vista complementario que permite una mejor comprensión de muchos procesos biológicos y patológicos.

Tradicionalmente en biología y clínica este tipo de imágenes se obtienen mediante estrategias de tinción química específica empleando métodos de IHC convencionales o mediante IF. En la sección **A.2.2.4**, se describen ambas técnicas y se comentan con detalle las ventajas e inconvenientes de ambas aproximaciones. Las limitaciones que presentan radican principalmente en la imposibilidad de realizar una cuantificación del analito de interés, así como en el solapamiento espectral de las marcas fluorescentes para realizar medidas multiparamétricas. Adicionalmente, no son técnicas que permitan la localización elemental. En este contexto, las técnicas de *imaging* por espectrometría de masas (IMS) suponen una potente herramienta capaz de evaluar mezclas complejas tanto para medida de elementos como moléculas en tejidos y células, con una elevada especificidad y resolución lateral. Dentro de las técnicas de IMS, las más empleadas actualmente en estudios clínicos son la espectrometría de masas de iones secundarios MALDI-MS, (SIMS, *Secondary Ion Mass Spectrometry*), y la ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS¹⁷⁰.

La técnica MALDI-MS es una técnica ampliamente empleada para la obtención de imágenes (con resolución espacial entre 5-200 μm) de la distribución de tipos muy variados de moléculas: proteínas, péptidos, lípidos, y otros metabolitos (p.ej.,

¹⁷⁰ P.A. Doble, R. Gonzalez de Vega, D.P. Bishop, D.J. Hare, D. Clashes, Laser Ablation–Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry Imaging in Biology. *Chem. Rev.* 121, (2021) 121, 11769–11822

fármacos o drogas) en tejidos, sin necesidad de marcaje¹⁷¹. Sin embargo, la necesidad de preparar las muestras embebidas en una matriz que absorba la energía del haz láser empleado para la desorción molecular y la ionización limita las estrategias de cuantificación. Por otra parte, la técnica SIMS permite el mapeo de isótopos, elementos y pequeñas moléculas (por debajo de 1000 Da) en tejidos biológicos con una resolución espacial de hasta 50 nm¹⁷². Sin embargo, su uso en aplicaciones biológicas se ve limitado para el análisis cuantitativo (interferencias con iones moleculares y atómicos, así como importantes efectos de matriz) y la necesidad de preservar las muestras para trabajar en condiciones de alto vacío¹⁷⁰.

Alternativamente, la técnica LA-ICP-MS proporciona una elevada sensibilidad para el análisis elemental a nivel de trazas y ultratrazas ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ - $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dependiendo de las condiciones de análisis)¹⁷³ con una buena resolución espacial: resolución lateral en el rango de unas pocas micras (1-5 μm típicamente) y una resolución en profundidad que puede llegar a los 500 nm. Aunque la técnica LA-ICP-MS presenta también importantes efectos de matriz, es posible llevar a cabo la cuantificación de heteroátomos en las muestras (es necesario desarrollar métodos de cuantificación adecuados dependiendo del tipo de muestra) a la vez que permite la detección simultánea de varios elementos en muestras biológicas con una resolución espacial en el rango de los micrómetros. Teniendo en cuenta la complementariedad de las técnicas de IMS, algunos trabajos muestran la detección multimodal aprovechando las ventajas de las diferentes técnicas. Por ejemplo, Matusch et al. analizaron secciones de cerebro de rata con

¹⁷¹ Aichler, M., Walch, A. MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab. Invest.*, 95(4) (2015) 422-431.

¹⁷² Wirtz, T., Philipp, P., Audinot, J. N., Dowsett, D., Eswara, S. High-resolution high-sensitivity elemental imaging by secondary ion mass spectrometry: from traditional 2D and 3D imaging to correlative microscopy. *Nanotechnology*, 26 (2015) 434001-434022.

¹⁷³ Becker, J. S., Matusch, A., Wu, B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements-recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. *Anal. Chim. Acta.*, 835 (2014) 1-18

6-OHDA utilizando espectrometría molecular y atómica, mostrando las distribuciones espaciales cuantitativas de Mn, Fe, Zn y Cu por LA-ICP-MS y correlacionándolas con las distribuciones de lípidos medidas por MALDI-MS¹⁷⁴.

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

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

El uso y el desarrollo de la técnica LA-ICP-MS viene ligada a la necesidad de localización y mapeo de elementos esenciales en las muestras biológicas puesto que muchos estados patológicos se caracterizan por una alteración de la homeostasis elemental. Recientemente, el uso de esta técnica se ha ampliado al estudio de la internalización y distribución de elementos traza esenciales o tóxicos, agentes de contraste administrados, así como NPs o metalofármacos, estudios de gran interés en medicina¹⁷⁵.

De manera general y esquemática en la **Figura 20** se muestra la configuración de un sistema de LA. La muestra se introduce en una cámara de ablación, que se purga con un gas portador (normalmente He). A continuación, se enfoca el haz láser sobre la superficie de la muestra. Se utilizan pulsos láser cortos de alta energía para ablacionar la muestra. Los fotones del láser interactúan con la muestra y se forma un aerosol que contiene partículas de la muestra (generalmente se ablaciona una cantidad de muestra del rango pg-fg). El material ablacionado es transportado posteriormente al plasma ICP por una corriente de gas portador. Una vez alcanzado el plasma se

¹⁷⁴ Matusch, A.; Fenn, L. S.; Depboylu, C.; Kliez, M.; Strohmer, S.; McLean, J. A.; Becker, S. J. Combined Elemental and Biomolecular Mass Spectrometry Imaging for Probing the Inventory of Tissue at a Micrometer Scale. *Anal. Chem.* 84, (2012), 3170–3178.

¹⁷⁵ H. Traub, Chapter Six - Imaging of metal-based nanoparticles in tissue and cell samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, Editor(s): Radmila Milačić, Janez Ščančar, Heidi Goenaga-Infante, Janja Vidmar, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 93, (2021), 173-240.

produce la vaporización del aerosol, la atomización y finalmente la ionización. A continuación, los iones se separan y se detectan en el MS. Como se puede observar en la Figura, la etapa de muestreo está separada de la excitación e ionización, por lo que puede optimizarse de forma independiente.

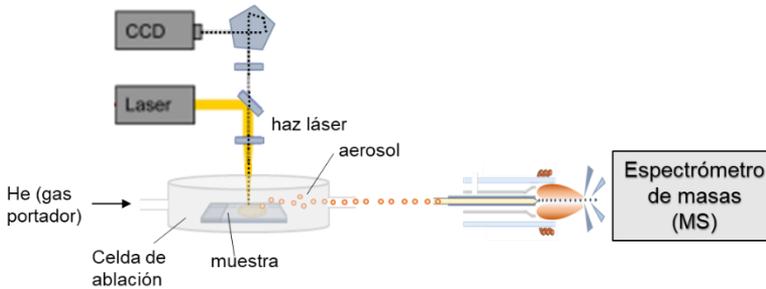


Figura 20: Esquema de la configuración de un sistema láser acoplado a ICP-MS

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

En cuanto a los sistemas láser que se comercializan a día de hoy, existen con diferentes longitudes de onda, energía del láser y duración del pulso (nanosegundo o femtosegundo). Para las aplicaciones de *imaging* se utilizan ampliamente los láseres de estado sólido (p.ej., Nd:YAG : granate de Y y Al dopado con impurezas de Nd) que trabajan en el régimen de tiempo de nanosegundo (ns) y con longitudes de onda de

266 nm (frecuencia cuádruple) o 213 nm (frecuencia quintuple). Paralelamente, se utilizan también de manera generalizada los láseres de excímero cuyo medio de amplificación es una mezcla de gases (p.ej., ArF de 193 nm), y han permitido mejorar las características de ablación para una gran variedad de matrices (desde muestras biológicas a geológicas). Con este tipo de láseres se reduce el fraccionamiento de fraccionamiento elemental, especialmente para el análisis de muestras transparentes al IR, como el cuarzo y otros minerales. Además, ofrecen una resolución espacial de entre 1 y 200 μm , dependiendo del diámetro haz láser seleccionado¹⁷⁵.

Respecto a la resolución alcanzada en los análisis por LA-ICP-MS, es necesario tener en cuenta que la resolución depende también del tiempo de evacuación del aerosol desde la cámara de ablación (*washout time*) y del transporte rápido y eficiente del material ablacionado hasta el ICP, así como de la frecuencia de adquisición de datos por parte del analizador de masas. En general, la reducción del tamaño del haz láser implica una mejor resolución espacial, pero también hace que se ablacione menos material por disparo del láser y, por tanto, una disminución de los iones detectados. Esto provoca una menor sensibilidad y aumenta el tiempo de medida. Por todo ello, las condiciones óptimas de ablación han de ser seleccionadas en cada caso particular como un compromiso entre la sensibilidad y la resolución requerida en cada tipo de aplicación. El desarrollo de nuevas celdas de ablación con tiempos de evacuación reducidos, como por ejemplo la Celda TwoVol2, (Elemental Scientific) que ofrece tiempos de evacuación entre 10-600 ms, ha permitido mejorar notablemente la resolución de las imágenes obtenidas, al evitar el solapamiento de señales de cada disparo del haz láser.

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

La obtención de imágenes cuantitativas de elementos, marcas elementales o NPs en muestras biológicas mediante LA-ICP-MS continúa siendo un reto a día de

hoy. Los factores que influyen en una cuantificación fiable son los efectos de fraccionamiento elemental¹⁷⁶, la inestabilidad del instrumento (i.e., deriva en la medida durante el tiempo de análisis), la gran variedad de tipos de muestras (y su complejidad), y la falta de materiales de referencia adecuados para hacer una calibración. Por lo tanto, el desarrollo de estrategias de cuantificación basadas en la preparación de estándares de calibración que imitan la matriz de la muestra (*matrix-matched*), así como para realizar la estandarización interna son un importante campo de investigación. En la práctica, ambos enfoques, el empleo de un patrón interno y el uso de una calibración *matrix-matched* han dado lugar al desarrollo de diferentes tipos de estrategias de calibración¹⁷⁷

Se debe tener en cuenta que las muestras empleadas para llevar a cabo el *imaging* por LA-ICP-MS suelen ser secciones de tejido microscópico o monocapas de células depositadas en portaobjetos, las cuales presentan espesores de entre 2-30 μm . Las condiciones de ablación se optimizan de tal manera que se produzca la ablación completa del material con el láser (se arranca todo el volumen de la muestra). Paralelamente, las muestras empleadas como patrones de calibración deben tener el mismo espesor que las muestras y son ablacionadas también completamente a las condiciones de análisis optimizadas. De este modo, no es necesario tener en cuenta las diferencias en la profundidad de penetración del haz láser en el material de la muestra¹⁷⁵.

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

A.4.2.2.1.- Estrategias basadas en el empleo de un patrón interno

De forma análoga al ICP-MS por nebulización convencional, el uso de un patrón interno (IS, *internal standard*) puede ayudar a corregir los cambios de intensidad de la señal originados por la inestabilidad del instrumento y/o efectos de deriva que

¹⁷⁶ S. Zhang, M. He, Z. Yin, E. Zhu, W. Hang, B. Huang, Elemental fractionation and matrix effects in laser sampling based spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 358–382.

¹⁷⁷ D. Pozebon, G.L. Scheffler, V.L. Dressler, Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review. *J. Anal. At. Spectrom.* 32, (2017), 890-919.

se pueden producir durante los largos tiempos de medición (el tiempo típico para realizar un *imaging* puede variar entre 4-30 h). Además, los cambios en la composición de la matriz (p.ej., la diferente densidad celular o los tipos de células dentro de una muestra de tejido) pueden influir también en la cuantificación. Un patrón interno eficaz debe comportarse de forma similar al analito durante el proceso de ablación y en el ICP-MS, así como estar distribuido homogéneamente en la muestra y en los estándares de calibración¹⁷⁸. En este contexto el C (típicamente ¹³C), constituyente principal en las muestras biológicas y que se distribuye uniformemente a lo largo de las mismas, ha sido empleado como patrón interno con frecuencia en un gran número de aplicaciones¹⁷⁹. Sin embargo, estudios fundamentales han mostrado que las propiedades de transporte y las eficiencias del C pueden diferir notablemente de los de los analitos. Por tanto, emplear el C como normalización puede conducir a una cuantificación inexacta¹⁸⁰. Alternativamente se han propuesto marcadores elementales unidos covalentemente a ciertos componentes de la muestra. Por ejemplo, tinción con el intercalador de Ir (η^5 -entametilciclopentadienilo)-iridio (III)-dipiridofenazina¹⁸¹ o el tetraóxido de Ru (reacciona covalentemente con los dobles enlaces C-C de los ácidos grasos o de las moléculas no lipídicas). Sin embargo, para el caso del Ir, al ser un intercalador de ADN sólo se encuentra en el núcleo (no está distribuido homogéneamente)¹⁸². Otras alternativas radican en el empleo de capas constituidas por elementos homogéneamente distribuidos depositadas sobre o debajo de la muestra. La capa se ablaiona completamente junto con la sección de tejido o célula. Por

¹⁷⁸ C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh, P. Doble, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1494–1501.

¹⁷⁹ J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 813–818.

¹⁸⁰ D.A. Frick, D. Günther, Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1294–1303

¹⁸¹ D.A. Frick, C. Giesen, T. Hemmerle, B. Bodenmiller, D. Gunther, An internal standardisation strategy for quantitative immunoassay tissue imaging using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 254–259.

¹⁸² R. Catena, L.M. Montuenga, B. Bodenmiller, Ruthenium counterstaining for imaging mass cytometry, *J. Pathol.* 244 (2018) 479–484.

ejemplo, Konz et al.¹⁸³ desarrollaron un enfoque de normalización basado en la deposición de una fina película homogénea de Au sobre la superficie del tejido.

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

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

Los estándares de calibración preparados en laboratorio que intentan imitar la matriz de la muestra suelen crearse empleando geles de gelatina (que imitan la matriz del tejido) o empleando el propio tejido homogeneizado al que se le añaden concentraciones crecientes del/los elemento(s) a cuantificar. La ventaja de este tipo de aproximaciones es la facilidad con la que se pueden ajustar las concentraciones de los analitos del calibrado a la muestra. Sin embargo, el proceso de producción debe ser validado, es decir, se debe llevar a cabo una caracterización de la composición elemental de los estándares empleados con una técnica de referencia. Para ello, se suele realizar una digestión ácida del estándar de calibración y se lleva a cabo la determinación elemental por ICP-MS con nebulización convencional¹⁸⁴.

¹⁸³ I. Konz, B. Fernandez, M.L. Fernandez, R. Pereiro, H. Gonzalez, L. Alvarez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution in eye microstructures, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3091–3096.

¹⁸⁴ M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. Gonzalez-Iglesias, B. Fernandez, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation–ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558.

El trabajo pionero que publicó por primera vez este tipo de estrategias de cuantificación fue realizado por Becker et al.¹⁸⁵ empleando tejido de cerebro homogeneizado al que se le añaden disoluciones de elementos en diferentes niveles de concentración. A modo de resumen, el protocolo de formación de los estándares fue: (1) homogeneización y centrifugación del tejido, (2) adición de las disoluciones de metal, y (3) congelación de los estándares. Posteriormente para la calibración por LA-ICP-MS, los estándares fueron seccionados al grosor requerido y ablacionados utilizando los mismos parámetros que para las muestras de cerebro humano en las que se llevó a cabo la cuantificación de elementos naturalmente presentes en los tejidos. Otros trabajos que emplean protocolos similares fueron presentados a posteriori por Hare et al.¹⁸⁶ y Jukowski et al.¹⁸⁷. Las ventajas que presentan estas estrategias son la estabilidad a largo plazo del material congelado y que se pueden realizar múltiples criocortes de apenas unos μm de grosor a partir de una misma muestra. Otros trabajos publicados para la obtención de mapas cuantitativos de la distribución de NPs en diferentes tejidos es por ejemplo el presentado por Wiemann et al.¹⁸⁸ que emplea tejidos homogeneizados a los que se les añaden concentraciones crecientes de AuNPs. De esta manera es posible cuantificar los mapas de bioacumulación de AuNPs en diferentes tejidos de órganos de ratón (pulmón e hígado).

Otro enfoque comúnmente aceptado es el uso de matrices para los estándares que imiten la composición de la muestra biológica. Por ejemplo, el empleo de gelatina, agarosa u otros compuestos como la nitrocelulosa. En particular, los geles de gelatina con concentraciones crecientes del elemento a cuantificar se han empleado

¹⁸⁵ J.S. Becker, M.V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher, K. Zilles, Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3208–3216.

¹⁸⁶ D.J. Hare, J. Lear, D. Bishop, A. Beavis, P.A. Doble, Protocol for production of matrix-matched brain tissue standards for imaging by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Methods* 5 (2013) 1915–1921.

¹⁸⁷ K. Jurowski, M. Szewczyk, W. Piekoszewski, M. Herman, B. Szewczyk, G. Nowak, S. Walas, N. Miliszkievicz, A. Tobiasz, J. Dobrowolska-Iwanek, A standard sample preparation and calibration procedure for imaging zinc and magnesium in rats' brain tissue by laser ablation-inductively coupled plasma-time of flight-mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1425–1431.

¹⁸⁸ M. Wiemann, A. Vennemann, F. Blaske, M. Sperling, U. Karst, Silver nanoparticles in the lung: toxic effects and focal accumulation of silver in remote organs, *Nanomaterials* 7 (2017) 441.

frecuentemente desde hace varios años como estrategia de calibración para el análisis de secciones de tejido. En este contexto Sala et al.¹⁸⁹ presentaron mejoras en la producción de este tipo de patrones al estudiar la influencia de varios parámetros (tipo y concentración de gelatina, acidez, temperatura de secado, etc.) en la calidad y homogeneidad del gel. Siguiendo esta estrategia, algunos trabajos recientemente publicados muestran el *imaging* elemental cuantitativo en diferentes tejidos. Por ejemplo, Rodríguez-Menéndez et al.¹⁹⁰ obtuvieron la distribución cuantitativa de Zn en tejidos criogénicos de retina y Bishop et al.¹⁹¹ mostraron un mapa cuantitativo de la distribución de AgNPs en secciones de bazo de rata tras haber sido expuesta a AgNPs antimicrobiales. Resaltar también estudios recientes donde se ha evaluado el uso de suspensiones de AuNCs o la sal del metal inorgánica para preparar patrones de gelatina. En este último caso se observó una homogeneidad y sensibilidad para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ similar en ambos casos (patrones de gelatina con AuNCs o Au metálico) al ser medidos por LA-ICP-MS.¹⁹² Alternativamente a los estándares suplementados que imitan la matriz de la muestra (tejidos homogeneizados o geles), se pueden encontrar estrategias basadas en el empleo de residuos secos de la disolución elemental (o la suspensión de NPs) depositados sobre el sustrato (p.ej., el tejido)¹⁹³.

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

¹⁸⁹ M. Sala, V.S. Selih, J.T. van Elteren, Gelatin gels as multi-element calibration standards in LA-ICP-MS bioimaging: fabrication of homogeneous standards and microhomogeneity testing, *Analyst* 142 (2017) 3356–3359

¹⁹⁰ S. Rodríguez-Menéndez, B. Fernández, M. García, L. Álvarez, M. L. Fernández, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, R. Pereiro, H. González-Iglesias, Quantitative study of zinc and metallothioneins in the human retina and RPE cells by mass spectrometry-based methodologies, *Talanta* 178 (2018) 222–230.

¹⁹¹ D.P. Bishop, M. Grossgarten, D. Dietrich, A. Vennemann, N. Cole, M. Sperling, M. Wiemann, P.A. Doble, U. Karst, Quantitative imaging of translocated silver following nanoparticle exposure by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Methods* 10 (2018) 836–840.

¹⁹² M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151.

¹⁹³ B. Malile, J. Brkic, A. Bouzekri, D.J. Wilson, O. Ornatsky, C. Peng, J.I.L. Chen, DNA-conjugated gold nanoparticles as high-mass probes in imaging mass cytometry, *ACS Appl. Bio Mater.* 2 (2019) 4316–4323.

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

En cuanto a los quelatos metálicos simples (DOTA) que coordinan un solo átomo de Ln por quelato se han utilizado con éxito en varias aplicaciones de LA-ICP-MS. Para este tipo de aplicaciones el DOTA se debe funcionalizar (con residuos reactivos) para poder unirlo covalentemente al Ab, por ejemplo, con Bz-SCN (isotiocianatobencilo). Este complejo se ha empleado para la detección múltiple de marcadores tumorales en tejido de cáncer de mama tras una etapa de IHC: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), citoqueratina 7 (CK7) y mucina 1 (MUC1) empleando el marcaje de los anticuerpos anti-Her2, anti-CK7 y anti-MUC1 con los complejos quelantes (Ho, Tm, y Tb)-DOTA¹⁹⁴. Sin embargo, cabe mencionar que se ha demostrado que los Bz-SCN-DOTA no dan lugar a un solo tipo de molécula de Ab marcada y además aparece alto porcentaje de moléculas no

¹⁹⁴ C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne U. Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 83, (2011), 8177–83.

marcadas encontrando un rendimiento de etiquetado muy bajo, alrededor de 0,03%)¹⁹⁵.

Las etiquetas poliméricas que contienen varios quelatos metálicos de un determinado metal o isótopo proporcionan una notable amplificación de la señal, como es el caso del reactivo comercialmente disponible MAXPAR® (contiene varios compuestos quelantes de DTPA). La etiqueta polimérica metálica se une al Ab a través de un enlazador de maleimida, por reducción de disulfuro (apartado A.3.2.4). Normalmente, se conjugan cuatro o cinco de estos polímeros a cada Ab y cada MAXPAR® puede contener entre 14 - 22 quelantes DPTA (dependiendo del tipo), por lo que proporcionan una elevada amplificación de la señal en la detección de la biomolécula¹⁹⁶. Este tipo de polímeros se han utilizado con éxito como etiquetas de anticuerpos en diferentes aplicaciones en combinación con ICP-TOF-MS para citometría de masas¹⁹⁶. Adicionalmente, este tipo de estrategia se ha empleado con éxito con un sistema de LA para aplicaciones de *imaging* por citometría de masas (CyTOF™). En este caso es posible obtener imágenes multiparamétricas de tejidos con resolución subcelular. En este sentido, cabe destacar el trabajo pionero de Giesen et al.¹⁹⁷ en el que se logró la obtención simultánea de imágenes de 32 biomoléculas (proteínas y modificaciones de proteínas) con polímeros que contienen Ln como elementos detectables. En la **Figura 21** se muestra a modo de ejemplo el flujo de trabajo seguido en esta publicación para llevar a cabo el análisis múltiple proteínas y proteínas modificadas mediante la técnica de *imaging* múltiple de citometría de masas (CyTOF™) en muestras de cáncer de pecho.

¹⁹⁵ L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P.H. Roos, M.W. Linscheid. 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.* 27, (2012), 1311–20.

¹⁹⁶ S.D. Tanner, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, D.R. Bandura, T.C. George. An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications. *Cancer Immunol Immunother.* 62, (2013), 955–65.

¹⁹⁷ Giesen, C.; Wang, H. A.; Schapiro, D.; Zivanovic, N.; Jacobs, A.; Hattendorf, B.; Schuffler, P. J.; Grolimund, D.; Buhmann, J. M.; Brandt, S.; Varga, Z.; Wild, P. J.; Gunther, D.; Bodenmiller, B. Highly Multiplexed Imaging of Tumor Tissues with Subcellular Resolution by Mass Cytometry. *Nat. Methods* 2014, 11, 417–22.

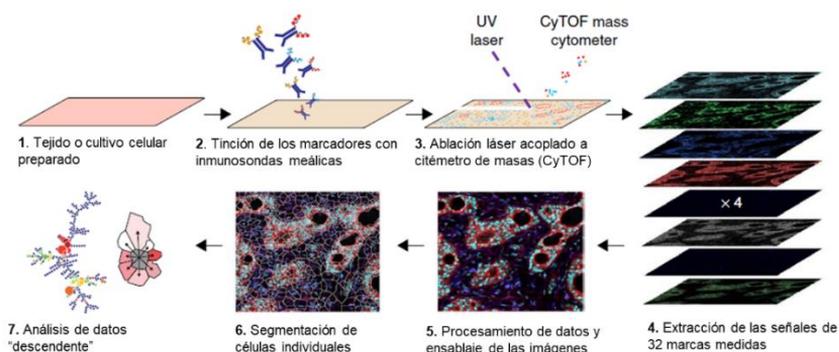


Figura 21: Flujo de trabajo de la técnica de *imaging* empleando citometría de masas (CyTOF™). Imagen adaptada de la referencia Giensen et al.¹⁹⁷

Por último, el empleo de anticuerpos marcados con MNPs en aplicaciones de LA-ICP-MS es todavía escaso a pesar de que los MNPs presentan una importante ventaja frente a los quelantes, puesto que la parte polimérica no metálica de estas etiquetas permite mejorar la relación entre el "número de átomos metálicos detectables" y el tamaño de la etiqueta. Uno de los trabajos publicados hasta la fecha se centra en el *imaging* de biomarcadores de cáncer de mama utilizando anticuerpos secundarios marcados con AuNPs de 5 nm¹⁹⁸. Paul et al. presentan también el uso de AuNPs (10 nm) como etiqueta de un Ab secundario para el *imaging* de la tirosina hidroxilasa (enzima limitadora de la tasa de biosíntesis de la dopamina) en el cerebro de tejidos de ratón. Sin embargo, se debe comentar que, se ha informado del riesgo de interacciones no específicas en el caso de procedimientos de IHC en tejidos biológicos¹⁹⁹.

El uso de MNCs como etiquetas elementales para el *imaging* por LA-ICP-MS ha sido también estudiado en diferentes tipos de tejidos biológicos²⁰⁰. Además, en

¹⁹⁸ J. Seuma, J. Bunch, A. Cox, C. McLeod, J. Bell, C. Murray. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *Proteomics*. 8, (2008), 3775–84.

¹⁹⁹ B. Paul B, D.J. Hare D.P. Bishop C. Paton, VT. Nguyen, N. Cole, et al. Visualising mouse neuroanatomy and function by metal distribution using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging. *Chem Sci*.6, (2015), 5383–93.

²⁰⁰ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro R. Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta*. 197, (2019), 413-421.

algunos casos se ha realizado una detección bimodal por ICP-MS y detección fluorescente. Recientemente, se ha publicado una estrategia de mapeo cuantitativo de para metalotioneínas-1/2 en retina humana utilizando AuNCs solubles en agua con un tamaño medio de 2,7 nm y más de 500 átomos de Au por etiqueta²⁰¹. A modo de ejemplo, en la **Figura 22** se recogen las imágenes cuantitativas obtenidas para la distribución de la proteína MT1/2 en diferentes secciones de retina humana empleando la estrategia de marcaje y cuantificación con los AuNCs.

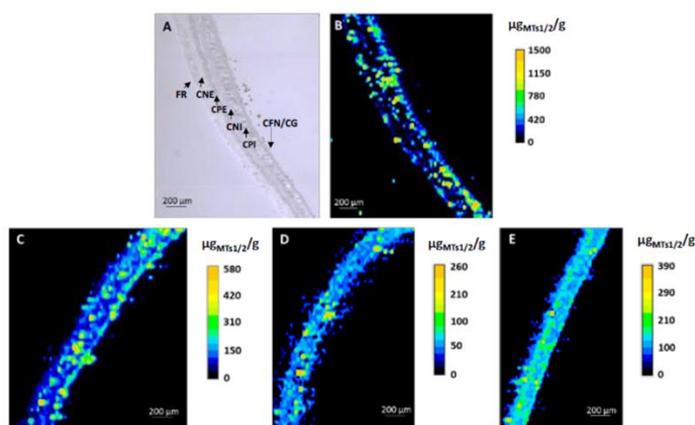


Figura 22: Imágenes cuantitativas obtenidas para la distribución de MTs 1/2 en secciones de retina humana por LA-ICP-MS empleando como etiqueta metálica AuNCs. La imagen A corresponde a la imagen óptica del tejido antes de su análisis por LA-ICP-MS. Las imágenes B-E muestran la concentración de proteína MT1/2 en diferentes secciones de un donante control. Imagen adaptada de la ref. 201

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

²⁰¹ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. Gonzalez-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145-12151.

concentraciones más bajas de los analitos de interés y se requiere una mayor resolución debido al tamaño de sus estructuras).

B.OBJETIVOS

OBJETIVOS

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

Este objetivo general se divide en varios objetivos parciales resumidos en los diferentes capítulos que engloban la presente Tesis Doctoral.

Objetivo 1:

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

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

Objetivo 2:

Obtener el *imaging* simultáneo (cualitativo y cuantitativo) de tres proteínas de interés en DMAE en secciones de tejidos oculares *post-mortem* de personas control y enfermos de DMAE por LA-ICP-MS empleando una estrategia de marcaje con NCs de 3 metales diferentes (PtNCs, AuNCs, y AgNCs).

- Distribución individual de 3 proteínas de interés en DMAE (APP, MT1/2 y CFH) en tejidos oculares *post-mortem* de personas control empleando los PtNCs sintetizados en el primero de los objetivos.

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

Objetivo 3:

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

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

Objetivo 4:

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

OBJETIVOS

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

C.EXPERIMENTAL

GENERAL

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

C.1. INSTRUMENTACIÓN

En esta apartado se describen en primer lugar los equipos empleados para la caracterización de los MNCs sintetizados, así como de las inmunosondas bimodales (Anti-h-Ab:MNCs). Posteriormente se presentan aquellos equipos que se emplean para la determinación de las proteínas diana empleando detección fluorescente y por detección por ICP-MS.

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

En esta sección se detallan aquellos equipos que son empleados para la caracterización de los MNCs sintetizados (PtNCs, AuNCs, y AgNCs) y que son empleados como marcas bimodales para la detección de las biomoléculas diana a lo largo de la Tesis Doctoral.

C.1.1.1. Dispersión Dinámica de la luz (DLS)

El equipo de DLS empleado en la presente Tesis Doctoral es el Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd EEUU.). El DLS es una técnica ampliamente usada en el campo de la nanotecnología puesto que es una técnica no invasiva y bien establecida para medir el tamaño hidrodinámico y la distribución de tamaños de macromoléculas y partículas en la región submicrométrica (típicamente entre 1 nm – 10

μm)¹. El DLS es capaz de relacionar la difusión de las partículas (o macromoléculas) en suspensión coloidal bajo movimiento Browniano con el tamaño hidrodinámico de la partícula. Es decir, se mide la dispersión de la luz provocada por las partículas suspendidas en un líquido, al ser irradiadas con un haz de luz láser (193 nm). Por tanto, el análisis de estas fluctuaciones en la intensidad permite conocer la velocidad del movimiento Browniano de la suspensión de partículas, el cual se relaciona con el tamaño hidrodinámico de la partícula aplicando la ecuación de Stokes-Einstein².

La distribución de tamaño hidrodinámico de la suspensión coloidal puede obtenerse en referencia a la intensidad, volumen, o número de dichas partículas de la suspensión. Sin embargo, el valor de la distribución de tamaño atendiendo al número de partícula es el que proporciona medidas más exactas, puesto que indica el valor promedio de la población de partículas mayoritaria (i.e., el valor de diámetro de la suspensión que presenta un mayor número de partículas de un determinado tamaño). De esta manera, se evita obtener información errónea por la presencia de agregados en la suspensión³. Adicionalmente, otra información interesante que ofrece esta técnica es el valor del índice de polidispersión de la suspensión coloidal, conocido como PDI (dato adimensional). Este da información sobre la dispersión en la distribución de tamaños de una suspensión, siendo un valor menor a 0,1 el indicativo de una suspensión altamente monodispersa (i.e., MNCs de buena calidad por tener todo un tamaño muy similar), mientras que un valor mayor o igual a 0,4 indica elevada polidispersión (i.e., MNCs de mala calidad por tener una gran dispersión de tamaños y/o presencia de agregados en la suspensión)³.

Por otro lado, el equipo de DLS permite realizar medidas de potencial-Z, una medida indirecta de la estabilidad frente a la tendencia a la agregación. La mayoría de las dispersiones coloidales tienen una carga superficial originada por la naturaleza de

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

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

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

las partículas y el medio que las rodea (doble capa eléctrica). La estabilidad de un sistema coloidal puede determinarse sumando las fuerzas de atracción de Van der Waals y las fuerzas de repulsión de la doble capa eléctrica⁴. Los factores que afectan al potencial-Z, incluyen el pH, la conductividad, y la concentración, considerándose generalmente que sistemas que muestran un potencial Z entre + 30 y -30 mV son más inestables y tienden a largo plazo a la agregación⁵. Para llevar a cabo este tipo de medidas, el instrumento Malvern Zetasizer Nano utiliza microelectroforesis doppler. Para ello, se aplica un campo eléctrico a una dispersión de partículas que se mueven con una velocidad, conocida como velocidad electroforética, y a partir de esta se puede relacionar la distribución de potencial Z de la suspensión.

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

C.1.1.2. Medidas por espectroscopía

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

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

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

con incrementos de 0,1 nm, y (4) el detector tipo fotomultiplicador. A parte de barridos de excitación o de emisión entre las longitudes de onda mencionadas, también permite la opción de realizar barridos sincrónicos tanto a una longitud de onda constante como a una diferencia de energía constante. La velocidad de barrido se puede seleccionar de 10 a 1500 nm·min⁻¹ con incrementos de 1 nm·min⁻¹. La exactitud de la longitud de onda es de ± 1 nm y la reproducibilidad de ± 0.5 nm.

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

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

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

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite llevar a cabo la caracterización estructural de los nanomateriales, es decir, obtener la morfología, tamaño, composición, y estructura cristalina de los MNCs. Esta técnica aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones acelerados (cañón de electrones LaB₆ acelerados hasta 200 kV) colisiona con la muestra de interés (MNCs depositados en una rejilla de Cu). En función del espesor de la muestra y del tipo de átomos que la forman, un porcentaje de los electrones del haz son dispersados y la otra parte de ellos atraviesan la muestra. Esto permite generar una imagen con elevada información estructural de la muestra. En concreto, la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) permite generar imágenes de la estructura de una muestra a nivel atómico (resolución de 0,5 Å). Por ello es comúnmente empleado en el estudio de nanomateriales con pequeñas dimensiones, como es el caso de los MNCs empleados en la presente Tesis Doctoral.

En los experimentos llevados a cabo en la Tesis Doctoral el equipo de HR-TEM empleado ha sido el modelo JEM-2100 de la casa comercial JOEL dispuesto con un espectrómetro de energía dispersiva de rayos X (EDX) para el microanálisis. El microscopio electrónico posee hasta 200 kV de aceleración y está equipado con un cañón de electrones de emisión de campo, el cual permite obtener un haz de luz muy intenso (alto brillo y estabilidad del haz de electrones) y de tamaño sub-nanométrico. El potencial de aceleración empleado junto a la incorporación de un lente objetivo de alta resolución permite alcanzar una resolución de 1,9 Å entre puntos y 1,0 Å entre líneas. El equipo dispone además de una cámara CCD de alta resolución (2048x2048 *pixels*) y la unidad de EDX permite la detección de los elementos presentes en la muestra (i.e., es posible obtener la composición elemental de la muestra). El equipo también está equipado con una unidad de barrido por transmisión con detectores de campo claro (BF, *Bright Field*) u oscuro (DF, *Dark Field*), siendo el más usado el primero de ellos, donde los átomos de elementos de elevada masa atómica (p.ej., Pt, Au, y Ag) se observan en color oscuro (escala de negro-gris) y aquellos átomos de masas bajas en color claro.

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

C.1.2. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA PARA LA DETECCIÓN DE LAS INMUNOSONDAS POR MS Y FLUORESCENCIA

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

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado cuatro equipos diferentes de ICP-MS, los cuales se pueden dividir en dos grupos atendiendo al tipo de analizador

de masas: ICP-MS de tipo cuadrupolo, e ICP-MS con un analizador de sector magnético de doble enfoque (ICP-MS de alta resolución). En ambos casos se trata de ICP-MS con analizadores de tipo secuencial. Estos equipos se han empleado a lo largo de la presente Tesis Doctoral para medidas por nebulización convencional, medidas por *single cell*-ICP-MS y acoplados a sistemas de ablación láser (LA-ICP-MS). A continuación, se detallan brevemente las principales características de cada uno de los equipos empleados.

□ ICP-MS de tipo cuadrupolo

Se emplearon tres instrumentos diferentes, dos de ellos de la casa comercial Agilent Technologies (modelo 7500ce, y modelo 7900) y otro de la casa comercial Perkin Elmer (modelo 450 X). En el caso de los ICP-MS de Agilent Technologies, ambos están instalados en los laboratorios de la Unidad de Masas de los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo (SCTs), mientras que el equipo de Perkin Elmer está en un laboratorio de la (Universidad de Creta (Grecia) y fue el empleado durante la estancia predoctoral (sc-ICP-MS).

Para los análisis por ICP-MS con nebulización convencional, las disoluciones se introducen mediante una bomba peristáltica al nebulizador de tipo concéntrico (flujo alrededor de 1 mL min^{-1}). Posteriormente pasan a la cámara de nebulización (de cuarzo) que está refrigerada con un sistema tipo Peltier. La antorcha es una sola pieza de cuarzo, con un inyector de 2,5 mm de diámetro interno. Ambos conos de extracción son de Ni y el cuadrupolo tiene un rango de masa de 2 a 260 uma. El detector es un multiplicador de electrones secundarios, el cual puede trabajar en modo analógico o digital. El ICP-MS posee además una celda de colisión/reacción situada antes del cuadrupolo que permite eliminar interferencias poliatómicas mediante la adición de un flujo de gas (He o H₂). Diariamente se realiza una calibración del sistema con una disolución patrón multielemental (con una concentración de $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) con el objeto de optimizar la sensibilidad del sistema (se persigue obtener la máxima señal, controlando la generación de óxidos y los iones doblemente ionizados).

El analizador de masas de tipo cuadrupolo es el más empleado en los instrumentos ICP-MS debido a su bajo coste (en comparación con el resto de los analizadores) y su robustez, lo que permite su implantación como técnica de rutina. El analizador de tipo cuadrupolo consiste en cuatro electrodos cilíndricos dispuestos paralelamente con la misma longitud y diámetro. Para la medida se aplica corriente continua y de radiofrecuencia en los cuatro cilindros, pero con polaridad inversa dos a dos, de tal manera que sólo los iones con una determinada relación m/z atraviesan el analizador sin desviar su trayectoria y alcanzan el detector. Con este tipo de analizadores se alcanza una resolución de masa del orden de 300.

Para solucionar el problema de las posibles interferencias espectrales, este tipo de instrumentos poseen generalmente una celda de colisión/reacción (CRC, *collision, reaction cell*). En este caso en la CRC se introduce un gas de colisión (p.ej., He) o reacción (p.ej., NH_3 , H_2 , CH_4 , u O_2) que permite reducir las interferencias poliatómicas para los analitos de interés. En la presente Tesis Doctoral sólo se ha empleado la celda de colisión para resolver la interferencia del $^{56}\text{Fe}^+$ ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, y $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$) en los análisis por sc-ICP-MS. En este caso, se empleó la celda de colisión en modo He ($4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). En el resto de las aplicaciones donde se monitorizan los elementos de los MNCs (Au, Pt, y Ag), estos no presentan interferencias espectrales y por lo tanto no fue necesario emplear la celda de colisión.

□ Sistema para single cell-ICP-MS

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

El sistema consiste en un micronebulizador concéntrico de alta eficacia (*high efficiency nebulizer*, HEN) de Meinhard® que emplea bajos flujos de inyección (0,05

mL·min⁻¹) lo que es adecuado para medida de muestras de muy poco volumen. El nebulizador está acoplado a una cámara de nebulización de consumo total de pequeño volumen Asperon® (PerkinElmer), alineada con el eje del cilindro formado por la entrada del flujo del gas Ar de arrastre del nebulizador en el plasma (*on-axis*). Además, la cámara permite la introducción de un flujo de Ar adicional (make up gas, Ar) que ayuda a incrementar la eficiencia de transporte minimizando la deposición de células por el impacto en sus paredes. En la Figura **Figura 23** se muestra la imagen, así como una pequeña descripción, del sistema de introducción de muestra empleado para los análisis por sc-ICP-MS.

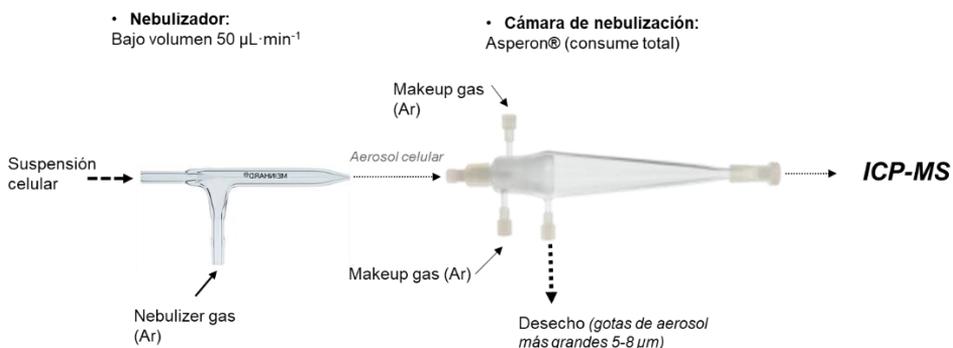


Figura 23: Sistema de introducción de muestra para sc-ICP-MS empleado para la determinación de proteínas en células individuales. En la imagen se muestra el nebulizador de bajo volumen de Meinhard®, y una cámara de nebulización concéntrica Asperon® de consumo total de Perkin Elmer.

□ ICP-MS de sector magnético de doble enfoque

El ICP-MS de doble enfoque Element™ 2 (Thermo Fisher Scientific) es el equipo empleado para llevar a cabo las medias de *imaging* por LA-ICP-MS en secciones de tejidos (Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral).

En este caso, el equipo cuenta con un analizador de masas de sector magnético de doble enfoque, que incluye un electroimán que permite aplicar un campo magnético y un campo eléctrico al haz de iones proveniente del plasma (ver **Figura 24**). En primer lugar, los iones atraviesan un campo magnético perpendicular a su trayectoria

que se encarga de ejercer fuerza lateral para que los iones describan una trayectoria circular cuyo radio de curvatura depende de su relación m/z . Por lo tanto, los iones que tengan la trayectoria adecuada pasarán a través de la rendija intermedia. A continuación, los iones que entran con distinta energía se aceleran adquiriendo energía cinética mediante la acción de un campo eléctrico y actúa además como un filtro energético. Este campo hace que solo los iones con la energía cinética adecuada lleguen a la rendija de salida. Variando el campo magnético en función del tiempo los iones de distinta masa se detectarán de manera secuencial.

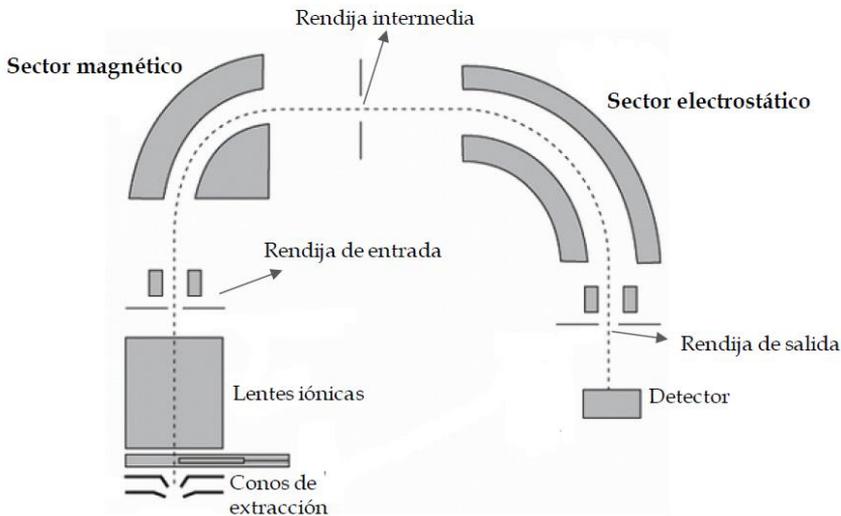


Figura 24: Esquema del sistema ICP-MS de sector magnético.

El poder de resolución de masas (R) de este equipo (i.e., su capacidad para separar iones con relación m/z muy similar) se puede cambiar controlando la apertura de las rendijas de entrada y salida. Así, se puede trabajar en tres tipos de resolución de masas: baja ($R=300$), media ($R=4000$), y alta ($R=10000$). Es importante destacar que una mayor resolución se consigue con una menor apertura de las rendijas, por lo que va acompañada de una disminución en la sensibilidad. En la presente Tesis Doctoral se emplea la baja resolución de masas para las medidas realizadas puesto que los elementos medidos no presentan interferencias (Au, Ag, y Pt).

Al igual que se hace con el ICP-MS de tipo cuadrupolo, diariamente se realiza la optimización de varios parámetros experimentales (p.ej., flujo de Ar, posición de la antorcha, voltajes de las lentes, etc.) para maximizar la sensibilidad, así como controlar la formación de óxidos. Para ello se utiliza una disolución estándar multielemental ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). En el caso del ICP-MS de sector magnético, además de la sensibilidad se ajusta otro parámetro, denominado *mass offset*, para corroborar que todos los elementos que van a ser analizados en la muestra están siendo detectados en el máximo del pico. Para ello se emplea una disolución de los analitos a un nivel de concentración de $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

C.1.2.2. Sistemas de ablación láser

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han usado dos sistemas de ablación láser: un sistema de ablación láser de estado sólido que opera a una longitud de onda de 213 nm (modeloLSX-213 de la casa comercial Teledyne Cetac Technologies) y un sistema de ablación láser tipo excímero ArF que opera a 193 nm (NWR213 de la casa comercial Elemental Scientific). Cada uno de los sistemas de LA se ha acoplado a un ICP-MS diferente. Por un parte el sistema LSX-213 fue acoplado al ICP-MS Element™ 2, mientras que el sistema NWR213 se acopló al ICP-MS tipo cuadrupolo (7900 de Agilent).

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

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

La celda de ablación empleada para los estudios de *imaging* es una celda criogénica (que puede llegar hasta los -20 °C) desarrollada para el sistema LSX-213 en el grupo de investigación⁶. Dicha celda permite controlar la temperatura de la muestra de manera constante durante el análisis (a través de un termopar situado sobre la superficie de la muestra), lo que permite mejorar las prestaciones del análisis en el caso de muestras biológicas (p.ej., mejor resolución lateral al disminuir los efectos térmicos de la ablación)⁷. El volumen total de la celda en el que tiene lugar la expansión del aerosol es de aproximadamente 20 cm³. Además, la entrada de gas tiene una entrada circular de 2 mm de diámetro y la salida de gas tiene forma de embudo, específicamente diseñada para asegurar un flujo de gas laminar dentro de la celda. La celda de ablación está situada sobre una platina motorizada en los ejes X-Y-Z, moviéndose en rangos mínimos de 0,25 μm. El eje Z de la platina es el encargado de realizar el enfoque correcto de haz láser sobre la superficie de la muestra a analizar (el enfoque se realiza con una cámara CCD). Todo el sistema está informatizado y se maneja a través del software DigiLaz III. Para el tratamiento de los datos (i.e., generar imágenes 2D para los analitos detectados en el ICP-MS) se ha empleado el software Image J (National Institutes of Health. NIH, EEUU).

□ Sistema de ablación láser tipo excímero (@193 nm)

Este Sistema láser está basado en un láser excímero (ArF) (Elemental Scientific - ESI). La mezcla de dímeros excitados Argon-Flúor, ArF para la producción del haz láser tipo excímero (NWR193, Elemental Scientific), emplea adicionalmente, N₂ (99.999 % pureza) como gas de purga.

Este sistema de ablación láser de alto rendimiento utiliza una fuente de láser excímero de 193 nm de pulso de nanosegundos (duración de los pulsos < 4 ns) que proporciona mayor potencia de pico para la ablación eficiente de todos los materiales

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

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

para producir pequeñas partículas que pueden ser transportadas e ionizadas eficientemente por el ICP. Esto a su vez conduce a mayor sensibilidad, mayor estabilidad y menor fraccionamiento. La energía del láser es modulable y es posible modificar el porcentaje de energía aplicada a la muestra dependiendo de cada aplicación (energía máxima $12,0 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$). Los diámetros del haz de láser varían desde $2 \mu\text{m}$ a $150 \mu\text{m}$ y permite ablacionar en círculos (IVA) o en cuadrados (XYR) lo que permite un aumento en la flexibilidad de las aplicaciones, la velocidad de barrido puede seleccionarse en un amplio rango de valores ($1-200 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), y la frecuencia de repetición se puede modificar en el rango de $1-200 \text{ Hz}$. La celda de ablación empleada es la Two-Volume2 de ESI (Elemental Scientific). Para el tratamiento de los datos (i.e., generar imágenes 2D para los analitos detectados en el ICP-MS) se ha empleado el Iolite v4 (Universidad de Melbourne, Australia).

C.1.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

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

A diferencia de la microscopía óptica tradicional donde el haz de luz interactúa con la totalidad de la muestra (en toda su profundidad), en microscopía láser confocal, el haz de luz láser es enfocado en una pequeña región, denominada plano focal. Esto permite obtener imágenes de un único plano (de un grosor, μm , fijado), eliminando la luz proveniente de planos contiguos. Para llevar a cabo esta selección del plano, un microscopio de láser confocal dispone de dos diafragmas (*pinhole*), uno entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector. La manera de obtener imágenes es de la siguiente manera: parte de la luz que proviene de la fuente atraviesa el primer diafragma, es reflejada mediante un espejo dicróico, y enfocada en un punto de la muestra mediante la lente del objetivo. La señal emitida, bien sea fluorescencia o luz reflejada, vuelve por el mismo camino óptico, pasa a

través del espejo dicróico y es enfocada a un detector. Delante de dicho detector se encuentra el segundo diafragma, el cual elimina las señales procedentes de la zona fuera de foco. Es importante que los dos diafragmas estén perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos únicamente deje llegar al detector la luz procedente del plano focal (eliminando así las contribuciones del resto de los planos). La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un tubo fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y se almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda.

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

C.1.3. Instrumentación general

- **pH-metro.** Modelo “Five Easy pH/mV” de Mettler Toledo. Se ha utilizado para llevar a cabo el ajuste del pH de las fases móviles y otras disoluciones necesarias para la preparación de las muestras.
- **Balanza analítica** (incertidumbre: 0,1 mg). Modelo ME104 de Mettler Toledo. Se ha utilizado para realizar las pesadas en la preparación de todas

las disoluciones. Para lograr una mayor exactitud y precisión en las medidas, el cálculo de la concentración en cada disolución se llevó a cabo siempre teniendo en cuenta los valores de las pesadas en lugar de trabajar con volúmenes

- **Agitador vórtex.** Modelo V05 Series de LBX Instruments. Se ha utilizado para homogeneizar las disoluciones.
- **Baño de ultrasonidos** (Thermo Fisher Scientific). Se empleó para diferentes propósitos a lo largo de todo el experimental, pero en concreto para mejorar la solubilidad de sales orgánicas, digestión ácida de MNCs, y facilitar la mineralización de las muestras.
- **Microtomo y Criotomo.** Microtomo rotatorio modelo HM325 y criotomo o microtomo criostato modelo HM550 ambos de Thermo Fisher Scientific. Se emplearon para llevar a cabo los cortes micrométricos de tejidos oculares FFEP, y los cortes de los patrones de gelatina en condiciones criogénicas (-20 °C), respectivamente.
- **Centrífuga.** Se han empleado diferentes modelos y tamaños de centrifugas dependiendo del volumen de muestra a centrifugar. Modelo 5415R de Eppendorf.
- **Estufa de laboratorio** (Mettler).
- **Incubador.** Modelo 311 de Thermo Fisher Scientific. Se ha empleado para el mantenimiento óptimo de las líneas celulares humanas de EPR, a 37 °C de temperatura y un flujo de 5% de CO₂.
- **Cabina de flujo laminar.** Modelo Testlar Bio II A/G (Testlar). Se empleó en los experimentos con cultivos celulares para disponer de un espacio con las condiciones óptimas de seguridad, proporcionando una zona de aire limpio.
- **Autoclave de laboratorio.** VARIOKLAV® (Thermo Fisher Scientific). Se ha empleado para esterilización de material y reactivos empleados en los experimentos con cultivos celulares.

- **Hemocitómetro cámara Neubauer** (Sigma Aldrich). Se empleó para el conteo celular.
- **Microscopios ópticos**. El microscopio de transmisión modelo DM IL LED de Leica se ha utilizado para llevar a cabo el conteo de las células y el control diario de las mismas. El microscopio de epifluorescencia (modelo Leica DM6000) equipado con una cámara DFC310 Fx Leica y el software “Advance Fluorescence AF6000 software” (Leica Microsystems CMS GMBH) se utilizó para obtener las imágenes de inmunofluorescencia.
- **Fluorímetro picodrop™** (Thermo Fisher) RNA per cell lysate aliquot.
- **Thermociclador de 96 pocillos Veriti™ HID y 7500 RT-PCR system** (ambos de Applied Biosystems™, Thermo Fisher) usados para llevar a cabo la retranscripción inversa de ARN a cDNA y para la PCR cuantitativa, respectivamente.
- **Lectores de placas**. Se han empleado dos modelos de lectores de placas de absorbancia: modelo ELX800 (BioTek) y modelo 2030 VICTORTM X5 (PerkinElmer). Ambos están diseñados para realizar automáticamente análisis de absorbancia de los productos resultantes en las aplicaciones basadas en ELISA. El lector puede medir la densidad óptica de las soluciones en microplacas de 6, 12, 24, 48 ó 96 pocillos. El rango de longitud de onda es de 400 nm a 750 nm.

C.2. MATERIALES Y REACTIVOS

C.2.1. Material general

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

- **Micropipetas de volumen ajustable**. Se han empleado micropipetas con diferentes volúmenes: 0,5-10 μ L; 10-20 μ L; 20-200 μ L; 100-1000 μ L; y 0,5-5

mL, todas ellas de Eppendorf. Se emplearon cada una de ellas con sus correspondientes puntas de plástico desechables.

- **Pipetas Pasteur** de 1,5 y 3 mL de volumen (Thermo Fisher Bremen).
- **Guantes de nitrilo** (LLG).
- **Tubos.** Se han empleado tubos estériles de 12 mL, tubos de centrifuga de 15 mL, y tubos de 0,5, 1,5 y 2 mL (Eppendorf).

Adicionalmente, en los Capítulos I y II se emplearon como soporte para realizar un inmunoensayo en placa (con detección por microscopía de láser confocal), así como para depositar las secciones de tejidos oculares en los que se realiza la IHC, portaobjetos de microscopio recubiertos en su superficie con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences).

C.2.1.1. Material empleado en los cultivos celulares

A continuación, se recogen el material general empleado específicamente en el laboratorio para trabajar con los cultivos celulares (en este caso se trata siempre de materiales esterilizados).

- **Frascos de cultivo celular** (*flask*) T25, T75 y T125 (Thermo Fisher Scientific).
- **Placas de cultivo celular** de 6, 12, y 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific).
- **Cámaras de cultivo celular** en portaobjetos de Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Thermo Fisher Scientific) para cultivos celulares medidos por LA-ICP-MS y microscopía confocal.
- **Propipeta automática** con sus correspondientes pipetas Pasteur de plástico de 1, 5, 10 y 25 mL de Eppendorf.
- **Jeringas de plástico y filtros de jeringa** estériles con un tamaño de poro de 0,22 μm de Millipore® Merck.

C.2.2. Reactivos generales

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

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

Reactivos para la síntesis de MNCs

- Sales metálicas precursoras: H_2PtCl_6 (8% en peso líquido; Sigma-Aldrich), $\text{AuCl}_4\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99% sólido; Sigma-Aldrich), y AgNO_3 (99.9% sólido; Alfa Aesar, Thermo Fisher).
- Ligando estabilizador tiolado (-SH): ácido lipoico (>98% sólido; Across Organics).
- Agente reductor fuerte: NaBH_4 (98% sólido, Sigma-Aldrich).
- Otros reactivos necesarios: NaOH (Sigma-Aldrich), y propan-2-ol (Fisher Scientific).

Reactivos para la bioconjugación (reacción de la carbodiimida)

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

- 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (98% sólido; Across Organics).
- N-hidroxisuccinimida (NHS) (> 98% sólido; Sigma-Aldrich).

- Disolventes empleados durante la bioconjugación de los AgNCs: Base TRIS (> 99% sólido; Sigma-Aldrich), ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) (Panreac AppliChem), y L-glutatión reducido (>98% sólido; Sigma-Aldrich).
- Ácidos: ácido nítrico (HNO₃ 67-69%, análisis de trazas; VWR chemicals), y ácido clorhídrico (HCl 37%, VWR chemicals)

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

- **Disolución multielemental** (contiene Li, Co, Y, Ce, y Tl, entre otros elementos con una concentración de 1 ng·g⁻¹, Agilent Technologies). Se emplea para calibración diaria del equipo ICP-MS para obtener unas condiciones óptimas de sensibilidad (monitorizando las m/z: ⁷Li⁺, ⁸⁹Y⁺, y ²⁰⁵Tl⁺), y minimizar la formación de óxidos (CeO⁺/Ce⁺, <0,2%) y dobles cargados (Ce⁺⁺/Ce⁺, <0,2%). También es importante la monitorización del ⁵⁹Co⁺ para optimizar el flujo de gas de colisión (He) o reacción (H₂) para eliminar interferencias poliatómicas.
- Para la optimización diaria del sistema láser se emplea un vidrio de referencia **SRM NIST 612** (National Institute of Standards & Technology, NIST) para garantizar una elevada sensibilidad (monitorizando las m/z: ⁵⁹Co⁺, ¹³⁹La⁺, ²³²Th⁺, y ²³⁸U⁺), una buena estabilidad de la señal (desviación estándar relativa por debajo del 4%), ausencia de efectos de fraccionamiento (relación ²³⁸U⁺/²³²Th⁺ ~1), y minimizar la formación de óxidos (ThO⁺/Th⁺ < 0,2%).
- **Patrones ácidos inorgánicos** para elaborar las rectas de calibración externa para la cuantificación por ICP-MS. Se emplean disoluciones con una concentración de partida de 1000 µg·mL⁻¹ para Pt, Ag, Au, Ir, Rh, y Fe de Merck Millipore.
- Para llevar a cabo los análisis en disolución empleando el ICP-MS por nebulización convencional, tanto las muestras biológicas como los patrones inorgánicos son previamente preparados en disoluciones acuosas con

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

- **Gases** suministrados por Air Liquide: Ar (99,999 % pureza) como gas de nebulización para generar el plasma del ICP-MS, He (99,999 % pureza) como gas de arrastre en ablación láser, así como como gas empleado en la celda colisión/reacción del ICP-MS de tipo cuadrupolo. Reactivos empleados en los cultivos celulares
- Medio de cultivo DMEM/F12 completo para el cultivo y crecimiento de la línea celular HRPEsv40. Medio Eagle de Dulbecco modificado/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12, Merck) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (FBS, de Gibco™, Thermo Fisher Scientific), y 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (ambos de Gibco™).
- Medio de cultivo libre de suero para aplicar los tratamientos celulares. Medio de cultivo sin suero CD hybridoma (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10 mM de Glutamina (Gibco™), y 1% (v/v) penicilina/estreptomicina.
- Tripsina 0,25% AEDT (Gibco™) para liberar las células adheridas a las placas de sembrado.
- Trypan Blue (0,4% de Gibco™) para la tinción de células vivas para su conteo.
- Fijación celular. Se emplea 16% formaldehído libre de metanol (Fisher Scientific).
- PBS 10mM, 1x (Tampón fosfato salino, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 2 mM KH_2PO_4 , todos de Sigma Aldrich), filtrado y estéril para las etapas de lavado de las células.

C.2.2.3. Reactivos empleados en inmunoensayos, IHC e ICC

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

C.3. MUESTRAS BIOLÓGICAS

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

□ Suero humano

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

□ Tejidos oculares

En la aplicación del Capítulo II se emplean secciones de tejido de ojos humanos que se obtuvieron <24 h *post mortem* a través del National Disease Research In-

terchange (Filadelfia, EE.UU.) y del Eye Depository del UCL Institute of Ophthalmology (Londres, Reino Unido). Los procedimientos se ajustaron en ambos casos a los principios de la Declaración de Helsinki. La preparación de los tejidos oculares empleados en todos los casos fue la siguiente: el órgano es fijado con formalina y embebidos en parafina (FFPE) siguiendo los protocolos convencionales⁸. Posteriormente, se producen las secciones de tejido ocular con grosores de 5 y 10 μm de espesor. Para su obtención, los bloques de FFPE son laminados usando un microtomo (ajustando el grosor requerido para el corte) y dichos cortes son colocados sobre portaobjetos de microscopio recubiertos en su superficie de poli-L-lisina para mejorar su adhesión. Las muestras ya preparadas son guardadas a temperatura ambiente hasta ser usadas.

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

En los Capítulos III y IV se utilizó una línea de células inmortalizadas de EPR humano (línea celular HRPEsv40) que ya había sido establecido previamente en el grupo de investigación. Este cultivo había sido obtenido de un cultivo primario de células de EPR provenientes del ojo de un donante *post mortem* de 42 años de edad sin ninguna patología ocular relevante. Posteriormente, las células epiteliales de la retina se inmortalizaron mediante transfección con el virus de tipo salvaje SV40⁹. Las células HRPEsv40 se mantienen congeladas (% DMSO) a -80°C hasta su uso. En la sección de procedimientos experimentales se detalla el protocolo de descongelación y expansión de la línea celular.

C.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A lo largo de la Tesis Doctoral hay varios procedimientos experimentales que son similares en varios Capítulos o que se repiten en varios de ellos. A continuación,

⁸ Sadeghipour A., Babaheidarian P. (2019) Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. In: Yong W. (eds) Biobanking. Methods in Molecular Biology, vol 1897. Humana Press, New York, NY

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

se describen los protocolos experimentales más utilizados a lo largo de la Tesis Doctoral, explicando en cada caso en qué Capítulos son aplicados y con qué objetivo.

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

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

La estrategia *bottom-up*, ejemplificada en la **Figura 25**, en la que se basan las síntesis de AuNCs, AgNCs, y PtNCs, se puede resumir de la siguiente manera: el metal en estado de oxidación elevado (M^{++}) (Au (III), Ag (I), y Pt (IV)) es reducido mediante el empleo de un agente reductor, el borohidruro de sodio, en presencia de un agente estabilizador (en nuestro caso un ligando tiolado, como el ácido lipoico - AL). De esta manera los átomos del metal reducido (0, I) se unen por interacciones metal-metal para formar un núcleo metálico el cual, tras su crecimiento, se protege gracias al ligando tiolado (AL) que presenta una fuerte afinidad por la superficie metálica (afinidad S-M)¹⁰ protegiéndolo frente a la oxidación y deformación.

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

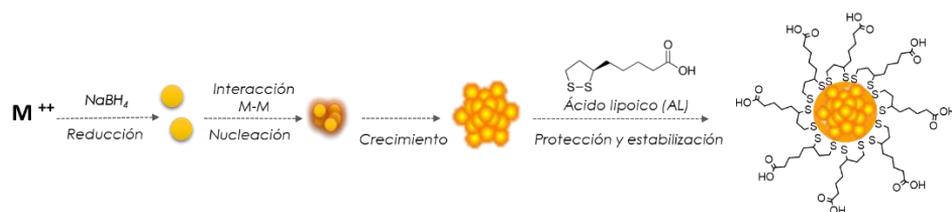


Figura 25: Esquema general de la síntesis de MNCs siguiendo la estrategia bottom-up. En el ejemplo se emplea el ácido lipóico como ligando tiolado y agente estabilizante.

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

- **Síntesis de AuNCs (Capítulo II).** Para la síntesis de los AuNCs se siguió el protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.¹¹. En un vial ámbar protegido de la luz directa, 30 μmol de AL se disuelven en 20 mL de agua desionizada en la que previamente se añaden 50 μL de NaOH 2M (el medio básico mejora su disolución, aunque se hace necesario aplicar un baño de ultrasonidos para su completa homogeneización). Posteriormente se añaden a la mezcla 200 μL de una disolución acuosa de la sal precursora (50 mM de $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$). Después de 5 min en agitación magnética, se añaden muy lentamente (gota a gota), y con ayuda de una jeringa, 400 μL de una disolución 50 mM de NaBH_4 (en isopropanol, para reducir la fuerza del agente reductor). Tras el inicio de la reacción, se deja a temperatura ambiente (21°C) durante 15 horas bajo agitación magnética constante.
- **Síntesis de AuNCs (Capítulos III y IV).** El protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.¹¹ fue optimizado para reducir la dispersión de tamaños de los AuNCs para su aplicación a la determinación de proteínas en células individuales. En este caso, el protocolo de síntesis consta de los siguientes

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

pasos: (1) se realiza la síntesis en un balón de vidrio de 50 mL en lugar de viales cilíndricos para mejorar la homogenización de la mezcla, (2) se reducen las rpm de agitación de 600-700 a 400 rpm durante la reacción, (3) se reducen las horas de síntesis de 15 h a 6 h, y (4) se añade una etapa posterior de envejecimiento donde la síntesis de AuNCs es calentada durante 2 h a 50 °C con el objetivo de inducir un reajuste de los átomos que forman los diferentes núcleos metálicos y favorecer la formación de AuNCs más estables¹².

- **Síntesis de AgNCs (Capítulo II).** Este protocolo fue previamente descrito por Valencia et al.¹³. En este caso, 81,06 mg de AL se disuelven en el mismo volumen de agua desionizada (20 mL) basificados con 240 µL de NaOH (2 M). Posteriormente, se añade 1 mL de una disolución acuosa de la sal precursora (25 mM AgNO₃). Después de 5 min, se añaden 2 mL de una disolución acuosa del reductor (NaBH₄, 150 mM). La reacción se deja durante 21 h en agitación constante y a baja temperatura (9 °C).
- **Síntesis PtNCs (Capítulo I y II).** En este caso, 10,5 mg de AL se disuelven en 10 mL de agua desionizada, en la que previamente se han añadido 30 µL de una disolución acuosa de NaOH 2M. A continuación, se añade la sal precursora (200 µL de H₂PtCl₆ 50 mM) a la mezcla y se deja homogeneizar durante 5 min para posteriormente añadir gota a gota 400 µL de NaBH₄ 25 mM. La reacción se inicia y se deja a temperatura ambiente durante 15 h en agitación magnética constante. En el Capítulo I se describen todas las optimizaciones y estudios realizados con la síntesis de PtNCs por ser en este caso la primera vez que se sintetizan.

¹² A. Lores-Padín, P. Menero-Valdés, A. Rodríguez-Penedo, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Synthesis of size monodisperse water-soluble metal nanoclusters for protein quantification by elemental mass spectrometry, *Mater. Proc.* 4, (2021) 43.

¹³ E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro. Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim. Acta* 186, (2019) 429.

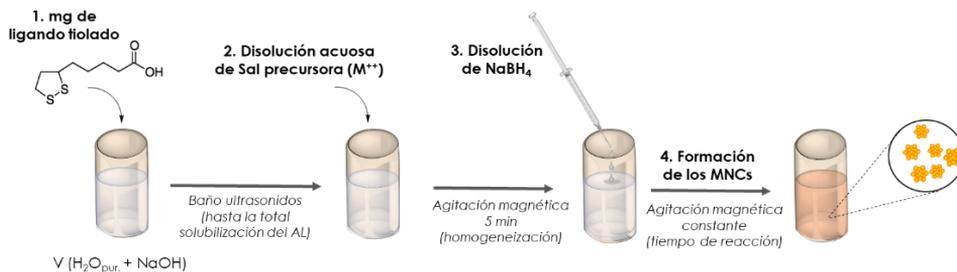


Figura 26: Esquema de las etapas requeridas para la síntesis de AuNCs, AgNCs y PtNCs.

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

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

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

C.4.1.2. Almacenamiento de los MNCs

Los AuNCs son los MNCs más estables y pueden ser guardados ya purificados (en agua o tampón PBS) a temperatura ambiente. Sin embargo, los PtNCs, tal y como

EXPERIMENTAL

se describe en el Capítulo I, son más estables purificados y conservados en agua desionizada. Por otro lado, los AgNCs deben ser guardados a 8-4°C en la nevera, siempre protegidos de la luz, y sin purificar. Los AgNCs se purifican sólo previo a su uso (son más inestables y fotosensibles)¹³.

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

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

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

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

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

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

El protocolo seguido para la digestión de los MNCs es el siguiente: 50 μL de una disolución que contiene MNCs (disolución concentrada) se disuelve con 200 μL de una disolución oxidante (agua regia o ácido nítrico, según el metal de los MNCs). A continuación, la disolución se lleva a ultrasonidos durante 20 minutos. Finalmente, el digerido se disuelve en agua ultrapura o HNO_3 al 1% hasta alcanzar una concentración del metal adecuada para su medida por ICP-MS (del orden de los $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). En dicha disolución se ajusta el porcentaje de ácido en el medio para que esté entre el 3-5% (v/v). El agua regia ($\text{HNO}_3\text{:}3\text{HCl}$) es necesaria para la oxidación de metales nobles como el AuNCs o PtNCs, mientras que para AgNCs es suficiente con emplear HNO_3 (evitando así la posible formación de precipitados de $\text{AgCl}_{(s)}$).

Este protocolo de digestión no solo es empleado para determinar el contenido metálico en la disolución de síntesis de los MNCs (para calcular el rendimiento de la síntesis) o de la inmunosonda Anti-h-Ab:MNCs (para calcular el factor de amplificación), sino también en todas aquellas aplicaciones en las que se usan los MNCs como marcas para detección elemental de proteínas en muestras en disolución.

C.4.3. Caracterización de los MNCs

Llevar a cabo una buena caracterización de los MNCs no es sólo requerida para estudiar la nanoestructura en sí, sus características y propiedades, sino que es también necesaria para realizar la reacción de bioconjugación a biomoléculas de reconocimiento. En el caso de la presente Tesis Doctoral es por tanto necesario realizar una completa caracterización de los MNCs para disponer de las inmunosondas metálicas. La estructura cristalina y tamaño, así como la concentración de metal en la síntesis proporciona la información suficiente para conocer la molaridad de los MNCs. A continuación, se resumen los procedimientos llevados a cabo para las diferentes caracterizaciones de los MNCs.

C.4.3.1. Caracterización óptica

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

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

C.4.3.2. Caracterización morfológica y estructural

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

Por otra parte, se puede conocer la estructura cristalina a partir de la medida de la distancia entre planos atómicos (distancia interplanar o *dL-spacing*). Si la resolución de la micrografía lo permite se miden las distancias directamente. Sin embargo, normalmente se suelen obtener los patrones de difracción electrónica en un área localizada (SAED), es decir haciendo incidir el haz de electrones en la zona de la imagen

concreta (MNCs). De esta manera, dependiendo del patrón de anillos resultante se puede distinguir entre: (a) estructura no cristalina o amorfa (anillos difusos), (b) estructura cristalina (puntos brillantes), o (c) estructura polianocristalina (pequeños puntos que forman varios anillos brillantes de distinto diámetro)¹⁴. Adicionalmente, a partir del patrón de difracción SAED se puede averiguar qué tipo de celda cristalina forma el MNCs midiendo los $dL\text{-spacing}$ de la estructura. Para ello, se sigue el siguiente procedimiento: (i) medir el diámetro de cada anillo ($2R$, nm⁻¹) (desde un punto brillante hasta el opuesto pasando por el centro del anillo) utilizando el software Fiji ImageJ de procesamiento de imágenes, (ii) obtener el valor del radio, R , (con respecto al punto central); $R = d/2$ (nm⁻¹), (iii) obtener la distancia interplanar ($dL\text{-spacing}$), como $1/R$ (nm), (iv) se repite este protocolo para todos los anillos resultantes del SAED, y (v) se comparan los valores $dL\text{-spacing}$ con los valores recogidos en bases de datos¹⁵. Por comparación, se puede determinar la celda unidad que forma la nanoestructura.

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

¹⁴ Mendoza-Ramírez, M., Avalos-Borja, M. Nanoestructuras y su caracterización por medio de microscopía electrónica de transmisión; ciencia y arte. Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología, 13, (2020), 61-78.

¹⁵American Mineralogist Crystal Structure Database. <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>

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

El rendimiento de la síntesis se puede estimar como la relación entre la concentración de metal que queda en la suspensión purificada de MNCs y la concentración teórica de metal añadido en la síntesis (i.e., concentración de metal en la “disolución madre”). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra cómo se realiza el cálculo para obtener el rendimiento de la reacción de síntesis de un determinado MNCs. Para ello, tras la purificación empleando unidades de ultrafiltración por centrifugación, se recoge la suspensión retenida en la parte superior del filtro del Amicon (que contiene los MNCs purificados) y se mide su contenido metálico por ICP-MS. Paralelamente, se mide el contenido metálico de la “disolución madre” de la sal precursora del metal de la que se parte para realizar la síntesis de los MNCs. Las muestras metálicas son digeridas siguiendo el protocolo de digestión recogido en la **Sección C.4.2**, previa a su introducción en el sistema ICP-MS. La concentración de metal es determinada realizando un calibrado externo empleando un estándar del metal (y empleando además un patrón interno adecuado). Para determinar Au y Pt se emplea Ir como patrón interno, mientras que para la Ag se emplea Rh como patrón interno.

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

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

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

La bioconjugación de los MNCs recubiertos con terminaciones carboxílicas (-COOH), como es el caso de los empleados en esta Tesis Doctoral, con anticuerpos

específicos (con varias terminaciones $-\text{NH}_2$) se realiza mediante la estrategia basada en la química de la carbodiimida (EDC) en combinación con N-hidroxisuccinimida (NHS). En dicha reacción se produce la formación de un enlace amida entre el nano-material y la biomolécula de reconocimiento¹⁶, tal y como se describe en la **Figura 27**.

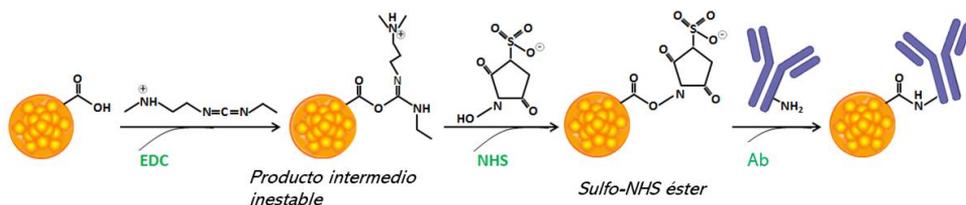


Figura 27: Esquema general de la reacción de la carbodiimida para establecer un enlace amida entre el grupo carboxílico del MNCs y el grupo amino del Ab (esquema modificado de la ref¹⁶)

Las etapas del protocolo general para llevar a cabo la bioconjugación se resumen de la siguiente manera, teniendo en cuenta que el volumen añadido de la suspensión de MNCs es diferente dependiendo del metal (los volúmenes están recogidos en la **Tabla 2**). En un tubo eppendorf de 1,5 mL, se mezclan 100 μL del Ab específico (tipo IgG, 150 kDa de masa molecular) en una concentración de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (en PBS 1x) con el volumen estipulado de la síntesis de MNCs (Anti-h-Ab:MNCs en la relación molar óptima para cada bioconjugado, **Tabla 2**). La mezcla se agita vigorosamente con el vórtex y tras 10 minutos, se añaden 10 μL de una disolución de EDC y NHS en PBS 1x en una relación molar de Ab:EDC:NHS de 1:1500:1500. Se deja reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación vigorosa en el vórtex. Finalmente, se procede a su purificación siguiendo el mismo protocolo que para los MNCs (**Sección C.4.1**). Sin embargo, en el caso de los bioconjugados se emplean Amicones de tamaño de poro mayor (100 kDa). Una vez purificadas las inmunosondas metálicas, desechando el exceso de MNCs filtrado en el Amicon, estas son almacenadas en la nevera a 4-9°C hasta su posterior uso. Es necesario tener en cuenta que las disoluciones son hechas en tampón fosfato (PBS 1x) 10mM, pH 7,4, para las bioconjugaciones empleando AuNCs, y PtNCs. Sin embargo, los AgNCs una vez

¹⁶ Nieto, C.; Vega, M.A.; Martín del Valle, E.M. Trastuzumab: More than a Guide in HER2-Positive Cancer Nanomedicine. *Nanomaterials* 10, (2020) 10, 1674.

EXPERIMENTAL

purificados se disuelven en tampón Tris-EDTA con glutatión en una concentración de 3 mM (**Tabla 1**). Así mismo, la disolución de EDC:NHS debe hacerse en tampón TRIS-AEDT¹³. Finalmente, una vez terminada la reacción de bioconjugación y purificadas las inmunosondas, estas se llevan a volumen con PBS 1x (AuNCs, PtNCs, y AgNCs).

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

MNCs	AuNCs	AgNCs	PtNCs	Aging-AuNCs
Diámetro promedio (nm)	2.2	2.9	1.5	1.9
[MNCs]_{sint} (moles MNCs·L⁻¹)	1,57·10 ⁻⁶	1,06·10 ⁻⁶	6,75·10 ⁻⁶	1,99·10 ⁻⁶
Relación molar anti-h-Ab:MNCs	1:3	1:3	1:20	1:3
V_{síntesis bioconjugación} (μL)	212	188	198	167

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

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

$$N = \frac{\text{(a) moles de átomos de metal}}{\text{(b) moles de moléculas de Ab disponible}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para estimar el número de átomos de metal (a), se debe conocer la concentración metálica en la inmunosonda. Para ello, tras la purificación del bioconjugado, este es digerido (ver protocolo de digestión ácida en la **Sección C.4.2**) y se determina la concentración del metal por ICP-MS mediante una calibración externa con patrón interno, de manera similar a como se realiza para la caracterización de los MNCs.

Paralelamente, se debe cuantificar la concentración de Ab que tras su bioconjugación con los MNCs y purificación sigue disponible para reaccionar con el anti-

geno de interés (b). Para ello, se diseña un inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo, donde la inmunosonda metálica es el analito a cuantificar. Se realiza un calibrado externo empleando un Ab IgG genérico. Este Ab ha de ser puro, de concentración conocida, y producido en el mismo animal (mismo *Host*) que el Ab específico de la inmunosonda. De esta manera se determina la concentración de Ab que hay en la inmunosonda, incubando con un Ab secundario que se enlaza al antisero primario (inmunosonda o IgG patrón). El diseño del inmunoensayo está resumido en la **Figura 28** y a continuación se describen las etapas del mismo: (1) tapizado de la placa con el IgG genérico (patrón de calibración entre 0-3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o con el analito en una concentración teórica de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (inmunosonda o Ab sin bioconjugador) durante 6 h a 37°C, (2) bloqueo con BSA 1%, 2 h a temperatura ambiente, (3) incubación del Ab secundario marcado con enzima HRP, 2 h a temperatura ambiente, (3) adición del sustrato, Kit TMB, (4) parada de la reacción enzimática añadiendo 50 μL de una disolución de H_2SO_4 2M, y (5) medida de la absorbancia a 450 nm en el lector de placas del producto resultante.

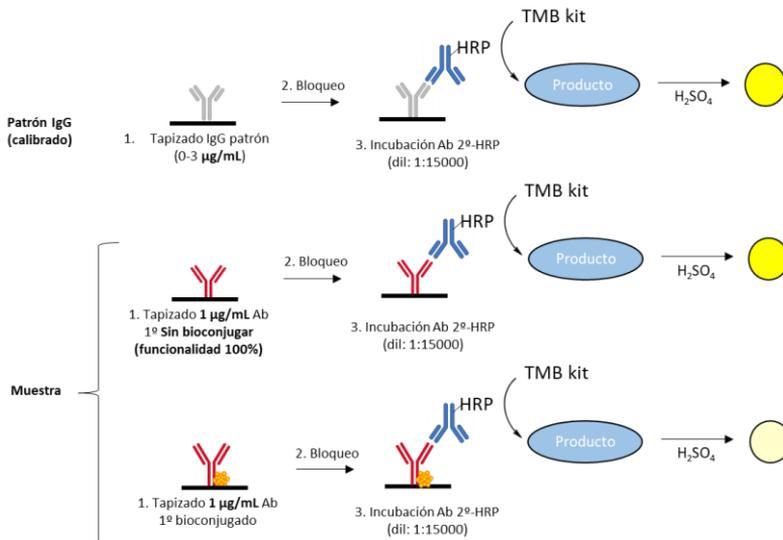


Figura 28: Esquema donde se resumen las diferentes etapas del inmunoensayo ELISA indirecto no competitivo diseñado para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas metálicas (*Anti-b-Ab:MNCs*).

C.4.6. Protocolo de desparafinación de los tejidos FFPE

Los cortes de tejido ocular empleados como muestras en el Capítulo II de la Tesis Doctoral, tal y como se ha descrito en la **Sección** [Error! No se encuentra el origen de la referencia. del Experimental, están fijados en formalina y embebidos en parafina. De cara a llevar a cabo la ICH (sea esta para detección elemental o fluorescente), las secciones de tejidos deben ser previamente desparafinadas para permitir la penetración del Ab y que la reacción inmunológica tenga lugar. Este proceso de desparafinación empleando xilol, necesita de una rehidratación posterior del tejido. Las etapas del protocolo y sus tiempos se resumen en la **Tabla 3** Los portaobjetos donde las secciones de tejido están adheridas se introducen cuidadosamente en disoluciones de xilol (x2 veces) y, a continuación, se hidratan en una cadena de alcoholes decreciente desde alcohol absoluto hasta agua (**Tabla 3**). Una vez finalizado el proceso, el tejido estaría listo para realizar el protocolo de IHC con la inmunosonda metálica (Anti-h-Ab:MNCs).

Tabla 3: Protocolo de desparafinación e hidratación empleada para secciones de tejido ocular de bloques FFPE.

Disolvente	Desparafinación		Rehidratación				
	XILOL (1)	XILOL (2)	EtOH _{Abs}	EtOH _{95%}	EtOH _{80%}	EtOH _{70%}	H ₂ O _{des.}
Tiempo min ⁻¹	10	5	10	3	3	3	3

C.4.7. Protocolos de cultivo y tratamiento de la línea celular HRPEsv40

C.4.7.1. Descongelación y expansión de la línea celular.

El criovial (almacenado a -80°C) donde están las células de la línea celular inmortalizada HRPEsv40 se descongela rápidamente dejándolo en el incubador o en el baño a 37°C. Ya bajo condiciones estériles en campana de cultivos de flujo laminar, se recoge el contenido celular del criovial y se lleva en un eppendorf de 15 mL, donde se lava el pellet celular para eliminar el porcentaje de DMSO (añadido para la congelación) adicionando 9 mL de medio completo suplementado con un 10% de

FBSi y un 1% de P/S (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S). Se centrifugada a 100 g durante 5 minutos y tras aspirar el medio, el pellet celular es resuspendido de nuevo en 5 mL de medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S). La suspensión celular está así lista para su siembra en los *flask* de cultivo (T25 o T75).

La línea celular se cultiva a 37°C, 5% CO₂ en el incubador, hasta que las células alcanzan una confluencia suficiente (80-90% de la superficie del *flask* ocupada por células). Para expandir la línea celular, es decir obtener un número mayor de células, cuando las células están confluentes en un *flask* se debe retirar el medio (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S) y tras un lavado con de PBS 1x, se tripsinizan añadiendo 1 mL de 0,25% Tripsina-AEDT, se incuba a 37°C durante 2-3 min hasta visualizar que las células se han despegado de la superficie (se observan las células con el microscopio de transmisión). A continuación, se añaden 4 mL de medio completo para bloquear la tripsina y evitar la lisis celular. La suspensión celular es sembrada en un nuevo/o varios *flask* (T75 o T125) añadiendo 15 mL de medio completo nuevo y 3 mL de la suspensión de células recién recolectadas. Este protocolo se repite hasta alcanzar el número de células deseado para llevar a cabo el experimento. Es necesario tener en cuenta que cada vez que se tripsinizan las células y se siembran en un nuevo *flask*, esto se considera un pase de la línea celular. Para la línea HRPEsv40 se ha observado que las células pueden durar en torno a 25-30 pases (a partir de ese momento las células dejan de proliferar).

C.4.7.2. Conteo celular manual con el hemocitómetro

Conocer el número de células en una determinada suspensión es necesario entre otras cosas para sembrar el número adecuado de células en cada *flask* (dependiendo del ensayo programado el número puede variar). Por ello, una vez tripsinizadas las células y recogidas en un tubo falcon con medio completo, las células son lavadas con PBS 1x para eliminar células muertas (centrifugación a 100g x 3 min y posterior extracción del sobrenadante) y el pellet se resuspende en PBS 1x (homogeneizándolo cuidadosamente). El conteo se realiza empleando un hemocitómetro (cámara Neubauer) donde se depositan 10 µL de una mezcla previamente preparada de

EXPERIMENTAL

1:1 (v/v) de la suspensión celular (homogeneizada) con tinte Trypan-blue. Bajo el microscopio de transmisión se cuentan manualmente las células visualizadas dentro de los límites de los 8 cuadrantes del hemocitómetro (4 parte superior y 4 parte inferior) tal y como se muestra en la **Figura 29**. En la Figura, el número 1 marca cada uno de los 4 cuadrantes (superior o inferior). Teniendo en cuenta que el área de cada cuadrante de la cámara Neubauer empleada es de 1 mm^2 y el espesor del cuadrante de $0,1 \text{ mm}$ (esto varía para cada tipo de cámara), el volumen resultante de cada cuadrante es de $0,1 \text{ mm}^3 = 1 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$. Por tanto, tal y como se describe en el cálculo de la **Figura 29** el valor promedio de número de células por cuadrante debe ser multiplicado por 2 (para tener en cuenta la dilución 1:1 del Trypan blue) y multiplicado por $1 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$. De este modo, el valor resultante es la concentración de células por mL de disolución en la suspensión.

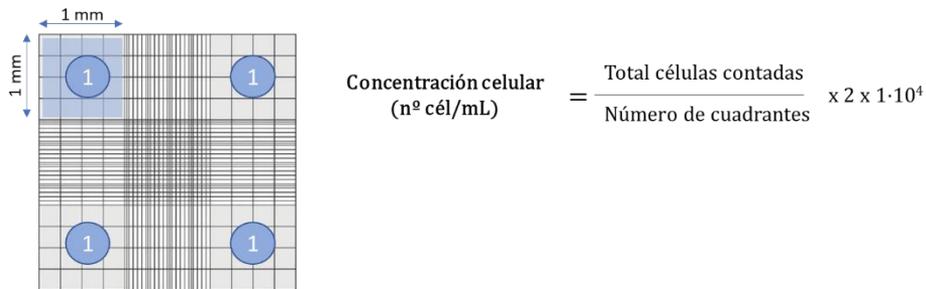


Figura 29: Esquema de los cuadrantes de la cámara Neubauer y explicación del cálculo de la concentración celular.

C.4.7.3. Tratamiento inflamatorio de las células HRPEsv40 con Interleuquina 1α

Aunque el número de células requerido, su estado (en suspensión o fijadas en placa), o incluso los soportes en los cuales son sembradas son diferentes dependiendo del ensayo a realizar, el procedimiento de cultivo, así como el tratamiento inflamatorio empleando ha sido el mismo para los diferentes estudios llevados a cabo con las células HRPEsv40 (sc-ICP-MS y LA-ICP-MS).

Las células inmortalizadas HRPEsv40 se cultivan a 37°C en incubadora con un 5% de CO_2 utilizando el medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S).

Una vez que las células alcanzan el 80% de confluencia, se lavan con PBS 1x y se les cambia el medio a un medio libre de suero, Hibridoma™ suplementado con 5% de L-glutamina y 1% de P/S, y se dejan en el incubador durante 24 h para que las células se adapten al nuevo medio. Transcurrido ese tiempo las células HRPEsv40 cultivadas son tratadas con una citoquina proinflamatoria, la interleuquina 1 α (IL1 α), con una concentración de 100 ng·mL⁻¹ durante 48 h¹⁷. Paralelamente, siempre se realiza un control celular, es decir, otro *flask* o pocillo donde las células de HRPEsv40 no son tratadas con la citoquina, es decir, se mantienen en el medio libre de suero Hibridoma™ (5% de L-glutamina y 1% +P/S). Los tratamientos y tiempos específicos a los que se sometió la línea celular hasta encontrar el adecuado, se encuentran descritos en el Capítulo III.

C.4.8. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR por sus siglas en inglés, *reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction*) es una técnica altamente empleada en medicina molecular, biotecnología, microbiología y diagnóstico, y se ha convertido en el método de referencia para la cuantificación de ARN mensajero (ARNm)¹⁸. Es notable su amplio uso en el estudio de los niveles de expresión de genes codificantes de proteínas de interés¹⁹ (secuencias nucleotídicas específicas) o para la detección sensible de microRNA (biomarcador de enfermedades)^{20,21}.

¹⁷ L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, M. Garcia, S. Ghosh, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, The stoichiometric transition from n6Cu1-Metallothionein to Zn7-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 28456e28469.

¹⁸ T. Nolan, R.E. Hands, S.A. Bustin. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 1, (2006), 1559-1582.

¹⁹ M. Sato, T. Abe, M. Tamai. Analysis of the Metallothionein Gene in Age-Related Macular Degeneration. *Jpn. J. Ophthalmol.*, 44, (2000) 115-121.

²⁰ M. Szemraj, A. Bielecka-Kowalska, K. Oszejca, M. Krajewska, R. Goś, P. Jurowski, M. Kowalski, J. Szemraj. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers of AMD. *Med Sci Monit.* 21, (2015) 2734-2742.

²¹ Thorsen M, Blondal T, Mouritzen P. Quantitative RT-PCR for MicroRNAs in Biofluids. *Methods Mol Biol.* 1641, (2017), 379-398.

En esta técnica el ARNm es transcrito en ADN complementario mediante la enzima transcriptasa inversa. Posteriormente, se lleva a cabo la amplificación de millones de veces del gen (diana) mediante el empleo de cebadores (*primers*) complementarios a esa secuencia, para finalmente ser identificados con elevada sensibilidad y especificidad por medio de sondas fluorescentes (p.ej. TaqMan®)²². Esta técnica es de gran ayuda para conocer mediante cuantificación relativa las diferencias de expresión de un gen bajo diferentes condiciones. Sin embargo, la precisión de la qRT-PCR se ve muy afectada por la estabilidad de los genes de referencia (conocidos como genes *housekeeping*) que se emplean para la normalización (cuantificación relativa). Éstos se pueden ver altamente alterados por el entorno y las condiciones. Por definición el gen de normalización debe ser elegido por mostrarse inalterable (estable) en el tipo de muestra y bajo las condiciones de estudio. Esta limitación hace que sea crítico una buena elección del gen de referencia, seleccionado dependiendo de la muestra (o condición) para poder dar valores fiables e interpretar los patrones de expresión génica²³.

²² Tama de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, 2 (2013) 70-78.

²³ M. Gao, Y. Liu, X. Ma, Q. Shuai, J. Gai, Y. Li. Evaluation of Reference Genes for Normalization of Gene Expression Using Quantitative RT-PCR under Aluminum, Cadmium, and Heat Stresses in Soybean. PLoS One. 12, (2017) 0168965.

D. CAPÍTULO I

Síntesis, optimización, y evaluación de
los PtNCs como nuevo marcador
multimodal en inmunoensayos

D.1. INTRODUCCIÓN

En la introducción general de la Tesis Doctoral se han presentado los MNCs como un tipo de NPs caracterizadas por sus propiedades ópticas. Los MNCs presentan fluorescencia debido a su pequeño tamaño (<3 nm), una baja o nula toxicidad y una elevada biocompatibilidad. Estas características han hecho que los MNCs se usen actualmente como una alternativa muy atractiva a las marcas fluorescentes tradicionalmente (i.e., los fluoróforos convencionales como los tintes orgánicos o proteínas fluorescentes), o incluso frente a otras nanoestructuras como los QDs¹. En la Sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se recogen las aplicaciones más remarcables de estas interesantes nanoestructuras, como por ejemplo sus aplicaciones como sensores químicos para la detección selectiva de metales² o su empleo como marcas para la detección de biomoléculas diana en múltiples muestras biológicas³. Además, cabe resaltar su empleo en estudios de *imaging* para la localización fluorescente de biomoléculas en tejidos y células⁴ incluso en aplicaciones *in vivo*⁵.

Paralelamente, tal y como se describe en la Sección A.3.2.2, los MNCs, presentan un gran potencial como etiquetas para generar inmunosondas metálicas y su aplicación a la detección específica de biomoléculas mediante detección elemental empleando la técnica ICP-MS (tras la realización de un inmunoensayo)⁶.

¹ X.R. Song, N. Goswami, H.H. Yang, J. Xie. Functionalization of metal nanoclusters for biomedical applications. *Analyst*, 141, (2016), 3126–3140.

² M. Cui, C. Wang, D. Yang, Q. Song. Fluorescent iridium nanoclusters for selective determination of chromium (VI). *Mikrochim Acta*. 185, (2017), 8.

³ H. Wu, Y. Xu, R Xie, M. Tang, L. Chen, F. Qu, C. Guo, F. Chai, The controllable synthesis of orange-red emissive Au nanoclusters and their use as a portable colorimetric fluorometric probe for dopamine. *New J. Chem.*, (2022), Advance Article

⁴ A.K. Sharma, S. Pandey, N. Sharma, H.F. Wu, Synthesis of fluorescent molybdenum nanoclusters at ambient temperature and their application in biological imaging, *Materials Science and Engineering: C*, 99, (2019), 1-11.

⁵ E. Porret, X. Le Guevel, J.-L. Coll, Gold nanoclusters for biomedical applications: toward in vivo studies Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 8, (2020), 2216.

⁶ A. Lores-Padín, P. Menero-Valdés, B. Fernández, R. Pereiro. Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the determination of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 1128, (2020), 251-268.

Al ser nanoestructuras puras, es decir estar compuestas por un solo metal, ofrecen una elevada amplificación de la señal debido a los cientos de átomos que componen su núcleo nanométrico. En este sentido, la elevada relación que presentan entre el número de átomos detectables por volumen de la marca se presenta además como una gran ventaja no sólo frente a otras nanoestructuras metálicas empleadas como etiquetas metálicas (p.ej., QDs de CdSe que es una estructura no puras⁷ o las MNPs de mayor volumen), sino también frente a las estructuras quelantes de Ln (DOTA y DPTA) o los complejos poliméricos compuestos por varias estructuras quelantes DPTA (MAXPAR®), las cuales están constituidas por una voluminosa parte no metálica. En este contexto, los MNCs a diferencia de estas estructuras poliméricas no presentan impedimento estérico y hacen posible una bioconjugación a las biomoléculas de reconocimiento (p.ej., Ab específico) sin bloquear u obstaculizar los sitios de unión a la molécula diana⁸. En definitiva, las estrategias basadas en el uso de inmunosondas con MNCs como marcas ofrecen la posibilidad de una detección multimodal (detección por fluorescencia, electroquímica o MS) presentando ciertas ventajas frente a las marcas comúnmente empleadas. Sin embargo, tal y cómo se muestra en este Capítulo I, cada una de las detecciones presentan ventajas y limitaciones, y por ello es conveniente comparar las características analíticas de las diferentes estrategias de detección.

Haciendo referencia a trabajos previos en este campo, Bustos et al.⁷ han comparado la detección mediante luminiscente y la medida de Cd por ICP-MS empleando CdSe/ZnS (QDs) como etiqueta para la determinación de progesterona en leche cruda. De esta manera, encontraron una mejor sensibilidad con la detección por ICP-MS, IC(10)=0,028 ng·mL⁻¹, frente a 0,11 ng·mL⁻¹ utilizando la detección luminiscente. Otros ejemplos incluyen el uso de etiquetas híbridas que contienen un quelato

⁷ A.R. Montoro Bustos, L. Trapiella Alfonso, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Elemental and molecular detection for quantum dots-based immunoassays: a critical appraisal. *Biosens Bioelectron* 33, (2012), 165–171.

⁸ M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro. Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Anal Bioanal Chem.* 411, (2019), 549-558.

D'TPA (coordinado con ^{165}Ho o ^{111}In) y un colorante fluorescente Cy5⁹, o combinando un colorante fluorescente (Cy3) con NPs de conversión ascendente¹⁰. Estas sondas están compuestas por un solo átomo de metal o por átomos de diferentes heteroátomos (p.ej., CdSe), lo que reduce en este último caso la capacidad de amplificación por detección con ICP-MS. Sin embargo, en el caso de los MNCs la detección elemental permite mejorar la sensibilidad de la metodología puesto que ofrece una elevada amplificación de la detección de la biomolécula diana: el elevado número de átomos metálicos por NCs junto con las características intrínsecas del ICP-MS, como la elevada sensibilidad ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}\text{-ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) y los bajos efectos de matriz (ideal para aplicaciones biológicas)¹¹, hacen de esta combinación una herramienta muy potente para la detección de biomoléculas.

En cuanto a los metales empleados para la síntesis de MNCs, por excelencia el Au ha sido el metal más recurrido debido a su baja toxicidad y biocompatibilidad, y por ello existe un elevado número de publicaciones científicas que abalan el uso de los AuNCs como etiquetas fluorescentes y elementales¹². Además de los AuNCs, también la Ag¹³ o el Cu¹⁴ han sido elementos estudiados para la síntesis de MNCs. Sin embargo, estos NCs presentan algunas limitaciones como una menor estabilidad y fotosensibilidad (AgNCs), o la imposibilidad del empleo de los CuNCs como marcas elementales en muestras biológicas puesto que el Cu es un elemento constituyente

⁹ T. Buckle, S. van der Wal, S.J.M van Malderen, L. Müller, J. Kuil, V. van Unen, R.J.B. Peters, M.E.M. van Bommel, L.A. McDonnell, A.H. Velders, F. Koning, F. Vanhaeke, F.W.B. van Leeuwen. Hybrid imaging labels: providing the link between mass spectrometry-based molecular pathology and theranostics. *Theranostics* 7, (2017), 624–633.

¹⁰ B. Yang, Y. Zhang, B. Chen, M. He, X. Yin, H. Wang, X. Li, B. Hu, A multifunctional probe for ICP-MS determination and multimodal imaging of cancer cells. *Biosens Bioelectron* 96, (2017), 77–83.

¹¹ D. Proffrock, A. Prange, Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for quantitative analysis in environmental and life sciences: A review of challenges, solutions, and trends, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 843–868.

¹² Imran Mahmood Khan, Sobia Niazi, Lin Yue, Yin Zhang, Imran Pasha, Muhammad Kashif Iqbal Khan, Wasim Akhtar, Ali Mohsin, Muhammad Farhan Jahangir Chughati, Zhouping Wang, Research update of emergent gold nanoclusters: A reinforced approach towards evolution, synthesis mechanism and application, *Talanta*, 241, (2022), 123228.

¹³ E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Alvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro. Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H. *Microchim Acta* 186, (2019) 429.

¹⁴ S. Zhang, J. Li, S. Huang, X. Ma, C. Zhang, Novel blue-emitting probes of polyethyleneimine-capped copper nanoclusters for fluorescence detection of quercetin *Chem. Pap.*, 75, (2021), 3761.

de las mismas. Así pues, en los últimos años se ha investigado en el desarrollo de nuevas nanoestructuras basadas en otros metales nobles, como el Ir^{2,15}, el Pd¹⁶, o el Mo¹⁷. Siguiendo esta línea, en el Capítulo I de la Tesis Doctoral se propone desarrollar una síntesis de PtNCs. Este metal aparte de ser un metal noble (estable a la oxidación), presenta la posibilidad de detección múltiple por MS gracias a poseer varios isótopos estables (isótopos y abundancia natural: ¹⁹²Pt-0,78%, ¹⁹⁴Pt-32,9%, ¹⁹⁵Pt-33,8%, ¹⁹⁶Pt-25,3%, y ¹⁹⁸Pt-7,21%). Este hecho permitiría que, una vez desarrollado un protocolo óptimo de síntesis de PtNCs, se pueda emplear Pt enriquecido isotópicamente para obtener hasta 5 marcas diferentes. Siguiendo una estrategia similar a la empleada por Valencia et al.¹⁸ donde se emplearon AgNCs enriquecidos en el isótopo ¹⁰⁹Ag, se podrían sintetizar 5 PtNCs para llevar a cabo el *imaging* de varias proteínas simultáneamente empleando ICP-MS.

Hasta la fecha se han publicado varios trabajos centrados en la síntesis de PtNCs¹⁹, especialmente empleando plantillas como agentes estabilizantes como proteínas²⁰, ADN²¹, polímeros^{22,23}, y dendrímeros²⁴. Sin embargo, el empleo de estas

¹⁵ P. Menero-Valdés, A. Lores-Padín, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Iridium nanoclusters as high sensitive-tunable elemental labels for immunoassays: Determination of IgE and APOE in aqueous humor by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Talanta*, 244, (2022), 123424.

¹⁶ S.K. Eswaramoorthy, A. Dass Atomically Precise Palladium Nanoclusters with 21 and 38 Pd Atoms Protected by Phenylethanethiol. *J. Phys. Chem. C* 126, (2022) 126, 444–450.

¹⁷ A.K. Sharma, S. Pandey, N. Sharma, H.F. Wu, Synthesis of fluorescent molybdenum nanoclusters at ambient temperature and their application in biological imaging, *Materials Science and Engineering: C*, 99, (2019), 1-11.

¹⁸ E. Valencia, B. Fernández, M. Cruz-Alonso, M. García, H. González-Iglesias, M.T. Fernández-Abdul, R. Pereiro. Imaging of proteins in biological tissues by fluorescence microscopy and laser ablation-ICP-MS using natural and isotopically enriched silver nanoclusters, *J. Anal. At. Spectrom.*, 35, (2020), 1868-1879.

¹⁹ X. Huang, Z. Li, Z. Yu, X. Deng, Y. Xin, Recent Advances in the Synthesis, Properties, and Biological Applications of Platinum Nanoclusters, *Journal of Nanomaterials*, (2019), 6248725.

²⁰ N. Xu, H.W. Li, Y. Yue, Y. Wu. Synthesis of bovine serum albumin protected high fluorescence Pt16-nanoclusters and their application to detect sulfide ions in solutions. *Nanotechnology* 27 (2016), 425602

²¹ Wang G, Li Z, Luo X, Yue R, Shen Y, Ma N. DNA-templated nanoparticle complexes for photo-thermal imaging and labeling of cancer cells. *Nanoscale*. 35, (2018), 16508-16520.

²² X. Huang, H. Ishitobi, Y. Inouye. Formation of fluorescent platinum nanoclusters using hyper-branched polyethylenimine and their conjugation to antibodies for bio-imaging. *RSC Adv.* 6 (2016), 9709-9716.

²³ N. Xu, L. Hong-Wei, W. Yuqing. Hydrothermal synthesis of polyethylenimine-protected high luminescent Pt-nanoclusters and their application to the detection of nitroimidazoles. *Anal. Chim. Acta.* 958 (2017), 51-58.

²⁴ S. Tanaka, J. Miyazaki, D.K. Tiwari, T. Jin, Y. Inouye. Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 431–435.

grandes estructuras/plantillas presenta algunas limitaciones debido especialmente a la dificultad para llevar a cabo la eliminación de los excesos de este reactivo tras la síntesis, es decir, el aislamiento y purificación de los PtNCs. Además, a la vista de los problemas estructurales y estéricos que pueden presentar, se le suma la elevada autofluorescencia del ligando que enmascara la posible fluorescencia debida a la estructura nanométrica. Otros de los problemas que plantean la síntesis de estos PtNCs (empleando plantillas) son las bajas longitudes de onda de emisión de fluorescencia (normalmente emiten en el rango del azul o verde, 450-550 nm), que coincide con el rango en el que emiten muchas estructuras biológicas. Por todo ello (solapamientos espectrales y fondos elevados que dificultan una detección específica), su uso en aplicaciones ópticas puede verse limitado.

Como alternativa, la síntesis de PtNCs utilizando pequeños ligandos tiolados como agentes estabilizadores permite superar las limitaciones anteriormente citadas: es posible aislar los NCs mediante métodos de purificación rápidos y/o sencillos (ultracentrifugación o diálisis) al mismo tiempo que se evitan los fondos fluorescentes debido a los ligandos²⁵. De esta manera, y siguiendo un trabajo previamente desarrollado por García-Fernández et al.²⁶, en el Capítulo I se propone investigar un nuevo protocolo de síntesis de PtNCs empleando ligandos tiolados, que sean estables, homogéneos, y altamente fluorescentes para su aplicación como marcas bimodales (detección por fluorescencia e ICP-MS), así como evaluar su uso como posibles marcas para la determinación de una biomolécula diana en fluidos biológicos.

Como prueba de concepto los PtNCs son bioconjugados mediante la estrategia de la carbodiimida a anticuerpos Anti-h IgE (producido en cabra) para la cuantificación de la Inmunoglobulina E (IgE) en muestras de suero humano. La IgE es considerado el biomarcador de la enfermedad alérgica, una enfermedad que afecta a más del 40% de la población mundial. Las enfermedades alérgicas se definen como

²⁵ D. Chen, S. Gao, W. Ge, Q. Li, H. Jiang, X. Wang, One-step rapid synthesis of fluorescent platinum nanoclusters for cellular imaging and photothermal treatment. *RSC Adv.* 4, (2014), 40141–40145.

²⁶ J. García-Fernández, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Aqueous synthesis of near-infrared highly fluorescent platinum nanoclusters. *Nanotechnology* 26 (2015), 215601.

reacciones patológicas del sistema inmune ante sustancias inocuas a las que el ser humano se expone normalmente. La mayor parte de las reacciones alérgicas son reacciones de hipersensibilidad tipo I mediadas por la IgE. Un individuo alérgico presenta una elevada concentración de IgE en sangre debido a su producción en respuesta a la entrada en el organismo del alérgeno (la **Figura 30** muestra un esquema del mecanismo biológico). Sin embargo, en condiciones normales la IgE presenta una concentración basal en suero baja (0,1-1,0 mg/mL), por lo que puede ser un buen analito para evaluar las prestaciones de un nuevo tipo de marcador como son los PtNCs.

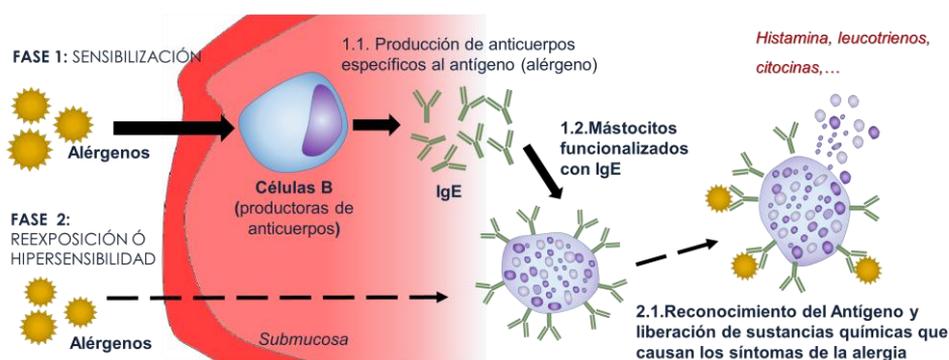


Figura 30: Esquema del mecanismo de hipersensibilidad tipo I por el que se desencadena una reacción alérgica mediada por la Inmunoglobulina E (IgE), siendo este el biomarcador. Cuando un individuo está en presencia del alérgeno se produce un aumento en la producción (concentración) de IgE.

De manera general, para diagnosticar la sensibilización alérgica en suero actualmente se emplean pruebas ImmunoCAP (comercializadas por Thermo Fisher), las cuales presentan diferentes protocolos y antígenos detectados. Paralelamente, otro Kit comercial frecuentemente comercializado y que ha sido empleado como método de validación a los resultados mostrados en este Capítulo I, es un inmunoensayo ELISA espectrofotométrico (comercializado por Abnova) y con un límite de detección del antígeno IgE de $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado también novedosas estrategias alternativas basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación de IgE en suero. Algunos de los ejemplos más relevantes se recogen en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Resumen de estrategias basadas en el empleo de nanoestructuras para la determinación serológica de IgE. En la Tabla se muestra el método y los materiales empleados, así como el límite de detección (LOD) alcanzado para cada uno de ellos.

Método empleado	Materiales	LOD(ng·mL ⁻¹)	Ref.
Inmunoensayo tipo sándwich heterogéneo con separación basada en magnetoforesis y detección fluorescente	NPs de Fe ₃ O ₄ superparamagnéticas (Ab detección) y microesferas luminiscentes (Ab captura)	0,1	27
Inmunoensayo tipo sándwich heterogéneo con separación por electroforesis capilar de inmutafinidad con detección fluorescente	Microesferas magnéticas (Ab captura) y Ab detección marcado con fluoróforo Alexa® 488	2,4	28
Inmunoensayo tipo sándwich donde el Ab de detección se sustituye por un aptámero para detección mediante aptasensor quimioluminiscente	Microesferas magnéticas (Ab captura) y microesferas de poliestireno que enlazan los aptámeros	0,87	29
Ensayo de inmutafinidad empleando aptámeros con separación electroforética y detección por fluorescencia	Chip microfluídico de Poli(dimetilsiloxano)	7	30
Microarrays de flujo lateral con detección colorimétrica	Ab bioconjugado a AuNPs y enzima HRP	2,4	31

²⁷ Y.K. Hahn, Z. Jin, J.H. Kang, E. Oh, M.K. Han, H.S. Kim, J.T. Jang, J.H. Lee, J. Cheon, S.H. Kim, H.S. Park, J.K. Park, Magnetophoretic immunoassay of allergen specific IgE in an enhanced magnetic field gradient. *Anal. Chem.* 79, (2007), 2214–2220.

²⁸ H.X. Chen, J.M. Busnel, G. Peltre, X.X. Zhang, H.H. Girault, Magnetic beads based immunoaffinity capillary electrophoresis of total serum IgE with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 80, (2008), 9583–9588.

²⁹ Q. Peng, Z. Cao, C. Lau, M. Kai, J. Lu, Aptamer-barcode based on immunoassay for the instantaneous derivatization chemiluminescence detection of IgE coupled to magnetic beads. *Analyst* 136, (2011) 140–147.

³⁰ L.F. Cheow, J. Han, Continuous signal enhancement for sensitive aptamer affinity probe electrophoresis assay using electrokinetic concentration. *Anal. Chem.* 83, (2011), 7086–7093.

³¹ T. Chinnasamy, L.I. Segerink, M. Nystrand, J. Gantelius, H. Andersson, A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics. *Analyst* 139, (2014), 2348–2354.

Aptasensor con detección por electroquimioluminiscencia	Nanoestructuras de CdS y AuNPs (para amplificación)	0,02	32
Inmunoensayo tipo sándwich donde el Ab de detección se sustituye por un aptámero modificado con AgNPs y se detecta visualmente	Aptamero modificado con AgNPs	20	33
Inmunoensayo competitivo basado en micropartículas y absorción UV/Vis	Complejos de partículas de poliestireno superparamagnéticas	24	34
Inmunoensayo competitivo cond etección fluorescente	AuNCs bioconjugados a Ab específico	0,20	35

³² J. Cao, H. Wang, Y. Liu, Petal-like CdS nanospheres-based on electrochemiluminescence aptasensor for detection of IgE with gold nanoparticles amplification. *Spectrochim Acta A*, 151, (2015), 274–279.

³³ Z. Li, Q. Niu, H. Li, M. Vuki, D. Xu, Visual microarray detection for human IgE based on silver nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem* 239, (2017), 45–51.

³⁴ T. Yescas-González, A. Leonard, V. Gaude, A. Delplanque, A. Barre, P. Rougé, L. Garnier, F. Bienvenu, J. Bienvenu, M. Zelsmanna, E. Picard, D. Peyrad, IgE detection in allergic patient's serum by absorption analysis of biofunctionalised microparticles. *Microelectron. Eng.* 207, (2019), 27–32.

³⁵ M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens. Bioelectron.* 77, (2016), 1055–1061.

D.2. OBJETIVOS

En este capítulo, se desarrolla un protocolo de síntesis de PtNCs para obtener nanoestructuras estables, fluorescentes y monodispersas para su bioconjugación a anticuerpos específicos y su evaluación como marcas (fluorescentes y elementales) para la cuantificación de una proteína diana en muestras de suero empleando inmunoensayos ELISA en placa. Este objetivo general puede dividirse en los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de la síntesis de nanoclústeres de platino (PtNCs), partiendo de estudios previos de nuestro Grupo de investigación, en cuanto a su fluorescencia y dispersión de tamaños.
2. Caracterización óptica, morfológica y elemental de los PtNCs para estudiar su tamaño, estabilidad, concentración en disolución y fluorescencia, así como conocer el número de átomos de la etiqueta metálica.
3. Estudio de la bioconjugación de los PtNCs a anticuerpos específicos, evaluando diferentes ratios molar Ab:PtNCs con las que se consigan una elevada amplificación sin perjudicar la funcionalidad de la molécula de reconocimiento.
4. Caracterización de la inmunosonda anti-h-IgE:PtNCs para conocer el factor de amplificación conseguido.
5. Evaluación de los PtNCs como marcas bimodales en inmunosondas para la determinación de un biomarcador de la enfermedad alérgica (IgE) llevando a cabo un inmunoensayo ELISA directo en placa con detección por fluorescencia e ICP-MS.
6. Validación de los resultados obtenidos con la metodología empleando los PtNCs como marcas elementales mediante la cuantificación de IgE en sueros humanos con kits comerciales ELISA.

D.3. EXPERIMENTAL

D.3.1. Materiales y reactivos

- Síntesis de PtNCs. El material y reactivos empleados durante la síntesis y optimización de los PtNCs, así como para su bioconjugación a un Ab tipo IgG, están recogidos en el apartado correspondiente de la **Sección C.2.2.1** del Experimental General.
- Síntesis de la inmunosonda e inmunoensayos ELISA. El Ab específico empleado en este Capítulo I, tanto para el estudio de la bioconjugación de los PtNCs a un Ab tipo IgG, como para generar la inmunosonda específica para llevar a cabo el inmunoensayo competitivo ha sido el Ab policlonal Anti-human IgE (Anti-h-IgE) producido en cabra (Ref: I6284, Sigma Aldrich). La proteína específica empleada como estándar analítico en el inmunoensayo competitivo fue la proteína *Native Human IgE* (Azide free, Ref: ab65866 de Abcam). Adicionalmente para el revelado del inmunoensayo no competitivo se emplea un Ab secundario Anti-goat-IgG marcado con HRP (Ref: A6154, Sigma Aldrich) Los soportes empleados para llevar a cabo los inmunoensayos tipo ELISA, tanto los de optimización de la inmunosonda como el inmunoensayo competitivo para determinar la biomolécula diana (biomarcador IgE) con detección elemental (ICP-MS), se llevaron a cabo en placas ELISA 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Adicionalmente, el inmunoensayo competitivo por detección fluorescente se realizó en los portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences) con aislantes de silicona adhesivos a presión empleados para fabricar los “pocillos” en el portaobjetos (Grace bio-labs). El resto de los reactivos necesarios para llevar a cabo los inmunoensayos están recogidos en la **Sección C.2** del Experimental General.

D.3.2. Instrumentación

Tal y como se comenta en la **Sección C.1.2** de la Instrumentación General, para la caracterización de los MNCs se emplean diferentes equipos, atendiendo a la propiedad que se pretende evaluar en los mismos.

- Propiedades ópticas. Se empleó el espectrofluorímetro LS-50-B (Perkin Elmer) para medir la fluorescencia de los PtNCs en disolución. También se empleó el espectrofotómetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies) para medir la absorción de los precursores de síntesis y de las suspensiones de PtNCs. En ambos casos se usó una cubeta de cuarzo Suprasil modelo 101-Qs de Hellma® (Sigma-Aldrich).
- Caracterización morfológica y estructural. Se empleó el equipo de HR-TEM (JEOL JEM-2100) con un sistema de EDX.
- Potencial Z. La medición del potencial Z de las suspensiones de PtNCs a diferentes valores de pH se llevó a cabo con un Zetasizer Nano ZS (Malvern analytical Ltd.).

Para la detección de los PtNCs al emplearlos como etiquetas en el inmunoensayo ELISA competitivo se emplearon:

- Microscopio de láser confocal (DM IRE2; Leica) empleando el objetivo de inmersión en aceite de 63x. Se utilizó para llevar a cabo la detección fluorescente de los PtNCs en el inmunoensayo competitivo.
- La detección elemental se realizó con el ICP-MS 7500 (Agilent Technologies). Este instrumento fue usado para determinar la concentración de Pt, tanto en la caracterización de la síntesis de PtNCs y el bioconjugado, así como para cuantificar la IgE en el inmunoensayo competitivo midiendo la señal de Pt en cada pocillo de la placa ELISA.

Adicionalmente se emplearon un lector de microplacas de absorbancia (ELx800; Bio-Tek) para las lecturas de absorbancia tras los inmunoensayos ELISA con detección colorimétrica. Otros instrumentos empleados en distintas partes del experimental de este Capítulo I han sido: baño de ultrasonidos (J.P. Selecta) para la

digestión ácida; placa de agitación magnética (Fisher Scientific) empleada durante la síntesis de los PtNCs y sus optimizaciones; agitador vórtex (Labbox Labware) empleado para la biocobjugación; ultracentrífuga (Gyrozen and Co.) para la purificación de las síntesis de PtNCs y las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs; y estufa de laboratorio (Mettler) para las etapas de incubación en los inmunoensayos.

El procesamiento de los datos de fluorescencia se llevó a cabo con el software Image J (National Institute of Health) y la representación de las curvas de inmunoensayo con la herramienta de análisis de datos on-line MyAssays Ltd.

D.3.3. Procedimientos experimentales

Algunos de los protocolos experimentales han sido ya detallados en el **Experimental General**, como son el protocolo de síntesis de los PtNCs mediante estrategia *bottom-up* con ligando tiolado y un reductor fuerte (C.4.1), la estrategia de digestión ácida para la medida de los PtNCs por ICP-MS (C.4.2), las etapas para llevar a cabo una buena caracterización de los PtNCs (C.4.3), el protocolo de la reacción de la carbodiimida para la síntesis de las inmunosondas (C.4.4), y el protocolo de caracterización de la inmunosonda (C.4.5). Sin embargo, al ser la primera vez que los PtNCs sintetizados se emplean como etiquetas de anticuerpos, se ha realizado un estudio detallado de su bioconjugación, por lo que en el siguiente apartado se describen las etapas experimentales detalladas de este estudio para la síntesis y la optimización de los PtNCs. Por otro lado, se detallan también los inmunoensayos ELISA competitivos desarrollados para la detección del biomarcador IgE en las muestras de suero humano de personas control.

D.3.3.1. Síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

Con el objetivo de encontrar la relación molar adecuada de Ab:PtNCs con la que llevar a cabo la síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, una vez caracterizada la síntesis de PtNCs (en términos de concentración de PtNCs en la suspensión, tal y como se describe en la subsección C.4.3.3 del Experimental General), se calculan los volúmenes de disolución de síntesis PtNCs necesarios para llevar a cabo la

bioconjugación utilizando las relaciones molares recogidas en la **Tabla 5**. Es necesario tener en cuenta que, tal y como se indica en el protocolo de bioconjugación, se parte de 0,1 mL de Ab (tipo IgG, 150 kDa) con una concentración de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($6,7\cdot 10^{-11}$ moles de Ab Anti-h-IgE).

Tabla 5: Tabla resumen donde se indica el volumen de síntesis de PtNCs empleado para llevar a cabo las diferentes bioconjugaciones con diferentes relaciones molares Ab:PtNCs

Relación Molar Teórica nAb:nPtNCs	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10	1:15	1:20	1:30	1:50
Moles PtNCs (10^{-11})	6,7	20	33	47	67	100	130	200	330
Volumen suspensión de PtNCs necesaria (μL)	10	30	50	70	98	148	198	296	494

D.3.3.2. Optimización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

La relación molar entre los PtNCs y el Ab específico es optimizada mediante un inmunoensayo ELISA espectrofotométrico indirecto, no competitivo, empleando un Ab secundario antisuero de cabra (animal en el que se produce el Ab primario Anti-h-IgE) marcado con la enzima HRP (*horseradish peroxidase*). El protocolo seguido para realizar el inmunoensayo se ejemplifica en la *Figura 31*. Por un lado, se realiza el inmunoensayo empleando el Ab sin bioconjugado con los PtNCs para conocer cuál es la funcionalidad del Ab (parte superior del esquema). Por otro lado, se realiza el inmunoensayo con el bioconjugado (Anti-h-IgE:PtNCs; parte inferior del esquema), empleando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs.

Las etapas llevadas a cabo se pueden resumir de la siguiente manera: (1) se tapizan los pocillos de una placa ELISA (96 pocillos) con $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de patrón de proteína nativa IgE ($100 \text{ }\mu\text{L}$ por pocillo), incubación durante 6 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (en estufa); (2) el exceso de disolución se retira y se añaden $200 \text{ }\mu\text{L}$ por pocillo de la disolución de bloqueo (10 mM PBS, pH 7,4, con un 1% de BSA) para bloquear los posibles sitios vacíos del pocillo y así reducir posibles uniones inespecíficas del Ab. La etapa de bloqueo se deja durante 2 h a temperatura ambiente y, a continuación, (3) se añaden $100 \text{ }\mu\text{L}$ por pocillo del Ab Anti-h-IgE ($1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incuban durante 2 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Es en esta etapa es donde se puede añadir el Ab no marcado o el Ab marcado con los PtNCs en las diferentes relaciones molares; (4) se lava (3 veces) con $200 \text{ }\mu\text{L}$.

de una disolución de PBS-Tween 20 al 0,05%; (5) se incuba otras 2h a 37 °C el Ab secundario, 100 μ L por pocillo de Anti-goat IgG-HRP (diluida 1:20000 en PBS con BSA 1% y Tween 20, 0,05%); se procede a un lavado para eliminar exceso de Ab²-HRP y se añade el sustrato de la enzima (100 μ L por pocillo del TMB kit). Tras realizar estas etapas, la disolución empieza a tornarse azul (i.e., se inicia la reacción enzimática) y se para tras 10-15 min adicionando 50 μ L por pocillo de ácido sulfúrico (2 M), cambiando el color de la disolución de azul a amarillo; y finalmente se detecta la absorbancia del producto colorimétrico resultante en un lector de placas ($\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$).

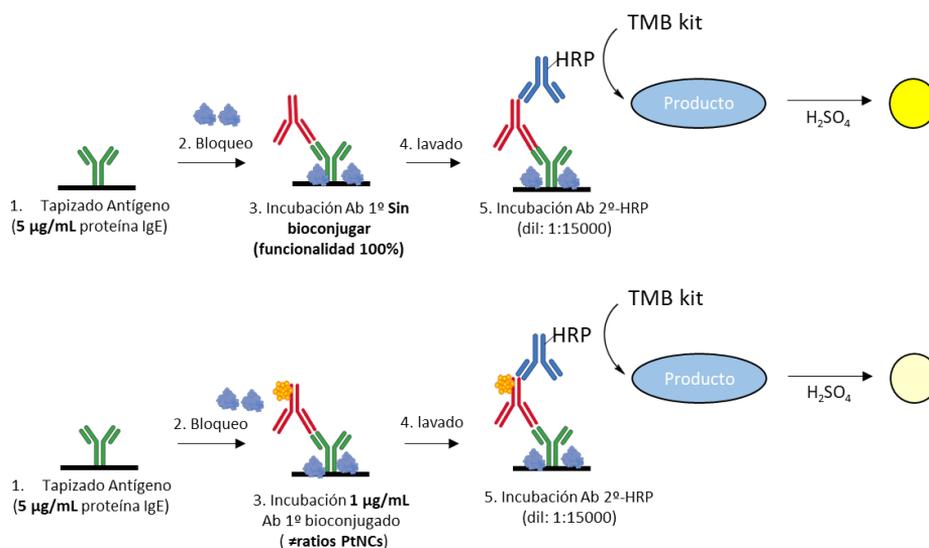


Figura 31: Estudio para optimizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs. Esquema de las etapas del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto para evaluar la pérdida de funcionalidad del Ab específico al ser bioconjugado con diferentes relaciones molares de PtNCs.

D.3.3.3. Inmunoensayo ELISA competitivo

Tras la elección de la relación molar adecuada para la síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, se evalúa su uso en la determinación de una proteína diana (antígeno), en este caso la IgE. Para ello se aplica la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs a un inmunoensayo competitivo con detección fluorescente (microscopía confocal) y por ICP-MS.

A continuación, se describen las etapas del inmunoensayo competitivo llevado a cabo para realizar una detección por fluorescencia, ejemplificado en la **Figura 32**: (1) se tapizan los pocillos con patrón de proteína IgE ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para ello se añaden $100 \mu\text{L}$ de la proteína a los pocillos de un portaobjetos recubierto de poli-L-lisina (las disoluciones de proteína contienen EDC en proporción 1500:1 M de EDC:IgE para mejorar su inmovilización), y se incuban durante 2 h a 37°C ; (2a) A continuación, se retira la disolución sobrante y se bloquean los sitios libres añadiendo $200 \mu\text{L}$ por pocillo de BSA al 1% en PBS 10 mM (pH 7,4); dejándolo durante 2 h a temperatura ambiente; (2b) Simultáneamente a la etapa (2a), se lleva a cabo la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, $100 \mu\text{L}$ de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (expresada como concentración de Ab) con $100 \mu\text{L}$ de las concentraciones ($0\text{-}3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de patrón de proteína IgE o las muestras de suero en un tubo Eppendorf; (3) después de retirar el líquido sobrante tras el bloqueo (2a), se lleva a cabo la reacción competitiva donde se añaden las disoluciones de la incubación (2b) en los pocillos y se dejan reaccionar durante 2 h a 37°C (en estufa); (4) tras los pasos de lavado (tres veces) con PBS-Tween 20 se mide la fluorescencia por microscopía confocal.

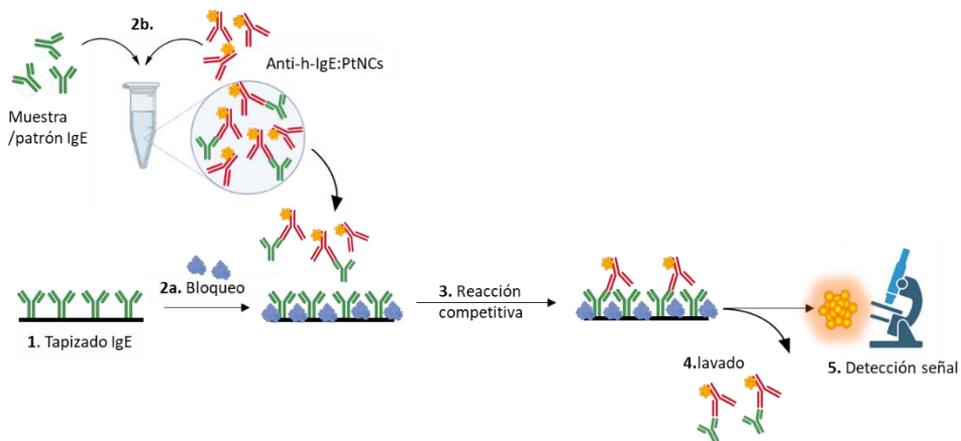


Figura 32: Esquema de las etapas del inmunoensayo competitivo empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs para la detección directa de la proteína (IgE) por microscopía de fluorescencia confocal.

Cuando la detección de la proteína se lleva a cabo por ICP-MS, se deben realizar ligeras modificaciones en el protocolo del inmunoensayo competitivo descrito para la detección fluorescente. Por una parte, el soporte empleado es una placa ELISA de 96 pocillos en vez de los portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina. Por otra parte, es necesaria una etapa adicional en la que se recoge el contenido de cada pocillo para lo cual se lleva a cabo una digestión ácida de los PtNCs. A continuación, se detalla esta etapa adicional necesaria para detectar la inmunosonda por ICP-MS.

Tal y como se resume en la **Figura 33**, tras el lavado final (etapa 4 de la **Figura 32**), se añade al pocillo un volumen de ácido sulfúrico (50 μL , 2 M) con el objetivo de romper los enlaces/adhesiones a la placa. Después de 10 min, se recoge el contenido de cada uno de los pocillos en tubos Eppendorf individuales (contienen aquellas inmunosondas metálicas que reconocieron la proteína patrón que tapizaba la placa). A continuación, se lleva a cabo la digestión ácida (**Sección C.4.2**) donde se añaden 200 μL de agua regia a cada una de las muestras (recolectadas en tubos Eppendorf) con el objetivo de oxidar la nanoestructura metálica y favorecer su atomización en el ICP-MS (20 min en ultrasonidos). Finalmente, se diluyen 1:200 con agua desionizada para minimizar el porcentaje de ácido introducido en el ICP-MS (<3% v/v). Las medidas de ICP-MS para determinar la concentración de Pt en cada una de las soluciones se realizaron mediante calibración externa con estándares de Pt (concentraciones de 0-20 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) utilizando Ir como patrón interno (concentración 5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$). En el ICP-MS se monitorizaron los isótopos del platino $^{194}\text{Pt}^+$ y $^{195}\text{Pt}^+$ y de iridio, $^{193}\text{Ir}^+$ y $^{191}\text{Ir}^+$.

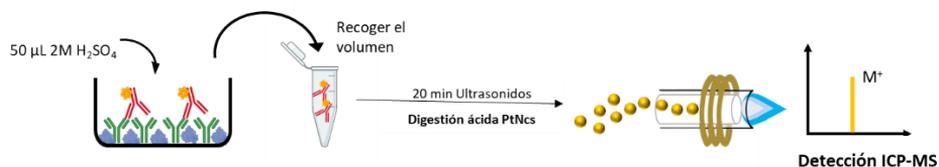


Figura 33: Esquema donde se recoge cómo es la última etapa del protocolo experimental para el inmunoensayo con detección por MS elemental. En la imagen se muestra cómo es la recogida y digestión de la muestra para su análisis por ICP-MS con nebulización convencional.

D.3.3.4. Determinación de IgE en muestras de suero humano

Como prueba de concepto, la metodología analítica desarrollada en este Capítulo I donde se emplean nuevos PtNCs como etiqueta bimodal para la determinación de biomoléculas en muestras de interés biológico se evaluó empleando una inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs en inmunoensayos en placa para el análisis de un suero humano comercial y tres muestras de suero humano clínico (#Suero 1, #Suero 2, y #Suero 3). El procedimiento empleado ha sido el mismo inmunoensayo que para los estándares de IgE descrito en el apartado anterior con por ICP-MS (**Sección D.3.3.3**). En este caso, los sueros deben ser diluidos para que la concentración de las muestras se ajuste al rango lineal de la recta de calibración. En el caso del suero comercial y el #suero 1, se realizó una dilución 1:1000 con PBS (pH 7,4), mientras que para los sueros #2 y #3 una dilución 1:500 fue suficiente.

Los resultados obtenidos con la metodología desarrollada en este Capítulo I empleando los PtNCs como etiqueta se validaron utilizando un kit comercial ELISA basado en la detección espectrofotométrica (medidas de absorbancia) del producto colorimétrico formado tras la reacción enzimática de HRP.

D.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo del desarrollo de esta sección se describen los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo I de la Tesis Doctoral, así como una discusión de los mismos. En primer lugar, se explican las optimizaciones llevadas a cabo para lograr un protocolo adecuado de síntesis de PtNCs empleando ácido lipoico (LA, *lipoic acid*) como ligando estabilizante. A continuación, se describe la caracterización de los PtNCs sintetizados estudiando su bioconjugación a un Ab específico con el objetivo de generar una inmunosonda bimodal (Anti-h-IgE:PtNCs) que pueda ser detectada tanto por fluorescencia como por ICP-MS. Finalmente, se evalúa la aplicación de dicha inmunosonda para la determinación de un biomarcador específico, la IgE (biomarcador de la enfermedad alérgica), para lo cual se ha desarrollado un inmunoensayo ELISA competitivo en placa con detección directa y dual (fluorescente y por MS elemental) de los PtNCs.

D.4.1. Síntesis y caracterización de PtNCs fluorescentes

Como se ha mencionado en la Introducción de este Capítulo I, para la síntesis de PtNCs se parte de un protocolo descrito previamente por García-Fernández et al.²⁶. En esa síntesis de MNCs también con estrategia bottom-up, se emplean relaciones molares elevadas metal:reductor (1:25) que el heterogeneidad de las nanoestructuras mostrando baja fluorescencia. Por ello, con el objetivo final de emplear los PtNCs como etiqueta en aplicaciones biológicas se ha de mejorar su emisión fluorescente, disminuir la dispersión de tamaño de los NCs, a la vez que se debe profundizar en los estudios de estabilidad. De esta manera se llevaron a cabo varias optimizaciones de la síntesis con el fin de conseguir PtNCs de elevada calidad, para lo cual se evaluó la concentración de reductor, el tiempo de síntesis, y el efecto del pH. Adicionalmente, se ensayaron síntesis alternativas empleando estructuras poliméricas (p.ej., PEI), pero debido a los elevados fondos de fluorescencia provenientes del polímero (la cual enmascara la fluorescencia de la nanoestructura) se excluye el empleo de estas estructuras para la síntesis de los PtNCs.

D.4.2. Caracterización espectroscópica de los PtNCs

Para poder estudiar cómo influyen diferentes parámetros (p.ej., tiempo de reacción o pH de medio) en la síntesis de los PtNCs, se midió la fluorescencia de la síntesis para las diferentes condiciones ensayadas. La fluorescencia aparte de ser la propiedad característica de los MNCs, y por tanto la que puede proporcionar información relevante acerca de la reacción, es una herramienta rápida, accesible, y económica. Sin embargo, al cambiar el protocolo de síntesis con respecto al descrito previamente por García-Fernández et al.²⁶, el par de fluorescencia característico de la nanoestructura sintetizada se puede ver afectado (García-Fernández et al.²⁶) PtNCs $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 430$ ó $470/680$ nm). Por ello, el primer estudio realizado fue la caracterización espectroscópica de los PtNCs.

Tal y como se describe en la **Sección C.4.1** (Experimental General) donde se encuentra recogido el protocolo de síntesis *bottom-up* para sintetizar los PtNCs, tras las 15 h en agitación magnética constante a temperatura ambiente las nanoestructuras son caracterizadas ópticamente. Paralelamente, la misma suspensión es estudiada por espectrofotometría (medidas de absorbancia) y fluorescencia. Por una parte, la formación de los PtNCs se confirma mediante medidas por espectrofotometría de absorción molecular. En la **Figura 34a** se recogen los espectros de absorbancia correspondientes a cada uno de los reactivos utilizados para la síntesis de los NCs, así como el espectro de la suspensión purificada de PtNCs ($t = 15$ h y agua como disolvente). Se puede observar cómo los picos de absorbancia correspondientes a los reactivos disueltos en agua (212 nm o 260 nm para la sal precursora y 215 nm para el LA) desaparecen cuando se forman los PtNCs (línea negra en el espectro). En todos los casos los espectros se han adquirido al medir diluciones de los reactivos con un factor de dilución 1:6. Además, tal y como se observa en el espectro de absorbancia correspondiente a la suspensión purificada, en la disolución de PtNCs no se observa la banda de absorbancia característica, conocida como banda de resonancia plasmónica superficial (SPR). Este fenómeno físico es típico de las NPs de mayor tamaño donde

la luz incidente provoca la polarización de los electrones deslocalizados de las capas más externas.

Por otro lado, se llevaron a cabo medidas de fluorescencia con la suspensión purificada de PtNCs. Como se recoge en la **Figura 34b**, se observó que los PtNCs presentan un par $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de fluorescencia característico. De este modo, la ausencia de SPR sumada a la aparición de una banda de fluorescencia ($\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) son datos complementarios que confirman la presencia de nanoestructuras de tamaño cercano a la longitud de onda de Fermi, es decir, que permiten confirmar la formación de PtNCs. Con el objetivo de determinar la banda de emisión fluorescente característica de los PtNCs, se llevó a cabo un barrido espectral excitando en el rango de longitudes de onda comprendido entre 350-650 nm (excitando cada 20 nm) y midiendo la emisión fluorescente en el rango desde 380-800 nm. En la **Figura 34b**, se muestran los espectros de excitación y emisión máximos de los PtNCs sintetizados en disolución acuosa ($\lambda_{\text{exc}} = 455$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm). En ambos casos se representan las intensidades normalizadas, dando el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima observada a 620 nm. Cabe destacar como, a diferencia de las nanoestructuras estabilizadas con plantillas poliméricas (p.ej., PEI), la síntesis de PtNCs empleando LA presenta un blanco de fluorescencia prácticamente indetectable (en la figura se muestra también el espectro de emisión del blanco de síntesis, $\lambda_{\text{exc}} = 455$ nm). Se debe tener en cuenta que el blanco de la síntesis fue preparado siguiendo exactamente los mismos pasos que la síntesis de PtNCs, con la excepción de que no se añadió la sal de platino. A simple vista (**Figura 34c**) se puede observar como las disoluciones presentan colores diferentes: desde el comienzo de la síntesis ($t = 0$ h) hasta las 15 h, la suspensión pasa de un color anaranjado pálido a un amarillo transparente pálido, mientras que el blanco de síntesis (15 h, sin adición de la sal precursora de Pt) es completamente incoloro.

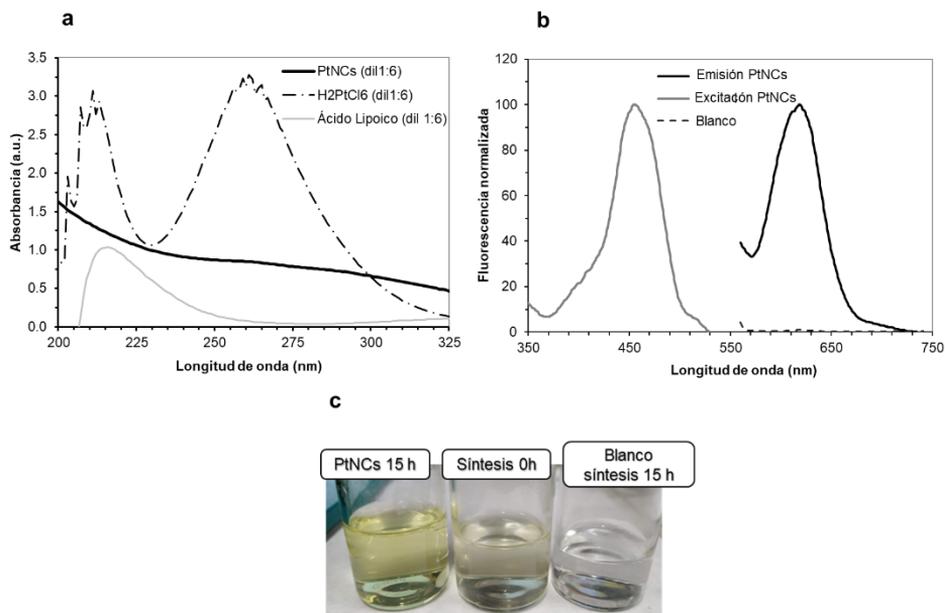


Figura 34: Caracterización espectroscópica de la síntesis de PtNCs. a) Espectros de absorbancia de los reactivos utilizados para la síntesis de los PtNCs, así como de la suspensión de PtNCs sintetizada (línea negra continua: PtNCs, línea negra punteada: H_2PtCl_6 , y línea gris continua: ácido lipóico). Todos los reactivos han sido diluidos 1:6 en agua desionizada para llevar a cabo las medidas, b) Espectros de fluorescencia molecular característicos obtenidos para los PtNCs, y c) Fotografía de las disoluciones de síntesis tras 15 h de reacción, al inicio de la síntesis (0 h), y blanco de síntesis.

D.4.3. Optimización de la síntesis de PtNCs

Tal y como se ha mencionado, se han variado diferentes parámetros para la síntesis de PtNCs partiendo del protocolo publicado por García-Fernández et al.²⁶. Para ello se ha reducido la relación molar de metal:reductor ($\text{Pt}:\text{NaBH}_4$), el tiempo de síntesis y el pH. La relación molar entre la sal precursora y el ligando no se ha estudiado puesto que relaciones molares superiores a 1:5 ($\text{Pt}:\text{LA}$) imposibilitan la reducción completa de LA a ácido dihidrolipoico (DHLLA), mientras que relaciones más bajas pueden llegar a provocar una luminiscencia débil (incluso nula), debido en

gran medida a que la superficie de la nanoestructura no está totalmente pasivada por los ligandos, y por tanto estos presentan baja estabilidad en disolución³⁶.

Disminución de la concentración de agente reductor. El NaBH_4 es un reductor fuerte, y por ello, su empleo como agente reductor puede dar lugar a reacciones con cinéticas rápidas, dificultando el control de la formación de las nanoestructuras. Teniendo en cuenta que se buscan síntesis de PtNCs homogéneos (i.e., con baja dispersión de sus tamaños), son muchos los trabajos publicados que se focalizan en mejorar el control sobre la cinética de la reacción de reducción para favorecer el control de la formación de las nanoestructuras metálicas, dando lugar a MNCs de mayor calidad³⁷. Típicamente, se suelen emplear concentraciones bajas (aunque puede no ser suficiente para reducir el metal precursor) o disminuir la eficacia reduciendo el pH o empleando disolventes orgánicos (en lugar de acuosos)³⁸. En la presente Tesis Doctoral, se planteó la disminución de la concentración de NaBH_4 , reduciendo la relación molar de 1:5:25²⁶ (Pt:LA: NaBH_4) a 1:5:1 (Pt:LA: NaBH_4). Este cambio ha provocado el desplazamiento de la banda de fluorescencia característica de 680 nm a 620 nm, tal y como se observa en la **Figura 34b**. Además, se ha observado que la concentración empleada de NaBH_4 (400 μL , 25 mM) es suficiente para reducir tanto el puente disulfuro del LA (desaparición de la banda de absorbancia a 260 nm) como para reducir la sal de metal precursor: desaparecen las bandas típicas de estos compuestos en el espectro de absorbancia (**Figura 34a**). Se ensayaron adicionalmente diferentes relaciones molares para Pt: NaBH_4 , entre 1:1 y 1:25²⁶, pero la ausencia de bandas claras de fluorescencia en el rango de longitudes de onda del VIS (400-800 nm) hicieron que se descartaran el resto de las relaciones molares ensayadas. Una vez encontrada una elevada emisión fluorescente para los PtNCs a 620 nm (**Figura 34b**)

³⁶ M. van der Linden, A. Barendregt, A.J. van Bunningen, P.T.K. Chin, D. Thies-Weesie, F.M.F. de Groot, A. Meijerink, Characterisation, degradation and regeneration of luminescent Ag29 clusters in solution. *Nanoscale*, 8, (2016), 19901-19909.

³⁷ K. Zheng, X. Yuan, N. Goswami, Q. Zhang, J. Xie, Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters. *RSC Adv.* 4, (2014) 60581–60596.

³⁸ Zhu, M., Qian, H., & Jin, R. Thiolate-Protected Au₂₄(SC₂H₄Ph)₂₀ Nanoclusters: Superatoms or Not? *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 6, (2010) 1003–1007.

con la relación molar 1:1 (Pt:NaBH₄), se evaluaron otras variables experimentales, como son: (1) el tiempo de reacción, y (2) el efecto del pH, expresado como volumen adicionado de NaOH (2 M).

Tiempo de reacción. La elección del tiempo de agitación necesario para conseguir una síntesis de PtNCs adecuada se lleva a cabo recogiendo a cada hora una alícuota de la síntesis (la cual se purifica) y midiendo la señal de emisión fluorescente. En la **Figura 35** se recogen las intensidades de fluorescencia normalizadas obtenidas para cada alícuota de la síntesis de PtNCs recogidas entre la primera hora de reacción y 16 h. Se puede observar que las señales máximas se comienzan a alcanzar tras 13 h de síntesis en agitación constante (trabajando a temperatura ambiente). De cara a la elección del tiempo adecuado, se decide establecer 15 h como el tiempo al cual la señal es completamente estable.

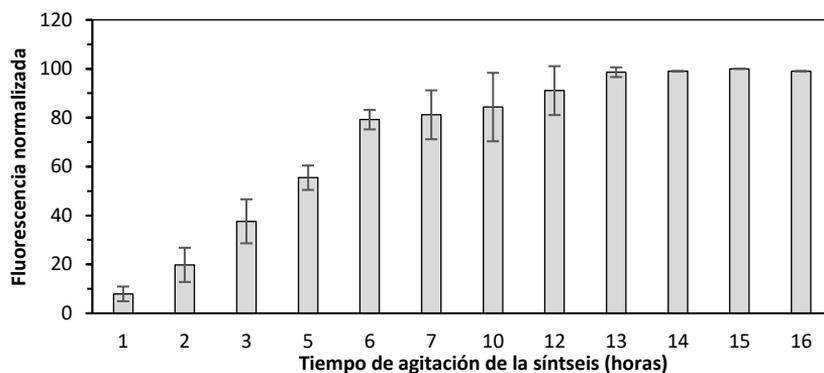


Figura 35: Efecto del tiempo de síntesis en la señal de fluorescencia de los PtNCs para una relación molar Pt:LA:NaBH₄ de 1:5:1 (intensidades normalizadas; dado el valor 100 a la señal de fluorescencia máxima obtenida para 13 h). Las incertidumbres representan la desviación estándar de la media de tres medidas para de tres síntesis diferentes de PtNCs.

En comparación con la síntesis de PtNCs previamente propuesta por García-Fernández et al.²⁶, el periodo de tiempo óptimo encontrado para las condiciones de síntesis ensayadas es más largo (15 h *versus* 6 h). Esto puede justificarse por el efecto de la menor concentración de NaBH₄ en la síntesis que provoca la disminución de la cinética de la reacción de reducción. Una menor concentración de agente reductor

hace que la reacción de reducción sea más lenta y por ello se necesite un mayor tiempo de agitación para una síntesis óptima de los PtNCs.

Efecto del pH: estudio del volumen de NaOH añadido en la síntesis.

La adición de NaOH (2 M) a los 10 mL de agua desionizada inicial facilita la disolución de ligando (el LA tiene baja solubilidad en agua), además de disminuir la cinética de la reacción de reducción a pH básicos. Por este motivo y con el objetivo de lograr un pH óptimo para la síntesis manteniendo una buena fluorescencia, se ensayaron tres volúmenes diferentes de NaOH: 20, 30 y 50 μL , siendo el pH de cada disolución inicial (10 mL de agua desionizada + volumen de NaOH + ácido lipoico en una relación molar Pt:LA, 1:5) de 5,71, 11,0 y 11,5, respectivamente. En la **Figura 36** se muestra una comparación de los espectros de emisión de fluorescencia normalizados para cada síntesis de PtNCs empleando los tres volúmenes NaOH (2 M), tras ser purificadas y ajustadas el pH final a 3. La fluorescencia resultante parece indicar que realizar una síntesis a pH ácido (5,71 con 20 μL de NaOH) no favorece la reacción, puesto que la fluorescencia resultante de la síntesis decrece en un 65% (comparada con la emisión a un pH básico de 11).

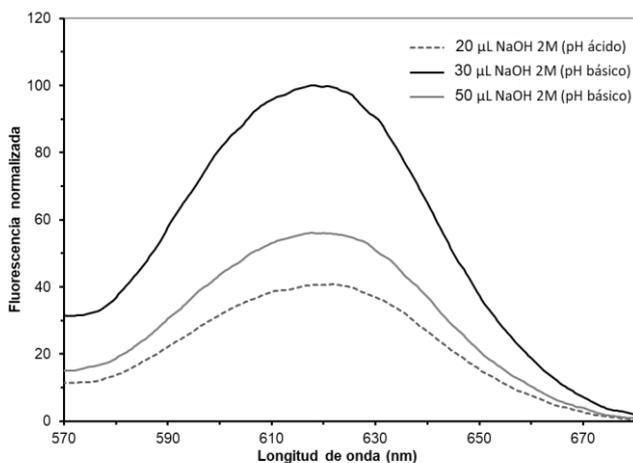


Figura 36: Emisión fluorescente de los PtNCs sintetizados con diferentes volúmenes de NaOH (2 M) añadido a la mezcla de síntesis. Para fines comparativos, la fluorescencia se midió al mismo pH (pH final 3) para las tres síntesis. $\lambda_{\text{exc}}=455 \text{ nm}$.

Con el objetivo de seleccionar el pH más adecuado para la síntesis de PtNCs, se estudió además el rendimiento de cada una de las síntesis comparándolo con los resultados obtenidos por fluorescencia. Para ello se determinó la concentración de Pt en cada una de las síntesis por ICP-MS, tal y como se describe en el procedimiento Experimental General (**Subsección C.4.3.3**). Se determinó la cantidad de Pt en las suspensiones de PtNCs purificadas y reconstituidas en agua (PtNCs retenidos en los filtros de ultracentrifugación), así como la concentración de Pt en la “disolución madre” (disolución de la sal precursora de platino).

Teniendo en cuenta las relaciones molares entre los reactivos empleados para la síntesis son necesarios 10 μmoles de H_2PtCl_6 . Tras medir experimentalmente por ICP-MS la concentración de Pt en una alícuota de la “disolución madre” (sal precursora de Pt) se observó que la concentración de Pt en la misma era de $9,39 \pm 0,17$ μmoles . Paralelamente se determinó por ICP-MS la concentración de Pt en las síntesis de PtNCs (tras sus respectivas purificaciones) donde se emplearon 20 μL , 30 μL , y 50 μL de NaOH, encontrándose unas concentraciones de $5,64 \pm 0,10$ μmoles , $7,90 \pm 0,12$ μmoles , y $6,85 \pm 0,15$ μmoles , respectivamente. Al comparar estos valores con los μmoles de Pt en la “disolución madre” (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se obtienen unos rendimientos de síntesis de PtNCs del 60% cuando se utilizan 20 μL de NaOH (síntesis en pH ácido), mientras que el rendimiento de PtNCs empleando 30 μL y 50 μL de NaOH (pH~11, básico) es del 84% y 73%, respectivamente. Analizando estos resultados y comparándolos con los datos de fluorescencia (**Figura 36**) se puede indicar que el pH ácido no favorece a la reacción de síntesis. Es probable que 20 μL de NaOH (2 M) no sean suficientes para disolver por completo el ácido lipoico en la disolución de partida y por tanto que haya nanoestructuras sin pasivar completamente que durante la purificación se desestabilizan y permiten filtrar su contenido metálico. Por otro lado, se considera que el pequeño cambio en el valor de pH observado al adicionar 30 ó 50 μL de NaOH a la síntesis (11,0 y 11,5, respectivamente) puede ralentizar la reacción de reducción y por ello que 15 h no sean suficientes para completar la reacción de síntesis empleando 50 μL de NaOH. De este modo se observa una fluorescencia más baja a las 15 h de

reacción empleando 50 μL de NaOH en comparación con la síntesis empleando 30 μL de NaOH. Se debe señalar que, tal y como se representa en la **Figura 36**, el aumento de la fluorescencia es mayor que la diferencia en el rendimiento de la síntesis: en el caso de las síntesis de 20 μL y 30 μL es de un 24% (60% frente al 84%, respectivamente) lo que indica que los PtNCs de mayor calidad se sintetizarían con 30 μL de NaOH (2 M).

De cara a elegir el pH adecuado para la síntesis de PtNCs se debe estudiar con mayor profundidad cada una de ellas. Es decir, no sólo evaluar la fluorescencia o el rendimiento obtenido para la síntesis, sino también evaluar la estructura, tamaño, y dispersión de tamaños de los PtNCs sintetizados en cada caso. Para ello es necesario una caracterización estructural de las nanoestructuras resultantes puesto que la condición es obtener un protocolo que permita la síntesis de PtNCs lo más homogéneos posible siempre y cuando la fluorescencia sea elevada.

D.4.4. Caracterización estructural de los PtNCs

A continuación, se estudiaron los PtNCs sintetizados con 20 μL y 30 μL de NaOH empleando HR-TEM con el objetivo de evaluar posibles diferencias en su estructura (diámetro y dispersión de tamaños) debido al cambio de pH en el medio. Las medidas por HR-TEM permitieron obtener imágenes en campo claro (*brigh field*) de los PtNCs sintetizados en ambas condiciones de pH. Los diámetros promedio de las nanoestructuras se determinaron manualmente midiendo PtNCs individuales (observados al azar en las fotografías de HR-TEM obtenidas) empleando la herramienta del software libre Fiji ImageJ. Los histogramas obtenidos para la distribución de tamaños de las suspensiones de PtNCs se recogen en la **Figura 37** (**Figura 37a** PtNCs con 20 μL de NaOH y **Figura 37b** PtNCs con 30 μL de NaOH). Promediando el diámetro medido de los PtNCs sintetizados, las nanoclústeres en pH básico (30 μL NaOH) tienen un diámetro de $1,49 \pm 0,03$ nm (para $n = 1800$, intervalo de confianza del 99%, con la distribución normal estándar), mientras que los PtNCs sintetizados en pH ácido (20 μL de NaOH) mostraron un diámetro mayor de $1,73 \pm 0,05$ nm ($n = 1800$, intervalo de confianza del 99%, con la distribución normal estándar). El

mayor tamaño promedio y la mayor dispersión obtenidos para los PtNCs sintetizados con 20 μL de NaOH apoya lo resultados experimentales obtenidos para el rendimiento de las síntesis. Un mayor tamaño de las nanoestructuras empleando el pH más ácido corrobora la propuesta de que el LA no está disponible en su totalidad, es decir no disuelto completamente, y por lo tanto no permite el pasivado de la superficie de los núcleos metálicos de las nanoestructuras de manera eficaz.

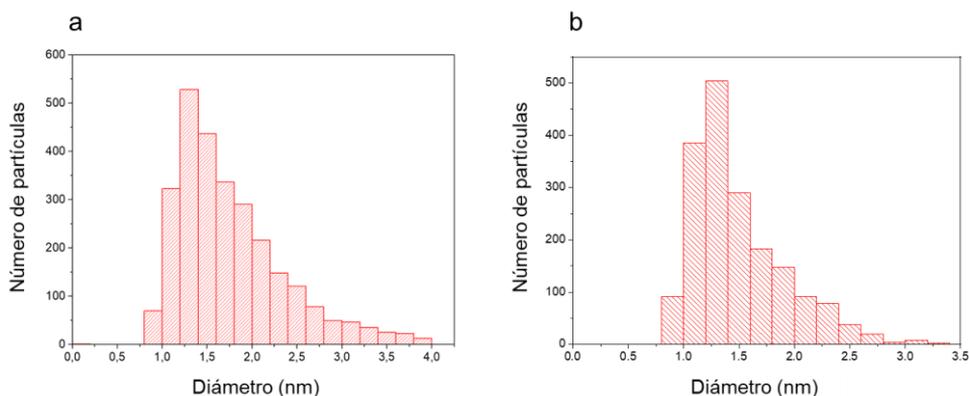


Figura 37: Histogramas obtenidos a partir de las imágenes por HR-TEM de las suspensiones coloidales de PtNCs sintetizados donde se muestra la distribución del diámetro empleando: (a) 20 μL de NaOH, y (b) 30 μL de NaOH. Los diámetros han sido medidos con el software Fiji-ImageJ.

Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos junto con la baja resolución obtenida para las imágenes por HR-TEM de la síntesis de pH ácido (debido a suciedad proveniente del LA sin disolver), se seleccionó la síntesis de PtNCs donde se emplean 30 μL de NaOH para ser empleados como etiqueta en la síntesis de inmunosondas para determinar biomoléculas en aplicaciones biológicas.

En la **Figura 38** se muestran las imágenes obtenidas para la caracterización estructural por HR-TEM de los PtNCs empleando 30 μL de NaOH. Se puede observar cómo en color más oscuro (imágenes obtenidas en campo claro) se distinguen los núcleos metálicos de las nanoestructuras sintetizadas, así como la red cristalina (marcada con un círculo rojo, **Figura 38b**). Además, las micrografías de EDX, como la mostrada en la **Figura 38c**, confirmaron la presencia de Pt (núcleo metálico), y S

(ligando tiolado) como elementos principales presentes en las suspensiones observadas por microscopía electrónica. Hay que comentar que, la presencia de Cu se atribuye a las rejillas empleadas en microscopía para depositar las muestras, y el Cr es un elemento constituyente de la estructura del microscopio.

Adicionalmente, el equipo HR-TEM empleado permitió obtener un patrón de difracción de área seleccionada (SAED) donde se observan los puntos claros que forman los anillos (estructura cristalina). Tal y como se describe en el apartado de caracterización morfológica y estructural (**Subsección C.4.3.2**), se puede conocer la estructura de la celda unidad de los PtNCs por comparación de los $dL_{spacing}$ obtenidos a partir de los diámetros de los anillos del patrón SAED con la bibliografía. De esta manera, la inversa de los radios de los anillos del patrón SAED corresponden a los valores del espaciado entre planos atómicos de la estructura cristalina, ($dL_{spacing}$). En el caso de los PtNCs sintetizados, se encontró un diámetro para los anillos de 80,8; 96,4; 112,8; y 156,4 \AA^{-1} (**Figura 38d**), donde los valores de $dL_{spacing}$ resultantes son 2,4 \AA , 2,1 \AA , y 1,3 \AA . Estos valores coinciden con los encontrados en la bibliografía para la celda unidad cúbica centrada en las caras (FCC): 2,3 (dL1), 2,0 (dL2), 1,4 (dL3) \AA .

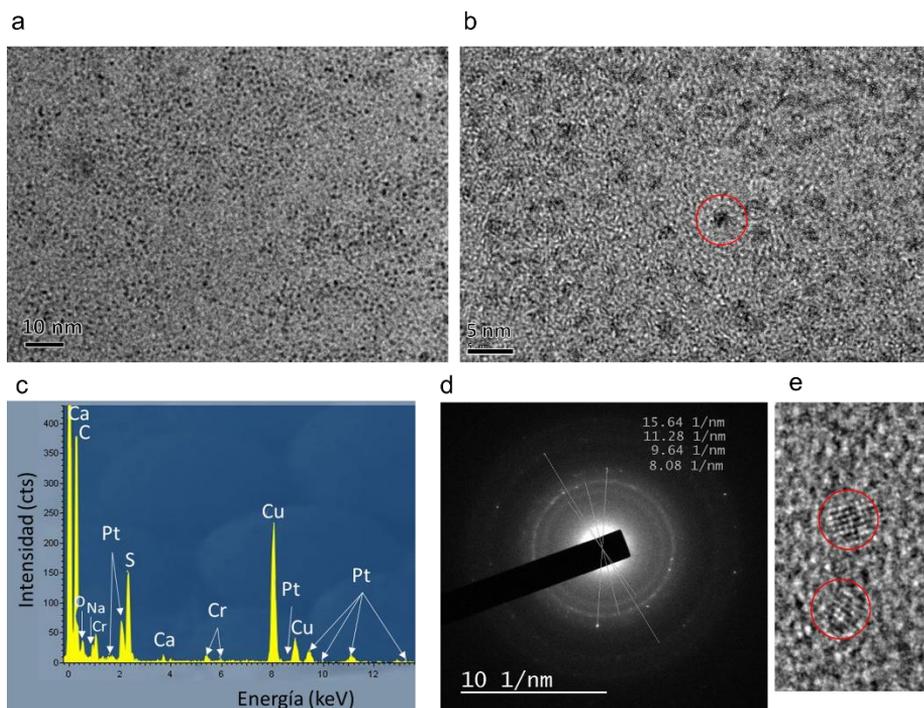


Figura 38: Imágenes obtenidas para la caracterización estructural de los PtNCs sintetizados empleando 30 μL de NaOH 2M, a) imagen de HR-TEM (10 nm de escala), b) Imagen de HR-TEM (5 nm de escala), c) gráfico EDX con la composición elemental, d) patrón SAED, y e) zoom de la imagen de HR-TEM donde se observan los planos atómicos de la estructura cristalina ($d\text{spacing}$).

Una celda unidad FCC está constituida por 4 átomos de Pt. Con ello, se puede calcular cuánto ocupa una celda unidad de manera teórica (Volumen celda teórico, $V_{\text{celda-teo}}$), teniendo en cuenta la masa atómica del Pt ($195,081 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ de átomos de Pt), y la densidad del metal ($21,45 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$). El volumen ocupado por la celda unidad en el caso de los PtNCs es de $V_{\text{celda}} = 6,04 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^3$. Además, dividiendo el volumen experimental promedio de un PtNC (V_{PtNC}), estimado a partir del radio del núcleo metálico medido por HR-TEM y asumiendo una forma esférica, por el volumen de la celda unidad, se sabe que 1 único PtNCs ocupa 29,25 celdas unidades FCC. Por lo tanto, se puede determinar que cada PtNC está compuesto por 117 átomos de Pt de media ($29,25 \text{ celdas} \times 4 \text{ átomos de Pt por celda FCC}$).

De este modo, conociendo el número de átomos que componen 1 único PtNC, se puede transformar la concentración molar de Pt iónico determinada por

ICP-MS en la suspensión purificada de PtNCs en concentración molar de PtNCs ($6,75 \cdot 10^{-6}$ mol de PtNCs L^{-1}). Adicionalmente, el número de átomos de Pt por NC es de interés para calcular el factor de amplificación en la detección de las biomoléculas diana al emplear los PtNCs como marcas elementales de anticuerpos específicos con detección por ICP-MS.

D.4.5. Estudios de estabilidad de los PtNCs

✓ Dependencia del pH en la fluorescencia y el potencial-Z

Es conocido que el pH es un parámetro que tiene una influencia directa en la emisión fluorescente y la estabilidad de las nanoestructuras. De este modo, uno de los primeros estudios llevados a cabo con los PtNCs sintetizados fue evaluar el efecto del pH en la fluorescencia.

En la **Figura 39a** se recoge la fluorescencia observada para la suspensión coloidal de PtNCs a diferentes valores de pH (desde 2 a 12,4), ajustados una vez purificada la síntesis (todas ellas con una misma concentración). La señal de emisión fluorescente (recogida a 620 nm) para la suspensión de PtNCs aumentó al disminuir el pH de 12,4 a 3,5, (mayor emisión fluorescente a pH más ácido, entre 3-4,7). Por otra parte, y de manera complementaria, la **Figura 39b** muestra los valores obtenidos para el potencial-Z a los diferentes pH, dando información sobre la estabilidad de los PtNCs en suspensión acuosa. Se observa cómo la suspensión coloidal es estable en todo el rango de pH, exceptuando a pH ácidos ($pH < 3$). La estabilidad viene indicada cuando los valores de mV son mayores de +30 o menores de -30 mV. Estos resultados pueden deberse al LA (ligando estabilizante de la nanoestructura), el cual presenta en su extremo un ácido carboxílico ($pK_a \sim 4,5$) por lo que la nanoestructura se presenta desprotonada (con carga negativa) en todo el rango de pH básico. Teniendo en cuenta estos resultados se podría afirmar que, aunque la fluorescencia a un pH biológico ($pH \sim 7$, neutro) es en torno al 50% de la máxima, los PtNCs son estables en ese rango de pH, presentando valores de Potencial-Z alrededor de -50 mV. Esto indica que los PtNCs son adecuados para emplearlos como marcas en aplicaciones biológicas (se trabaja con medios en esos rangos de pH).

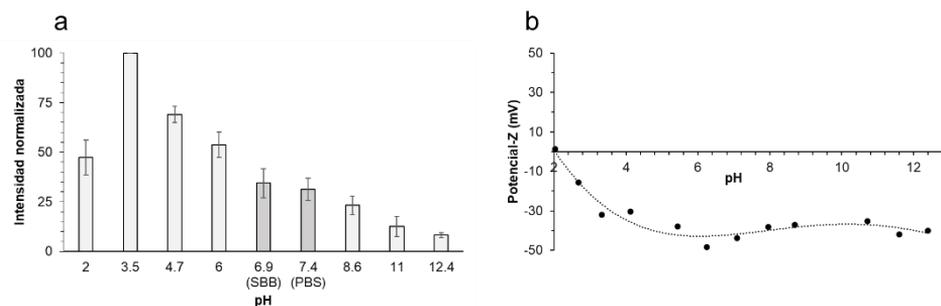


Figura 39: Gráficas donde se puede observar la influencia del pH en la emisión fluorescente y estabilidad de los PtNCs sintetizados y purificados. a) Influencia del pH en la fluorescencia de los PtNCs, y b) Medidas del potencial-Z (medida indirecta de la estabilidad de los PtNCs) a los diferentes valores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

✓ Estabilidad de los PtNCs con el tiempo

Aunque se observó que la fluorescencia máxima de los PtNCs estaba a un pH ácido, de cara a evaluar los PtNCs como marcas para la detección en muestras biológicas, la estabilidad de sus propiedades debe ser estudiada a los pH a los que se encuentran las muestras a analizar (pH~7). En este caso, la estabilidad de los PtNCs se estudió monitorizando su emisión luminiscente con el paso del tiempo (620 nm) al ser almacenadas, una vez purificadas, en diferentes condiciones (temperatura ambiente *versus* 9°C) y disolventes (agua, SBB, y PBS). En la **Figura 40** se recoge la fluorescencia normalizada obtenida para los PtNCs purificados y llevados a volumen con agua desionizada, tampón PBS (pH=7,4), y tampón SBB (pH=6,9).

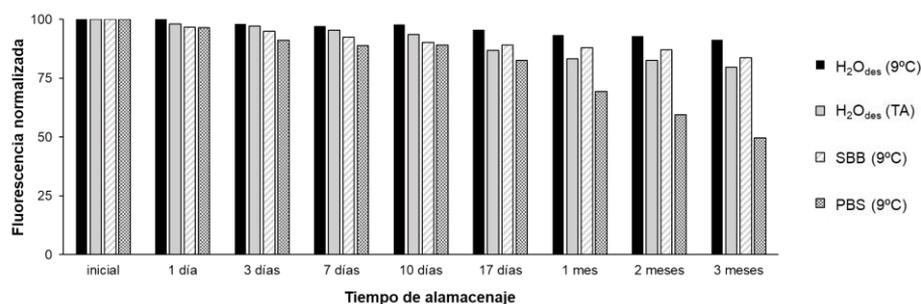


Figura 40: Gráfico comparativo de la fluorescencia medida a 620 nm para las suspensiones de PtNCs purificadas y almacenadas en diferentes condiciones a lo largo de tres meses. TA= temperatura ambiente.

De manera general, los PtNCs presentan elevada estabilidad fluorescente en un periodo máximo investigado de 3 meses (*Figura 40*). Por una parte, se observó que la temperatura no afecta a la fluorescencia de los PtNCs, siendo ligeramente más estable su almacenaje en nevera (9°C) que a temperatura ambiente. Respecto al disolvente empleado, aunque en el caso del PBS la emisión fluorescente disminuye cerca del 50% al permanecer almacenados durante 3 meses, su intensidad a corto y medio plazo (hasta 10 días) es comparable a lo observado en tampón SBB o agua desionizada. A la vista de los resultados experimentales, los PtNCs deben ser purificados en agua desionizada o SBB para su almacenaje a largo tiempo (*Tabla 1*). Sin embargo, el tampón PBS es el medio empleado para llevar a cabo las bioconjugaciones e inmunoensayos. Para ello, sólo la alícuota (volumen de PtNCs necesario) que se va a emplear para llevar a cabo la bioconjugación es purificada y reconstituida en PBS durante un periodo corto de tiempo (no más de una semana en PBS) para asegurar así la estabilidad de su emisión fluorescente. Mencionar que no se muestran datos relevantes de la exposición de los PtNCs a la luz, puesto que esta influye negativamente en la estabilidad del LA. Por ello, todas las condiciones de almacenaje fueron evaluadas empleando viales ámbar y evitando la radiación de luz directa.

Paralelamente, resulta interesante estudiar la estabilidad de la señal fluorescente de los PtNCs al excitarlos durante un tiempo constante. Para ello, se ha recogido la intensidad de emisión luminiscente a 620 nm de los PtNCs al excitarlos a 455 nm durante un tiempo determinado de 2 h (ver *Figura 41*). Como se muestra en la

gráfica, no se observaron cambios significativos en la emisión de fluorescencia por lo que se puede afirmar que la fluorescencia no se ve afectada con el tiempo de exposición.

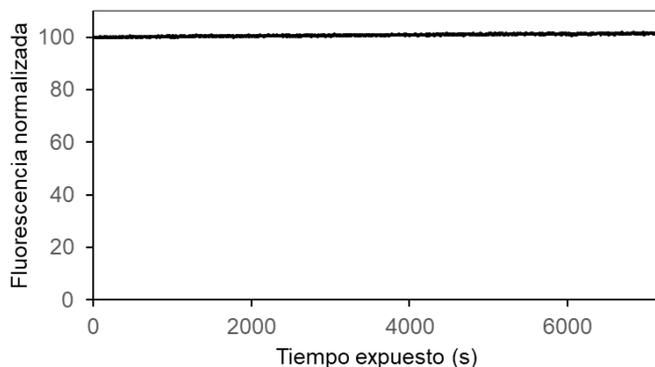


Figura 41: Gráfico de la evolución de la emisión fluorescente de los PtNCs (620 nm) monitorizada durante 2 h (7200 s) con excitación constante a 455 nm.

D.4.6. Estudio y elección de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs

Con el objetivo de encontrar una relación molar adecuada Ab:PtNCs con la que sintetizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, se estudió la funcionalidad del Ab así como la amplificación generada por la marca (PtNCs) empleando diferentes relaciones molares para su síntesis. En la **Tabla 5** se recogen las relaciones molares Ab:PtNCs ensayadas que van desde 1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, hasta 1:50. Una relación molar adecuada es aquella que no genera pérdida de la función de reconocimiento del Ab tras el etiquetado, manteniendo una elevada amplificación de la señal por parte de la marca. En el caso de los PtNCs se evaluó tanto la amplificación generada para su detección por fluorescencia como para su detección por ICP-MS (i.e., se debe elegir la relación molar Ab:PtNCs más alta, siempre que se mantenga la funcionalidad de la inmunosonda).

En primer lugar, se estudió cómo el etiquetado afecta a la funcionalidad del Ab tras la bioconjugación y purificación de la inmunosonda. Para ello, como se describe en la **Figura 31:** Estudio para optimizar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs. Esquema de las etapas del

inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto para evaluar la pérdida de funcionalidad del Ab específico al ser bioconjugado con diferentes relaciones molares de PtNCs, se llevó a cabo el inmunoensayo ELISA espectrofotométrico indirecto empleando los diferentes bioconjugados (diferentes relaciones molares Ab:PtNCs). Para ello se inmovilizó la proteína diana (IgE) en los pocillos de una placa ELISA y se empleó un Ab secundario marcado con HRP para su detección espectrofotométrica midiendo la absorbancia del producto colorimétrico resultante en un lector de placas a 450 nm (λ_{abs}). La **Figura 42a** muestra la absorbancia resultante empleando las diferentes relaciones molares Ab:PtNCs investigadas. En primer lugar, se observa una disminución de la absorbancia para las relaciones molares de 1:1, 1:10, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs frente a la absorbancia del Ab sin etiquetar (2,06). En todos los casos se muestra una absorbancia similar, con valores en el rango entre 1,49-1,57. Esta bajada detectada en la absorbancia puede atribuirse a una pérdida de la inmunosonda (Ab:PtNCs) durante las etapas de purificación (p.ej., adsorción a las paredes del filtro o el Eppendorf). Si se sigue aumentando la relación molar Ab:PtNCs se observa una ligera disminución de la absorbancia con la relación 1:30, viéndose esta drásticamente afectada a relaciones molares mayores (1:50). Esta disminución sí podría atribuirse al bloqueo de los sitios de reconocimiento del Ab por parte de las nanoestructuras.

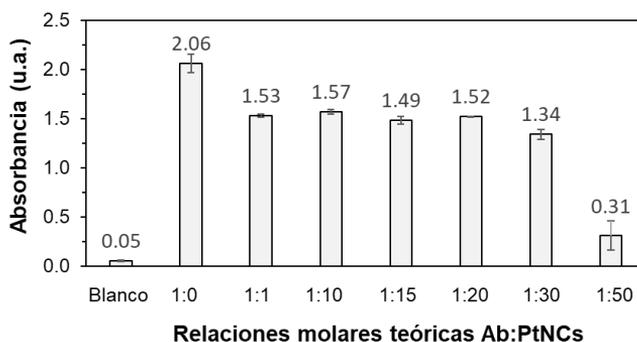


Figura 42: Estudio de la funcionalidad de la inmunosonda con las diferentes relaciones molares ensayadas Ab:PtNCs (1:0-1:50) mediante la medida de la absorbancia a 450 nm para el producto resultante tras el revelado colorimétrico del inmunoensayo ELISA no competitivo indirecto. Las barras de error representan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

Paralelamente, las bioconjugaciones sintetizadas empleando las diferentes relaciones molares fueron estudiadas en cuanto a la emisión fluorescente, así como la amplificación conseguida mediante detección por ICP-MS. En la

Figura 43 se recoge una comparación de los espectros de emisión fluorescente para el bioconjugado con relaciones molares Ab:PtNCs de 1:1, 1:15, y 1:20, así como el espectro obtenido para una disolución de PtNCs en suspensión con el mismo factor de dilución que la relación 1:20 (en tampón PBS). Se observa cómo la mayor relación molar ensayada (Ab:PtNCs 1:20), que asegura la funcionalidad del Ab, presenta una buena señal fluorescente si se compara con las otras relaciones molares de menor concentración (1:15 y 1:1). Puede parecer extraña la bajada en la fluorescencia experimentada al comparar los PtNCs (libres) y el bioconjugado 1:20. Sin embargo, este hecho se podría entender teniendo en cuenta los rendimientos de la síntesis, los cuales se pudieron determinar mediante el análisis elemental por ICP-MS. De este modo es posible conocer la relación molar real de los PtNCs enlazados por Ab.

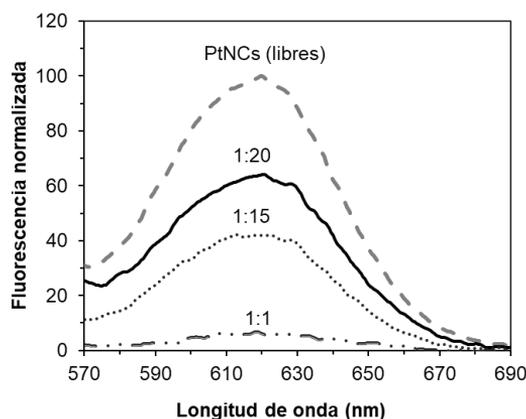


Figura 43: Caracterización fluorescente de los PtNCs libres y los bioconjugados Ab:PtNCs con relaciones molares diferentes (1:1, 1:15, y 1:20 Ab:PtNCs). La medida de la fluorescencia se realiza a 620 nm.

El número real de PtNCs por Ab se pudo estimar midiendo la concentración de Pt por ICP-MS en las disoluciones de Ab etiquetado que contenían una cantidad conocida de Ab, es decir tras la síntesis y purificación de las inmunosondas. De esta manera, en la **Tabla 6** se recogen los resultados obtenidos por ICP-MS para la deter-

minación de Pt en las diferentes suspensiones. Se puede observar cómo los rendimientos de etiquetado disminuyen a medida que aumenta la proporción de PtNCs. Por ejemplo, para la relación molar teórica de 1:1 Ab:PtNCs en la disolución, no se etiquetó todo el Ab: los resultados experimentales mostraron un 77,6% de rendimiento de etiquetado, lo que corresponde a una relación molar real de 1:0,77 Ab:PtNCs. Sin embargo, para la relación molar teórica de 1:20 Ab:PtNCs el rendimiento de etiquetado disminuyó hasta el 55,7%, lo que corresponde a una relación molar real de 1:11,13 Ab:PtNCs.

Tabla 6: Rendimiento del etiquetado del Ab con los PtNCs durante la síntesis de la inmunosonda mediante análisis de los bioconjugados una vez purificados por ICP-MS.

Relación molar Ab:PtNC (síntesis inmunosonda)	1:1	1:10	1:15	1:20
Rendimiento de la bioconjugación %	77,60%	62,41%	57,92%	55,67%
Relación molar "real" Ab:PtNC	1:0,77	1:6,24	1:8,69	1:11,13

Teniendo en cuenta este estudio, la relación molar teórica 1:20 Ab:PtNCs es realmente una relación molar 1:11,13 (i.e., hay un etiquetado que es un 45% menos de lo esperado). Por tanto, la pérdida de fluorescencia observada en la **Figura 43** para la relación molar 1:20, está en concordancia con el rendimiento estimado de la bioconjugación (~40% menos de fluorescencia).

Por otro lado, hay que destacar que se observó una buena relación lineal (regresión lineal con un coeficiente de regresión de 0,993) al representar las diferentes relaciones molares reales del bioconjugado (hasta 1:11,13 Ab:PtNCs) frente a la señal de fluorescencia medida a 620 nm en los bioconjugados en disolución tras su purificación (**Figura 44a**).

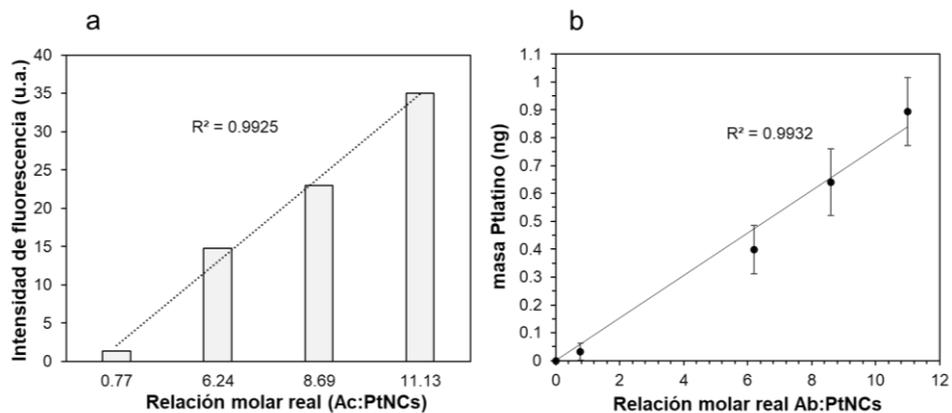


Figura 44: Estudio de la inmunosonda Ab:PtNCs empleando diferentes relaciones molares Ab:PtNCs mediante medidas por fluorescencia e ICP-MS. a) Relación lineal observada entre la fluorescencia detectada en los bioconjugados en disolución y la relación molar real Ab:PtNCs, y b) Relación entre la masa de Pt detectada por ICP-MS en los pocillos ELISA de los experimentos recogidos en la Fig. 44a y la relación molar real Ab:PtNCs. Las desviaciones corresponden a la desviación de $n=3$ pocillos (réplicas del inmunoensayo).

Además, se estudió también la concentración de Pt que contienen los pocillos de la placa ELISA tras llevar a cabo el inmunoensayo espectrofotométrico (**Figura 42**). Para ello, tras recuperar el contenido de los pocillos (siguiendo el protocolo detallado en el experimental **Figura 33**) se determinó su contenido en Pt por ICP-MS. En la **Figura 44b** se muestra de manera gráfica la relación lineal obtenida al representar la masa de Pt detectada (en ng) frente a la relación molar real Ab:PtNCs para cada uno de los pocillos, es decir, que la cantidad creciente de Pt encontrada en cada pocillo de la placa ELISA para las relaciones molares Ab:PtNCs entre 1:0,77 y 1:11,13 es directamente proporcional a la relación molar real encontrada al medir el bioconjugado por ICP-MS.

De este estudio se puede concluir que la relación molar teórica Ab:PtNCs 1:20 (1:11,13 relación molar real) es la relación que presenta una elevada amplificación de la señal fluorescente y elemental (ICP-MS), manteniendo la funcionalidad de reconocimiento del Ab. Por tanto esta ha sido la relación molar empleada para la síntesis de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs, la cual ha sido empleada para la determinación de la biomolécula diana seleccionada, la proteína IgE.

D.4.7. Determinación de IgE mediante un inmunoensayo competitivo en placa basado en la detección bimodal de PtNCs

La determinación de IgE utilizando la inmunosonda que contiene PtNCs como etiqueta (con una relación molar real Ab:PtNCs de 1:11,13) se llevó a cabo con un inmunoensayo competitivo directo. Para ello en primer lugar se evaluó su detección por fluorescencia empleando microscopía confocal y posteriormente su detección elemental por ICP-MS. Para comparar las dos metodologías de análisis propuestas, se evaluaron los límites de detección obtenidos y finalmente se seleccionó la que mostraba unas mejores prestaciones analíticas para cuantificar la IgE en 4 muestras de suero humano de personas control.

La **Figura 45a** muestra la curva de inhibición obtenida por detección fluorescente siguiendo el protocolo detallado en la sección Experimental empleando los estándares de proteína IgE (concentraciones desde $0\text{-}3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). En este caso el inmunoensayo se ha realizado detectando por microscopía láser confocal la fluorescencia emitida por los PtNCs de la inmunosonda. La curva de calibración (**Figura 45a**) se ajustó con una ecuación de cuatro parámetros empleando el programa MyAssays Ltd. de la cual se ha podido extraer los valores de concentración de IgE inhibitoria (IC), el límite de detección (LOD), y el rango lineal. El LOD, correspondiente al IC10, fue de $0,6\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgE, mientras que el rango lineal (IC20-IC80) se extendió desde $1,6\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $60\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgE. Este valor para el LOD es ligeramente peor que el LOD publicado para una estrategia de análisis similar donde se emplean AuNCs como etiquetas fluorescentes ($0,2\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgE)³⁹. Esta diferencia observada para el LOD puede atribuirse al instrumento empleado para llevar a cabo la detección de la fluorescencia en el caso de los PtNCs. Como se ha detallado en la Sección Experimental General, el microscopio confocal (TCS-SP8X, Leica) emplea como fuente de excitación una luz diodo a 405 nm y un láser de luz blanca que se

³⁹ M. Cruz-Alonso, L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens. Bioelectron.* 77, (2016), 1055–1061.

ajusta en un rango de longitudes de onda desde 470-670 nm. Al contrario de lo que ocurre con los AuNCs para los cuales se realiza una excitación a 405 nm para llevar a cabo las medidas, la excitación de las muestras en el caso de los PtNCs se realizó a 470 nm, la cual no es la excitación máxima de la etiqueta fluorescente (λ_{ex} máxima, 455 nm), lo que afecta directamente a la sensibilidad de la detección.

Teniendo en cuenta la capacidad que presentan los PtNCs para ser empleados como marca multimodal, a continuación, se llevó a cabo la detección de la inmunosonda empleando ICP-MS. En este caso, la curva de inhibición obtenida (detectando el Pt presente en cada pocillo de la placa ELISA) mostró unos resultados prometedores. El gráfico de calibración resultante (**Figura 45b, círculos**) se ajustó con una ecuación de cuatro parámetros empleando el programa MyAssays Ltd. El LOD (IC10) encontrado fue de $0,08 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgE, y el rango lineal (IC20-IC80) desde $0,10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta $2,6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de IgE. A la vista de los resultados experimentales obtenidos se puede decir que el LOD por ICP-MS es más bajo que el obtenido por detección fluorescente empleando la misma inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs y además es menor también que el LOD de $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ obtenido empleando AuNCs como marcas fluorescentes³⁹.

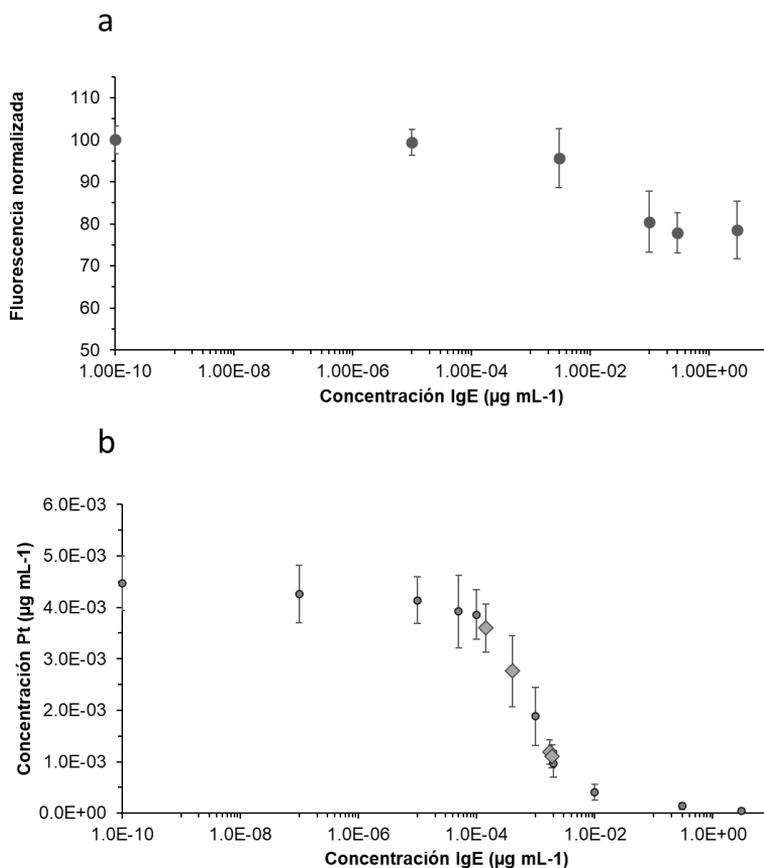


Figura 45: Curvas de calibración obtenidas para la determinación de IgE empleando un inmunoensayo con formato competitivo en el que se utiliza la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs (relación molar 1:11,13 Ab:PtNCs). (a) Gráfico de calibración por detección de fluorescencia con microscopía láser confocal ($\lambda_{\text{ex}}=470$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

En la **Figura 46** se muestra la relación molar observada de Pt detectada en el ICP-MS en cada pocillo de la placa e IgE (moles) empleada para la calibración. Es interesante señalar que se obtiene una relación lineal para esta relación, con una pendiente de 1264 unidades, la cual concuerda con la amplificación de la señal esperada.

La inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs contiene una media de 11,13 PtNCs por Ab y cada NC está compuesta por 116 átomos de Pt en promedio, es decir, la amplificación esperada es de ~ 1291 , valor que concuerda con la pendiente observada.

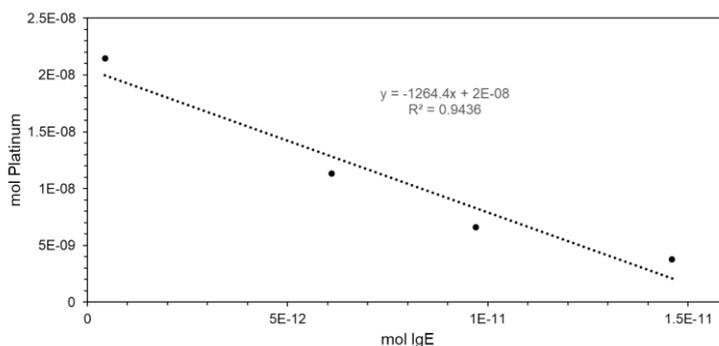


Figura 46: Factor de amplificación de la detección de IgE: representación de los moles de Pt determinados por ICP-MS por pocillo de la placa ELISA frente a los moles de IgE incubados durante el inmunoensayo competitivo

A la vista de los buenos resultados obtenidos para la detección elemental de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs que además son comprables a los publicados para otros métodos de cuantificación de IgE en suero (**Tabla 4**), se optó por emplear la detección por ICP-MS para la determinación de IgE en 4 muestras de sueros humanos (control). En este caso, previamente, se estudió el efecto que la matriz del suero puede tener en la determinación de IgE con la metodología propuesta. Para ello, se añadieron concentraciones de $1 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-3}$, y $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de IgE a un suero comercial diluido 1:1000. Los resultados obtenidos para el análisis de estas muestras son mostrados en la curva de inhibición (**Figura 45b**) como rombos grises. Como se puede observar, los puntos correspondientes a las muestras con adiciones se ajustan perfectamente a la gráfica de calibración. Es decir, las pendientes de ambas curvas son idénticas, demostrando que no existen efectos de matriz al emplear las muestras de suero y por lo tanto que es posible cuantificar la IgE en muestras de suero diluidas mediante una calibración con patrón de IgE en PBS.

Los resultados obtenidos para las concentraciones de IgE en 4 sueros humanos (3 de personas control y un suero comercial) se recogen en la **Tabla 7**. Como se

puede observar, la concentración de IgE en las muestras de suero varía en un amplio rango de concentración, desde $0,052 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $0,285 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para validar los resultados obtenidos en la determinación de IgE con la metodología de análisis propuesta, se analizaron las mismas muestras de suero con un Kit ELISA comercial, mostrando unos valores para la concentración de IgE que concuerdan con los obtenidos empleando la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por espectrometría de masas elemental.

Tabla 7: Resultados obtenidos para la cuantificación de IgE en muestras de suero humano empleando la metodología desarrollada basada en el empleo de una inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs con detección por ICP-MS. Además, se incluye en la Tabla la concentración de IgE obtenida con un Kit ELISA comercial. En ambos casos los valores de la desviación estándar corresponden a la incertidumbre asociada a la medida de tres réplicas independientes de la misma muestra.

Muestra	[IgE] - Anti-h-IgE:PtNCs & ICP-MS ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[IgE] - Kit ELISA comercial ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
#Suero comercial	$0,285 \pm 0,030$	$0,280 \pm 0,025$
#Suero 1	$0,214 \pm 0,012$	$0,226 \pm 0,020$
#Suero 2	$0,0914 \pm 0,013$	$0,0893 \pm 0,012$
#Suero 3	$0,0520 \pm 0,0091$	$0,0536 \pm 0,0099$

D.5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen de los estudios realizados en el Capítulo I de la Tesis Doctoral son las siguientes:

- ✓ Se han sintetizado PtNCs fluorescentes y solubles en agua mediante una estrategia de síntesis *bottom-up* empleando ácido lipoico como ligando y borohidruro sódico como agente reductor en una relación molar Pt:LA:NaBH₄, 1:5:1. Los PtNCs sintetizados presentan un par fluorescente $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 455/620$ nm.
- ✓ Se ha realizado una caracterización de los PtNCs en términos de rendimiento, dispersión del tamaño, estabilidad, número de átomos de Pt por NC, y concentración de Pt, mediante el empleo de técnicas de fluorescencia, DLS, HR-TEM e ICP-MS. Se ha obtenido información sobre el rendimiento de la síntesis (84 %), su tamaño y distribución de tamaños ($1,49 \pm 0,03$ nm), concentración de los PtNCs ($4,06 \times 10^{15}$ NCs/mL) y número de átomos promedio de Pt por NC (117 átomos). Esta información es crucial para desarrollar métodos de bioconjugación con los PtNCs que sean reproducibles.
- ✓ Se han evaluado los PtNCs sintetizados como marcas bimodales (detección fluorescente y por espectrometría de masas elemental) para ser su bioconjugación a un Ab tipo IgG. Como prueba de concepto se ha usado el anticuerpo anti-h-IgE para generar la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs específica del biomarcador de la enfermedad alérgica IgE. Para ello se ha realizado:
 - La optimización de la bioconjugación para lograr una relación molar óptima anticuerpo:PtNCs que mantenga tanto la funcionalidad del anticuerpo como las propiedades luminiscentes de los PtNCs (mediante medidas de fluorescencia y ELISA indirecto espectrofotométrico). Se ha observado que la relación

molar anticuerpo:AuNC que cumple estos requisitos es de 1:20 en la síntesis.

- Tras la caracterización de la inmunosonda Anti-h-IgE:PtNCs se obtuvo que de media contiene $\sim 11,13$ PtNCs por Ab (tipo IgG), correspondiendo a ~ 1300 átomos de Pt por Ab (factor de amplificación).
- ✓ Se ha evaluado el uso de los PtNCs como marcas con detección fluorescente y elemental el emplear las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs en el desarrollo de un inmunoensayo competitivo en placa para la determinación de IgE. Se ha encontrado que la detección elemental por ICP-MS presenta mejor límite de detección del biomarcador frente a la detección fluorescente ($0,6$ y $0,08$ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente), si bien cabe destacar que en ambos casos los límites de detección son mejores que los obtenidos con los kits comerciales ELISA que se emplean actualmente para la determinación de IgE (12 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- ✓ La amplificación de la señal de la detección de la IgE lograda con la detección por ICP-MS (pendiente de la curva de calibración) coincide en el factor de amplificación calculado que es ~ 1300 .
- ✓ Se ha evaluado la aplicación analítica de la metodología propuesta (inmunoensayo en formato competitivo) para el análisis de IgE en muestras de suero humano. Los resultados han demostrado que la determinación de IgE es factible con este método sin apenas pretratamiento de la muestra, mostrando además resultados de acuerdo con los obtenidos mediante un kit ELISA comercial.
- ✓ A la vista de los resultados experimentales obtenidos, se demuestra el alto potencial que poseen el tipo de NPs sintetizadas (PtNCs) para su uso como marcadores altamente sensibles en inmunoensayos, especialmente por detección elemental. Además, en nuestros experimentos por detección elemental, se ha monitorizado el isótopo ^{195}Pt que tiene una abundancia isotópica del 33,8%. Por lo tanto, el LOD por ICP-MS debería

mejorarse con PtNCs enriquecidos isotópicamente, tal y como se detalla en la introducción de este capítulo.

- ✓ Además, la combinación de la inmunosonda PtNCs con la detección por ICP-MS abre la puerta al análisis múltiple de proteínas mediante el uso de NCs enriquecidos isotópicamente. En el caso particular del platino, es posible obtener hasta 5 inmunosondas diferentes por sus 5 isótopos estables que presenta: ^{192}Pt , ^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt y ^{198}Pt , con el mismo protocolo de síntesis, aumentando así tanto la capacidad de *multiplexing* como la sensibilidad del análisis.

E. CAPÍTULO II

Estudios de imaging múltiple de proteínas relacionadas con la DMAE en secciones de tejidos oculares humanos empleando diferentes nanoclústeres metálicos como marca elemental y análisis por ablación láser ICP-MS

E.1. INTRODUCCIÓN

En la Introducción General de la Tesis Doctoral se describe detalladamente la fisiopatología de la DMAE, así como los signos para su diagnóstico clínicos. En los primeros estadios de la enfermedad (DMAE temprana) aparecen depósitos extracelulares (denominados drusas) que están localizados entre la capa del EPR y la capa semipermeable denominada membrana de Bruch (MBr). Las drusas, aunque se pueden presentar de manera basal en un ojo envejecido, incrementan en número y tamaño con la edad, dificultando el transporte de nutrientes y oxígeno a las capas más internas de la retina lo que provoca una disfunción en los fotorreceptores (PR)¹. En la imagen óptica de la **Figura 47** se puede observar una acumulación de drusas en una sección de tejido humano, así como drusas individuales a lo largo de la monocapa de células de EPR (y el complejo EPR-MBr-coroide).

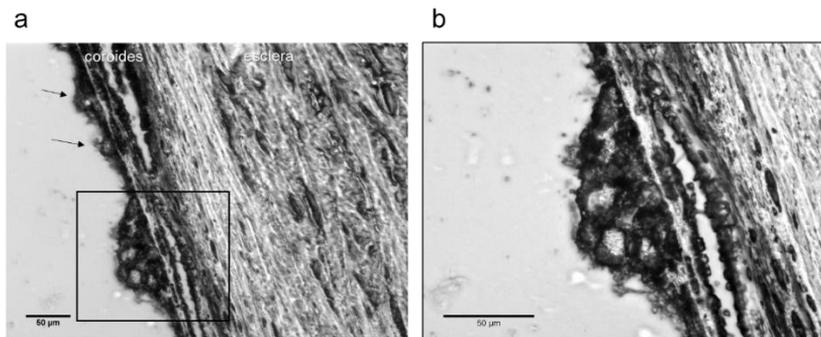


Figura 47: Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión para una sección de tejido ocular procedente de un donante que padece DMAE donde se pueden visualizar las acumulaciones de drusas en la región del EPR. a) Drusas individuales (señaladas con una flecha) y acumulación grupal de drusas (cuadrado)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

Una DMAE en estado temprano (o inicial) evoluciona a un estado tardío el cual puede mostrarse en dos fenotipos diferentes: neovascularización (DMAE húmeda o exudativa) o atrofia geográfica (DMAE seca, o no exudativa). Es la DMAE seca el tipo de DMAE más común y más grave puesto que la pérdida de visión es irreversible y se relaciona directamente con la disfunción focal del EPR debido al

¹ P. Mitchell, G. Liew, B. Gopinath, T.Y. Wong, Age-related macular degeneration, Lancet 392 (2018) 1147–1159.

crecimiento incontrolado de las drusas, que finalmente provocan la muerte de los fotorreceptores y por ende la pérdida de visión². Por ello entender la formación de las drusas y, en particular, su composición, puede ayudar a comprender no sólo su crecimiento en la fase tardía de la enfermedad, sino también relacionarlo con la búsqueda de tratamientos eficaces para disminuir su progresión, los cuales son muy escasos a día de hoy para este fenotipo de DMAE³.

En la Introducción General se comenta además que se han identificado lípidos, proteínas, y minerales entre los componentes más abundantes de estos depósitos extracelulares⁴⁻⁶. En este sentido resulta interesante estudiar la acumulación y localización de ciertas proteínas en las drusas debido a su posible relación en procesos biológicos concretos que pueden estar implicados en el desarrollo de la enfermedad (p.ej., procesos de estrés oxidativo e inflamación consecuente del complejo celular EPR-MBr-PR). Teniendo en cuenta estudios previos del grupo de investigación en esta temática junto publicaciones recientes en la bibliografía^{6,7}, en el Capítulo II de la Tesis Doctoral se desarrolló una metodología analítica para estudiar la localización y determinar el contenido de tres proteínas implicadas en la formación de las drusas: la metalotioneína 1/2 (MT1/2), el factor H del complemento (CFH), y la proteína precursora β -amiloide (APP). La relación de las estas proteínas con la DMAE está recogida en la Introducción General de la Tesis Doctoral (**Sección A.1.2.1**).

² H. Al-Hussaini, M. Schneiders, P. Lundh, G. Jeffery, Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells, *Exp. Eye Res.* 88 (2009) 610–612.

³ H.M. Zając-Pytrus, A. Pilecka, A. Turno-Kręcicka, J. Adamic-Mroczek, M. Misiuk-Hojło The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The Current Concepts of Pathogenesis and Prospects for Treatment. *Adv Clin Exp Med.* 6, (2015) 1099-104.

⁴ C.A. Curcio, J. B. Presley, G. Malek, N.E. Medeiros, D.V. Avery, H.S. Kruth, Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy, *Exp. Eye Res.* 81 (2005) 731–741.

⁵ J.M. Flinn, P. Kakalec, R. Tappero, B. Jones, I. Lengyel, Correlations in distribution and concentration of calcium, copper and iron with zinc in isolated extracellular deposits associated with age-related macular degeneration, *Metallomics* 6 (2014) 1223–1228.

⁶ J.W. Crabb, The proteomics of drusen, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4 (2014) a017194

⁷ R.B. Thompson, V. Reffatto, J.G. Bundy, E. Kortvely, J.M. Flinn, A. Lanzirrotti, I. Lengyel, Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 1565–1570.

Tradicionalmente, los métodos más utilizados para la localización de proteínas en tejidos son los métodos IHC basados en la reacción antígeno-anticuerpo. Estos pueden presentar una detección colorimétrica (deposición de un producto coloreado tras una reacción enzimática), o detección mediante IF empleando anticuerpos etiquetados con un fluoróforo (**Sección A.2.2.4**). Típicamente, la detección fluorescente presenta una mayor sensibilidad en comparación con los ensayos colorimétricos y son los más empleados en laboratorios clínicos. Sin embargo, tal y como se discute en la Introducción General, estos métodos presentan varias limitaciones en su uso, como son la dificultad para realizar ensayos de detección múltiple debido al solapamiento de las bandas espectrales de los fluoróforos, problemas para medir simultáneamente biomoléculas que difieren en su abundancia, así como problemas asociados a la fotosensibilidad y pérdida de fluorescencia de las marcas. Además, los procedimientos de IF están limitados también por la autofluorescencia de la propia muestra, especialmente en regiones de células pigmentadas, como ocurre con las células del EPR u otras zonas del tejido ocular (p.ej., región *pars plicata* de los cuerpos ciliares). Por tanto, las medidas por IF no permiten en algunos casos específicos identificar las moléculas diana o llevar cabo un análisis cuantitativo absoluto.

Estos problemas asociados a las medidas por IF pueden superarse en gran medida con el análisis empleando la técnica de ablación láser (LA) acoplada a ICP-MS. Esta técnica de *imaging* (**Sección A.4.2.1**) junto con la estrategia de marcaje específico de inmunosondas metálicas (anticuerpos etiquetados con marcas elementales) constituye una alternativa muy prometedora a la IHC e IF convencional^{8,9}. Esta estrategia basada en la reacción antígeno-anticuerpo, empleando como Ab específico una inmunosonda metálica permite la determinación específica de biomoléculas con

⁸ D.P. Bishop, N. Cole, T. Zhang, P.A. Doble, D.J. Hare, A guide to integrating immunohistochemistry and chemical imaging, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 3770–3787.

⁹ M. Cruz-Alonso, A. Lores-Padín, E. Valencia, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 549–558.

una alta sensibilidad y posibilidad de análisis multiparamétrico¹⁰. Además, permite detectar la distribución de proteínas específicas dentro de los tejidos biológicos con una resolución micrométrica y en regiones que, debido a la autofluorescencia del tejido, no podrían ser analizadas por IF convencional.

En cuanto a las etiquetas metálicas más usadas en este campo, tal y como se recoge en la Introducción General, cabe destacar el empleo de complejos que enlazan metales, como los complejos quelantes de Ln (p.ej., DOTA y DTPA), y polímeros que contienen varios complejos quelantes de Ln para aumentar la sensibilidad de la detección (p.ej., MAXPAR®), los cuales permiten la detección múltiparamétrica de biomarcadores en diferentes tejidos biológicos^{11,12}. Por otro lado, cabe destacar también el empleo de MNPs cuasi-esféricas de 5 a 50 nm de diámetro¹³, que permiten una elevada amplificación de la señal, aunque se han descrito importantes adsorciones no específicas de las NPs en las muestras, además de que su elevado tamaño puede dificultar la detección del antígeno debido a impedimentos estéricos. En este sentido, los MNCs se presentan como marcas ideales para llevar a cabo el *imaging* en tejidos, puesto que permiten una elevada amplificación de la señal sin comprometer la funcionalidad del Ab (hay cientos de átomos de un mismo metal en un tamaño nanométrico).

Por lo tanto, en este Capítulo II se plantea la obtención de imágenes 2D de la distribución de tres proteínas (MT1/2, CFH y APP) de manera simultánea en la

¹⁰ T.C. de Bang, S. Husted, Lanthanide elements as labels for multiplexed and targeted analysis of proteins, DNA and RNA using inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 45–52.

¹¹ C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne, Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8177–8183.

¹² B. Neumann, S. Hosl, K. Schwab, F. Theuring, N. Jakubowski, Multiplex LA-ICP-MS bio-imaging of brain tissue of a parkinsonian mouse model stained with metal coded affinity-tagged antibodies and coated with indium-spiked commercial inks as internal standards, *J. Neurosci. Methods* 334 (2020) 108591.

¹³ M. Tvrdonova, M. Vlcnovska, L.P. Vanickova, V. Kanicky, V. Adam, L. Ascher, N. Jakubowski, M. Vaculovicova, T. Vaculovic, Gold nanoparticles as labels for immunochemical analysis using laser ablation inductively coupled plasma massspectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 559–564.

misma región de tejido ocular empleando LA-ICP-MS y haciendo uso de las inmunosondas específicas etiquetadas con tres MNCs diferentes. En concreto, se emplean los PtNCs optimizados y evaluados como marcas metálicas en el Capítulo I de la Tesis Doctoral, así como AuNCs y AgNCs que ya han sido evaluados con éxito para el *imaging* de proteínas en secciones de tejidos^{14,15}. La metodología de análisis propuesta se aplica a la localización simultánea de MT1/2, CFH, y APP en diferentes regiones de secciones de tejido ocular de donantes control y donantes con DMAE (en drusas localizadas en el EPR).

¹⁴ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro, Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease, *Talanta* 197 (2019) 413–421.

¹⁵ E. Valencia, M. Cruz-Alonso, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández, R. Pereiro, Fluorescent silver nanoclusters as antibody label in a competitive immunoassay for the complement factor H, *Microchim. Acta* 186 (2019) 429.

E.2. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es el desarrollo de una metodología para el *imaging* múltiple de tres proteínas relacionadas con la DMAE, la MT1/2, la CFH y la APP, en secciones de tejidos oculares (FPEE) empleando una estrategia de inmunohistoquímica múltiple usando anticuerpos primarios etiquetados con tres MNCs diferentes: AuNCs, AgNCS y PtNCs para su medida por LA-ICP-MS. Este objetivo general se realizará a través de las siguientes etapas experimentales:

- ✓ Estudio de los PtNCs como marcas para su empleo en *bioimaging* de proteínas de tejidos. Bioconjugación de los PtNCs sintetizados en el Capítulo I, a los anticuerpos específicos de las tres proteínas: Anti-human MTs-1/2, Anti-h-CFH y Anti-h-APP.
 - Evaluación de posibles interacciones inespecíficas con los tejidos biológicos durante los procedimientos de IHC mediante el uso de bloqueantes de los ácidos carboxílicos de los ligandos del recubrimiento del NCs.
- ✓ Síntesis de tres inmunosondas y su caracterización para conocer los factores de amplificación: anti-h.MT-1/2:AuNCs, anti-h-CFH:Ag y anti-h-APP:Pt
- ✓ Optimización del método de LA-ICP-MS para obtener *imaging*s múltiples con adecuada resolución lateral.
 - Estudio de los métodos de adquisición del SF-ICP-MS
 - Evaluación de las condiciones de ablación (temperatura y velocidad de barrido).
- ✓ Obtención de *biomimaging*s múltiples semicuantitativos de las proteínas en estudio en regiones oculares de donantes control y con DMAE empleando una estrategia de IHC múltiple con las tres inmunosondas.

E.3. EXPERIMENTAL

E.3.1. Materiales y reactivos

E.3.1.1. Síntesis y caracterización de las inmunosondas metálicas

Los reactivos y materiales empleados para la síntesis, purificación, y bioconjugación de los MNCs solubles en agua están recogidos en la Sección Experimental General (**Sección C.2.2.1**). Los anticuerpos primarios utilizados para la síntesis de las tres inmunosondas fueron:

- Ab monoclonal de ratón Anti-MT1/2 humano (Anti-h-MT1/2) (Abcam)
- Ab policlonal de conejo Anti-CFH humano (Anti-h-CFH) (Abcam)
- Ab policlonal de conejo Anti-APP humana dominio KPI (Anti-h-APP) (Merck Millipore).

Adicionalmente, se empleó clorhidrato de hidroxilamina ($\geq 99\%$ de polvo; Sigma-Aldrich) para bloquear los ácidos carboxílicos de los ligandos de los MNCs tras la bioconjugación con el objetivo de disminuir las reacciones no específicas de los MNCs con las secciones de tejido ocular.

Inmunoensayo ELISA directo no competitivo. Los reactivos utilizados para para cuantificar el Ab disponible en las inmunosondas son: el estándar de proteína IgG de conejo (Universidad de Oviedo), Ab secundario anti-IgG con HRP contra proteínas de conejo (Sigma-Aldrich), sustrato TMB-H₂O₂ (Sigma-Aldrich), y ácido sulfúrico (95-97%, Merck Millipore). Paralelamente, para determinar el contenido metálico de las inmunosondas (Pt, Au, y Ag) se utilizó ácido clorhídrico (34-37%, análisis de trazas; VWR chemicals) y ácido nítrico (67-69%, análisis de trazas; VWR chemicals) para la digestión de los MNCs antes de su análisis por ICP-MS.

Calibrados para Au, Pt, y Ag empleando LA-ICP-MS. Para determinar la concentración metálica de las inmunosondas (concentración de Au, Pt, y Ag) se prepararon estándares de laboratorio *matrix-matched* (i.e., con una matriz similar ca la muestra). Para ello se utilizó polvo de gelatina (VWR chemicals) y disoluciones de

sales inorgánicas de los precursores metálicos de la síntesis de los MNCs (Au, Pt, y Ag).

Muestras – Secciones de tejidos oculares. Las muestras empleadas en este Capítulo II son cortes de secciones oculares FFPE, que fueron obtenidos y preparados tal y como se describe en la **Sección 3** (Experimental General). Las secciones de tejido ocular de 5 y 10 μm de grosor (para los análisis por IF y LA-ICP-MS, respectivamente) de los bloques FFPE se colocaron en portaobjetos de microscopio recubiertos en su superficie de poli-L-lisina (Electron Microscopy Sciences). Las secciones se desparafinaron con xileno (Sigma-Aldrich) y se deshidrataron empleando etanol absoluto (VWR Chemicals).

Etapas de IHC con detección fluorescente. Los reactivos empleados para las ensayos de IHC con detección fluorescente incluyen: cloruro de amonio (Panreac) para minimizar la autofluorescencia de los tejidos (sólo en el procedimiento de validación por IF), tritón X-100 (Sigma-Aldrich) para permeabilizar las secciones de tejido, albúmina de suero bovino (BSA) (polvo al 99%, Merck) y suero de cabra (Sigma-Aldrich) para bloquear las interacciones no específicas, y dihidrocloruro de 4'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) para teñir los núcleos celulares. Las etapas de lavado se llevaron a cabo con una solución salina tamponada con fosfato (10 mM PBS – 0,9% NaCl, pH 7,4) (Sigma-Aldrich) y un tensoactivo Tween 20 (Sigma-Aldrich). Además, se empleó un medio de montaje (Agilent Technologies) para proteger el tejido y mantener la señal de fluorescencia durante la visualización por microscopía. Como Ab secundario para los inmunoensayos indirectos en los procedimientos de validación se utilizó Alexa Fluor Plus (A32740) consistente en Alexa® 594:IgG anti-conejo de cabra o Alexa Fluor Plus (A32742) consistente en Alexa® 594:IgG anti-ratón de cabra, ambos de Thermo Fisher.

E.3.2. Instrumentación

En el Capítulo II de la Tesis Doctoral, los análisis por LA-ICP-MS se llevaron a cabo con el sistema LSX-213 (@213 nm) acoplado al ICP-MS de doble enfoque Element 2 (Thermo Fisher Scientific) trabajando en modo de baja resolución de

masa. Como se describe en la Instrumentación General, la cámara de ablación del sistema láser fue una cámara refrigerada para mantener la temperatura de la muestra constante a -20°C ¹⁶. Los parámetros experimentales aplicados para el análisis LA-ICP-MS se recogen en la **Tabla 8**, tanto para los estudios en los que se obtiene *imaging* individual de una única proteína, como para el *imaging* múltiple (3 proteínas en la misma sección de tejido).

En cuanto a las medidas por fluorescencia y microscopía óptica, se utilizaron un microscopio Leica (DM6000, cámara digital DFC 310 Fx Leica) para obtener imágenes de las secciones de tejido tras los inmunoensayos. El microscopio está equipado con objetivos de 10×, 20×, y 40× y se utilizó un filtro RGB (rojo, verde, azul) para excitar la tinción DAPI ($\lambda_{\text{ex}}=358$ nm y $\lambda_{\text{em}}=461$ nm, emisión azul) y el fluoróforo Alexa® ($\lambda_{\text{ex}}=594$ nm y $\lambda_{\text{em}}=620$ nm, emisión roja). También se obtuvieron imágenes de fase de contraste de los tejidos. Para ajustar la exposición y la ganancia del microscopio para la adquisición de las imágenes, se analizó primero un control negativo del inmunoensayo (sin adición de Ab primario). Las imágenes de fluorescencia se procesaron con el software ImageJ (National Institute of Health). Además, la detección de los ELISA se llevó a cabo con un lector de placas de absorbancia (ELX800; Bio-Tek).

¹⁶ I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 88–96.

Tabla 8: Condiciones de operación para los sistemas de ablación láser e ICP-MS para el análisis de proteínas en secciones de tejido ocular por LA-ICP-MS utilizando inmunosondas con MNCs (AuNCs, PtNCs, y AgNCs).

ICP-MS Element II (Thermo Fischer Scientific)		
Parámetros	Imaging individual	Imaging múltiple
RF potencia	1350 W	
Flujo de gas - <i>plasma</i>	16 L·min ⁻¹	
Flujo de gas - auxiliar	1,15 L·min ⁻¹	
Flujo de gas de nebulización	0,7 L·min ⁻¹	
Isótopos monitorizados	¹⁰⁷ Ag o ¹⁹⁵ Pt o ¹⁹⁷ Au	¹⁰⁷ Ag & ¹⁹⁵ Pt & ¹⁹⁷ Au
<i>Dwell time</i>	0,01 s	
Ventana de masas	75	
Tiempo de adquisición	0,23 s	1,74 s
Nº de medidas por pico	30	
Resolución	Baja resolución	
Sistema LA LSX-213 (Teledyne Cetac Technologies)		
Diámetro del spot	10 µm	
Energía del láser	1,68 mJ → retina and RPE 2,4 mJ → cuerpos ciliares	
Velocidad de barrido	5 µm·s ⁻¹	
Frecuencia de repetición	20 Hz	
Modo de ablación	Multi line scan	
Gas de transporte (He)	1,0 L·min ⁻¹	
Temperatura de la muestra	-20°C	

Análisis de microarrays de proteínas. Los análisis de microarrays de las proteínas humanas APP, CFH, y MT1/2 en ojos de donantes *post-mortem* se realizó utilizando la plataforma de array Illumina BeadChip (HumanHT-12 v4.0 Expression BeadChip Kit). El marcaje de ARNc y la hibridación al chip y el análisis de los datos del array se realizaron en la Plataforma de Análisis Genómico (CIC bioGUNE, Derio).

Fluoroinmunoensayo. Las imágenes del fluoroinmunoensayo llevado a cabo para el estudio de penetración del Ab en el tejido (empleando la inmunosonda Anti-h-MT-1/2:AuNCs) se obtuvieron con el microscopio láser confocal (DM IRE2; Leica) empleando objetivos de inmersión en aceite de 40× y utilizando un fotomultiplicador y un detector híbrido. Se empleó una línea de excitación láser de 405 nm (para las mediciones del bioconjugado y el DAPI).

E.3.3. Procedimientos experimentales

E.3.3.1. Síntesis de los MNCs (PtNCs, AuNCs, y AgNCs)

Los protocolos llevados a cabo para la síntesis de los tres MNCs tiolados solubles en agua siguen siempre una estrategia *bottom-up* por reducción química del metal mediante el empleo de borohidruro de sodio (ver sección Experimental donde están recogidos los tres protocolos). Para la síntesis de los PtNCs el protocolo seguido es el descrito con detalle en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral, los AuNCs fueron sintetizados siguiendo el protocolo descrito por Cruz-Alonso et al.¹⁴, y los AgNCs siguiendo el protocolo descrito por Valencia et al.¹⁵. Los MNCs fueron purificados por ultracentrifugación utilizando unidades de filtro Amicon de 3 kDa de tamaño de poro y posteriormente fueron llevados a volumen inicial con disoluciones tampón adecuados para realizar la bioconjugación a los anticuerpos específicos: tampón PBS para PtNCs y AuNCs, y TRIS-EDTA para AgNCs. Las caracterizaciones de cada MNCs fueron llevadas a cabo mediante medidas de fluorescencia, HR-TEM e ICP-MS (ver Experimental General).

E.3.3.2. Síntesis y bloqueo de las inmunosondas metálicas

El marcaje de los anticuerpos primarios específicos (Anti-h-MT1/2, Anti-h-CFH, y Anti-h-APP) para las proteínas de interés en los tejidos oculares se realizó primero con los PtNCs como etiqueta elemental evaluar en primer lugar la distribución individual de cada una de las proteínas en tres secciones de tejido ocular consecutivas del mismo donante. La bioconjugación de los PtNCs a cada uno de los anti-

cuerpos primarios (todos ellos tipo IgG, 150 kDa) se llevó a cabo siguiendo la química de la carbodiimida y empleando la relación molar Ab:PtNCs optimizada en el Capítulo I de la Tesis Doctoral (relación molar teórica 1:20 Ab:PtNCs en la disolución de síntesis). Para ello, se mezclaron 198 μL de la disolución de PtNCs (en tampón PBS) con 100 μL de cada Ab primario ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A continuación, se inició la agitación mecánica en el vórtex y se añadieron los reactivos para llevar a cabo el enlace amida entre el ácido carboxílico del ligando tiolado (LA) y la amina primaria del Ab (proporción molar 1:1500:1500 Ab:EDC:NHS). Tras 2 h de agitación en vórtex a temperatura ambiente, se procedió a la purificación por ultrafiltración (Amicon de 100 kDa de tamaño de poro), eliminando así el exceso de PtNCs no conjugados.

Además, para evitar interacciones inespecíficas entre los PtNCs y los tejidos biológicos, fue necesario una última etapa de bloqueo de los grupos carboxílicos libres (que recubren la nanoestructura). Para ello, se añadió una amina primaria (hidroxilamina) a las soluciones de las inmunosondas marcadas purificadas con una proporción molar de 1:50 PtNCs:hidroxilamina. Tras 2 h de agitación, las disoluciones que contienen las inmunosondas metálicas bloqueadas, se vuelven a purificar por ultrafiltración (utilizando Amicon de 100 kDa de tamaño de poro). Las inmunosondas purificadas (Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y anti-h-APP:PtNCs) se almacenaron por separado en tampón PBS a 4 °C (concentración $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, referida al Ab).

Para el análisis múltiple (*imaging* múltiple) de MT1/2, CFH, y APP en la misma sección de tejido, cada Ab se marcó con un tipo diferente de MNCs (AuNCs como etiqueta de Anti-h-MT1/2, AgNCs como etiqueta de Anti-h-CFH, y PtNCs como etiqueta de Anti-h-APP), siguiendo un protocolo similar al descrito previamente para los PtNCs (se emplearon relaciones molares de Ab:MNCs de 1:3 para AuNCs, 1:3 para AgNCs, y 1:20 para PtNCs). En cuanto al paso de bloqueo con hidroxilamina, se utilizó una relación molar de 1:50 Ab:MNCs para los AuNCs y PtNCs, mientras que para los AgNCs se utilizó una relación molar de 1:20. Por último, las suspensiones de las inmunosondas marcadas con MNCs purificadas se añadieron en el mismo

tubo Eppendorf y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior (concentración del Ab, 20 µg mL⁻¹).

E.3.3.3. Caracterización de las inmunosondas

Para obtener el *imaging* de las proteínas por LA-ICP-MS con MNCs como etiquetas, las inmunosondas marcadas deben ser caracterizadas para conocer sus factores de amplificación. Para ello, se debe calcular tanto la concentración de Ab disponible para el reconocimiento como la concentración de metal en cada una de las inmunosondas. Así, para los tres MNCs empleados se realizó un procedimiento similar al descrito por Cruz-Alonso et al.¹⁷ para los AuNCs. Para la caracterización de las inmunosondas, fueron necesarios dos tipos de experimentos. Por un lado, se utilizó un ELISA directo con un estándar de proteína IgG de conejo (producido con una concentración conocida en la unidad de "Preparados de Biotecnología" de los SCTs de la Universidad de Oviedo) para determinar la concentración disponible de Ab en las inmunosondas. Por otro lado, las inmunosondas marcadas fueron digeridas con agua regia (PtNCs y AuNCs) o ácido nítrico (AgNCs) durante 20 min en un baño de ultrasonidos y posteriormente diluidas en ácido nítrico al 2% para determinar la concentración de metal por inmunosonda mediante análisis por ICP-MS (nebulización convencional).

E.3.3.4. Protocolos para los inmunoensayos en tejidos empleando las inmunosondas marcadas con MNCs y fluoróforos

Los tejidos (10 µm o 5 µm de espesor para análisis por MS o fluorescencia, respectivamente) previamente depositados en los portaobjetos de microscopio se deben desparafinar para proceder a la etapa de IHC. El protocolo de desparafinación e rehidratación de los cortes se recoge en la **Sección C.4.6**. Tras lavar los cortes tres

¹⁷ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90 (2018) 12145–12151.

veces (3x10 min) con PBS 1x, estos estarían listos para llevar a cabo las etapas del inmunoensayo para la detección de las proteínas diana.

Protocolo de IHC con detección por ICP-MS. En la **Figura 48** se muestran las etapas que se llevan a cabo en el inmunoensayo para la detección por LA-ICP-MS, tanto para la determinación de una única proteína como para el caso tres proteínas (parte superior e inferior de la imagen, respectivamente). De manera resumida son necesarias las siguientes etapas: (1) se permeabiliza el tejido añadiendo una disolución de Tritón X-100 al 0,1% en PBS 1x (5 min), y se lava con PBS, (2) se incuba durante 30 min a temperatura ambiente el agente bloqueante (disolución de BSA al 0,1% y suero de cabra al 10% en PBS 1x), y (3) la última etapa de incubación de la inmunosonda es diferente dependiendo del inmunoensayo: (3a) para el imaging individual (**Figura 48a**) se emplean los PtNCs como marca para generar tres inmunosondas específicas para la identificación de MT1/2, CFH, y APP de manera consecutiva e independiente en tres secciones de tejido ocular. De este modo, las tres inmunosondas (Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) se añadieron a secciones de tejidos independientes y se incubaron a 4°C en una cámara humidificada toda la noche, (3b) para el imaging múltiple (**Figura 48b**) se añadió a la sección de tejido una mezcla de las inmunosondas marcadas (Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-CFH:AgNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) y se incubaron a 4°C en una cámara humidificada toda la noche, y (4) para favorecer la eliminación de las inmunosondas añadidas en exceso o posibles interacciones inespecíficas con el tejido, se realizaron varias fases de lavado con PBS tras la incubación nocturna. Finalmente, las secciones de tejido marcadas se almacenaron a -20°C hasta el análisis por LA-ICP-MS. Las imágenes 2D para visualizar la distribución de las proteínas se construyeron siguiendo las señales de intensidad para el isótopo $^{195}\text{Pt}^+$ en el caso del imaging individual y con los isótopos $^{107}\text{Au}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$, y $^{107}\text{Ag}^+$ para el imaging múltiple.

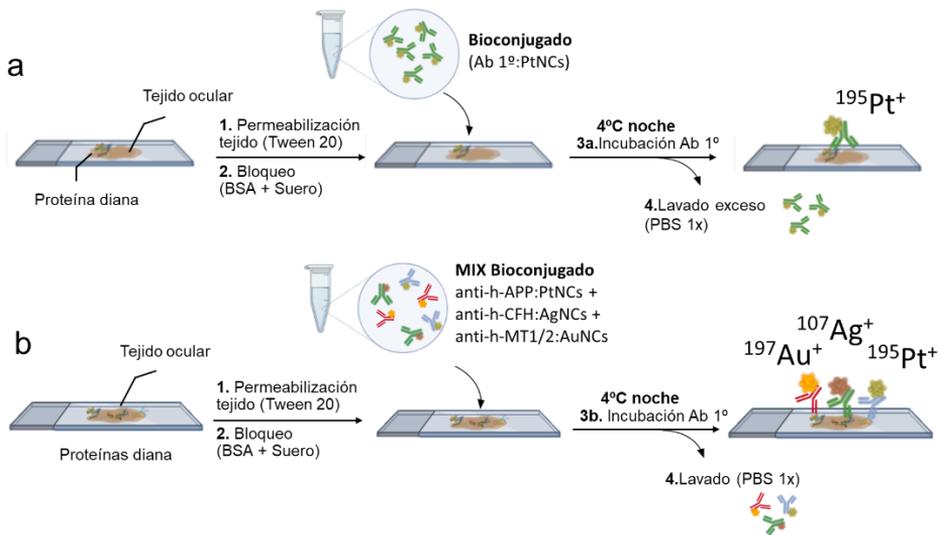


Figura 48: Esquema del protocolo ICH empleado con las inmunosondas metálicas para detección de las proteínas de interés por LA-ICP-MS (se monitorizan las señales $^{195}\text{Pt}^+$, $^{197}\text{Au}^+$ y $^{107}\text{Ag}^+$). a) *Imaging individual* empleando los PtNCs bioconjugados a cada uno de los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

Protocolo de IHC con detección fluorescente empleando un fluoróforo.

En la **Figura 49a** se muestra el protocolo seguido para realizar el *imaging* de una proteína por detección fluorescente empleando como marca un fluoróforo Alexa. Para validar la distribución de las proteínas estudiada en las secciones de tejido ocular mediante la metodología de análisis propuesta por LA-ICP-MS utilizando los MNCs como etiqueta, se realizó un protocolo de IF convencional con Alexa® 594. Tras las etapas de permeabilización y bloqueo se añadieron de manera independiente (i.e., en tres secciones de tejido consecutivas: tejidos oculares FFPE de 5 μm de grosor de un mismo donante) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del Ab primario (Anti-h-CFH, Anti-h-APP o Anti-h-MT1/2 sin bioconjugar) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Tras la primera incubación (y los pasos posteriores de lavado con PBS), se añadió el correspondiente Alexa® 594 (diluido 1:500 en un tampón PBS que contenía 0,1% de BSA + 10% de suero de cabra) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h. Tras los pasos de lavado con PBS, se añadió al tejido una solución de DAPI para teñir el núcleo celular (10 min a temperatura ambiente en oscuridad). Por último, se lavó el

tejido con PBS, se añadió el medio de montaje de fluorescencia, y se colocó finalmente el cubreobjetos. El tejido se secó durante 1 h y se almacenó a -20°C hasta su análisis por fluorescencia.

Protocolo de IHC con detección fluorescente empleando MNCs como marca. Teniendo en cuenta las propiedades luminiscentes de los MNCs, también se puede llevar a cabo una detección fluorescente sin emplear fluoróforos convencionales. De este modo también se realizaron estudios donde se empleó detección por fluorescencia siguiendo la emisión de la marca (se emplearon AuNCs). En concreto, para llevar a cabo el estudio de la penetración de las inmunosondas en las secciones de tejido de $10\ \mu\text{m}$ se realizó un protocolo similar al detallado con anterioridad (**Figura 49b**). En este caso, se produce una detección directa de la fluorescencia donde el Ab primario (Anti-h-MT1/2) es etiquetado con los AuNCs (i.e., el Ab secundario marcado con el fluoróforo Alexa® 594 no es necesario). Los demás pasos son los mismos que se describen en la **Figura 49a** para el protocolo de IHC con detección fluorescente empleando un fluoróforo. La detección se lleva a cabo mediante microscopía láser confocal ($\lambda_{\text{ex}} = 405\ \text{nm}$).

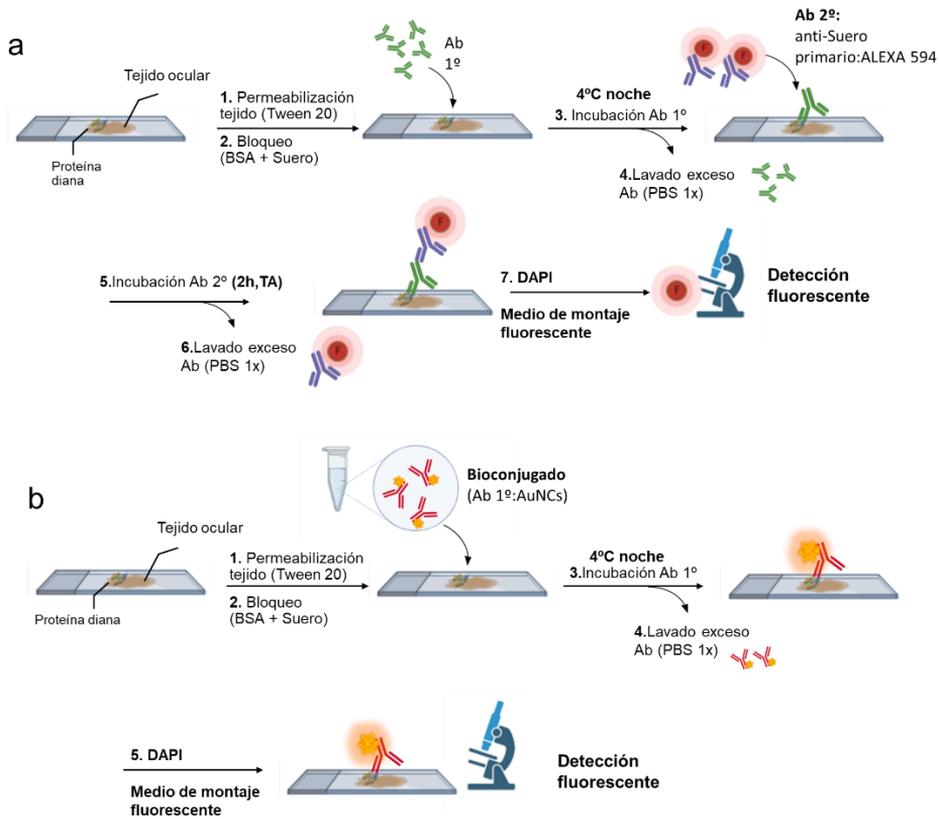


Figura 49: Esquema del protocolo de IHC seguido con los tejidos oculares para la detección fluorescente de las proteínas. a) Empleando un fluoróforo Alexa® 594, y b) Empleando la inmunosonda Anti-h-MT1/2: AuNCs donde se realiza la detección directa de la fluorescencia de los AuNCs. TA = temperatura ambiente.

E.3.3.5. *Imaging* de proteínas en secciones de tejido ocular mediante LA-ICP-MS

Para llevar a cabo los análisis de los tejidos empleando LA-ICP-MS, tanto el sistema láser como el ICP-MS deben ser optimizados diariamente. La puesta a punto del ICP-MS se realizó utilizando una solución multielemental de 1 ng·g⁻¹ para conseguir una intensidad máxima de la señal y una baja formación de óxidos (ThO⁺/Th⁺). Por otra parte, para la optimización del sistema LA-ICP-MS se realizó el análisis de vidrio SRM NIST 612, asegurando la máxima intensidad de señal, una buena estabi-

lidad (desviación estándar relativa < 4%), una relación $^{238}\text{U}^+ / ^{232}\text{Th}^+ \sim 1$, y una relación $\text{ThO}^+ / \text{Th}^+$ inferior al 2%. A continuación, se optimizaron las condiciones de medida con los tejidos oculares, garantizando una ablación completa del espesor total del tejido (escaneo múltiple línea por línea), así como una buena resolución lateral y sensibilidad. En la **Tabla 8** se recogen las condiciones de análisis empleadas.

Por otra parte, para determinar la distribución cuantitativa de los metales de los MNCs empleados como marcas (Pt, Au, y Ag) en las secciones de tejido por LA-ICP-MS se realizó una estrategia de calibración basada en el empleo de patrones de calibración *matrix-matched*. En este caso se utilizaron estándares de gelatina elaboradas en el laboratorio y suplementadas con los metales de interés (0-25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Pt, Au, y Ag), los cuales fueron analizados por LA-ICP-MS a las mismas condiciones optimizadas para las muestras. Las gelatinas suplementadas con los metales (0-25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Pt, Au, y Ag) se midieron diariamente, antes y después de los tejidos oculares para compensar los posibles efectos de deriva del instrumento LA-ICP-MS, así como para realizar las curvas de calibrado y poder determinar la concentración de las marcas.

Las imágenes 2D con la distribución de las proteínas (MT1/2, CFH, y APP) a lo largo de las estructuras oculares analizadas con LA-ICP-MS se construyeron empleando el software ImageJ-Fiji. Para el tratamiento de los datos, se eliminó la contribución del blanco de gas (30 primeros segundos de adquisición) para trabajar con intensidades netas para cada isótopo (cuentas por segundo, cps). Finalmente, las intensidades de cada metal pudieron ser transformadas en concentración de proteína conociendo las estequiometrías de las inmunosondas (i.e., número de átomos de metal por Ab específico). El protocolo llevado a cabo para la caracterización de las inmunosondas se recoge en la Sección Experimental General (C.4.5).

□ Preparación de los patrones de gelatina para los análisis por LA-ICP-MS

En la **Figura 50** se detalla el protocolo experimental llevado a cabo para la producción de las gelatinas empleadas como patrones de calibración *matrix-matched* (0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para determinar la concentración de Pt, Au, y Ag en las secciones de tejidos. Para ello, se pesaron 0,15 g de gelatina (15% p/p de gelatina) en un tubo

Eppendorf y se añadieron diferentes volúmenes de una disolución acuosa previamente preparada de las sales precursoras (NaAuCl_4 , H_2PtCl_6 , y AgNO_3) para obtener la concentración de metal final deseada (etapas 1, 2, y 3 de la **Figura 50**). A continuación, se mezcló lenta y cuidadosamente con una punta de plástico (Etapa 4) y se llevó a un termomezclador a 60°C durante 20 min para completar su homogenización (Etapa 5). Finalmente, para generar esferas de gelatina homogéneas, se cogieron $500\ \mu\text{L}$ de cada disolución y se depositaron lentamente en la superficie de la herramienta Peltier dentro del criostato (Microm HMSSO, Thermo Fisher Scientific) a -20°C donde se construyeron las pequeñas esferas (Etapa 6). A continuación, las esferas criogénicas se cortaron con la cuchilla del criotomo y las secciones ($10\ \mu\text{m}$ de grosor al igual que los tejidos oculares) se colocaron en portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-Lisina. Finalmente, se almacenaron en el congelador a -20°C hasta su posterior uso para las medidas por LA-ICP-MS.

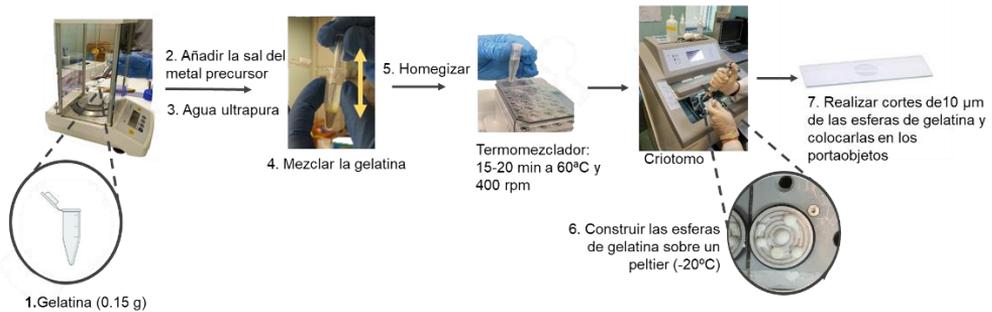


Figura 50: Protocolo llevado a cabo para preparar los patrones de gelatina para realizar la calibración por LA-ICP-MS. La gelatina es suplementada con los metales (Au, Pt y Ag) que ha sido empleados como marcas en las inmunosondas con MNCs.

Una vez preparadas las gelatinas, estas deben ser caracterizadas, es decir, se debe determinar su contenido metálico para poder emplearlas como patrones en los análisis por LA-ICP-MS. Se utilizó el ICP-MS con nebulización convencional para cuantificar la concentración de Au, Ag, y Pt en cada patrón de gelatina utilizando una calibración externa con patrones inorgánicos ácidos de Au, Ag y Pt y empleando Ir o Rh como patrón interno. Las gelatinas deben ser mineralizadas mediante una digestión ácida: $0,5\ \text{g}$ de esfera de gelatina se digirieron añadiendo $2\ \text{mL}$ de HNO_3 (65%

CAPÍTULO II

ultra trace) y 400 μL de H_2O_2 (30% p/p, Merck) asistidos por un baño de ultrasonidos (JP selecta SA) durante 15 min.

E.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Capítulo I se describe la síntesis de PtNCs que han sido empleados para la determinación de IgE en muestras de suero humano utilizando ICP-MS con nebulización convencional. Es decir, se ha utilizado una inmunosonda metálica (PtNCs) para determinar la concentración promedio de una proteína en un fluido. En este Capítulo II se propone el uso de varios MNCs como marcas para la detección de tres proteínas de manera simultánea en secciones de tejidos biológicos. El uso de estas marcas para estudios de *imaging* en tejido plantea varios retos, como son las posibles uniones inespecíficas de los MNCs al tejido, y el poder obtener una buena resolución espacial para evaluar la distribución de las proteínas en las estructuras de las muestras por LA-ICP-MS. Los AuNCs y AgNCs empleados en este Capítulo II ya han sido aplicados con éxito como marcas para el *imaging* de proteínas¹⁷; *Error! Marcador no definido.*, por lo que inicialmente se plantea un estudio más exhaustivo con los PtNCs por no haber sido todavía aplicados en análisis por LA-ICP-MS. De este modo, primero se recogen los estudios por IHC y LA-ICP-MS empleando los PtNCs como marca elemental para localizar una única proteína, si bien finalmente se emplean tres tipos de MNCs para la determinación simultánea de tres proteínas (MT1/2, CFH, y APP) en las secciones de tejidos oculares.

E.4.1. Optimización de los procedimientos de bioconjugación e IHC utilizando PtNCs como marca

A la hora de emplear los PtNCs (y en general, los MNCs) como etiquetas para llevar a cabo el *imaging* en tejidos biológicos, resulta ventajoso el bloqueo de los ácidos carboxílicos libres (de los ligandos que protegen los MNCs) tras la síntesis de la inmunosonda. Este tipo de adsorciones inespecíficas de los MNCs al tejido ya han sido recogidas por otros autores empleando tejidos oculares y de cerebro^{14,17}; *Error! Marcador no definido.*. Así mismo, se demostró con éxito que las aminas primarias, como la hidroxilamina, bloqueaban los grupos carboxílicos de las AuNCs y AgNCs, disminuyendo las adsorciones inespecíficas al tejido y permitiendo la obtención de imágenes fiables y reproducibles.

Partiendo de los estudios previos existentes para AuNCs y AgNCs, se estudiaron varias relaciones molares PtNCs:hidroxilamina (1:100, 1:50, y 1:20) tras la síntesis de la inmunosonda Anti-h-APP:PtNCs. Para elegir la concentración de hidroxilamina necesaria para disminuir eficazmente las interacciones inespecíficas de los PtNCs con el tejido, se estudió la inmunolocalización de la proteína APP en la región de la retina de tres tejidos oculares consecutivos, incubándose con cada uno de ellos la inmunosonda con diferentes bloqueos con hidroxilamina (PtNCs:hidroxilamina 1:100, 1:50, y 1:20). Además, también se estudió un tejido en el que se emplea la inmunosonda sin bloqueo con hidroxilamina. La **Figura 51** muestra el perfil de una línea de ablación obtenido por LA-ICP-MS para la señal de $^{195}\text{Pt}^+$ (proteína APP) a lo largo de las diferentes capas de la retina neurosensorial utilizando unas relaciones molares PtNCs:hidroxilamina de 1:0 (sin bloqueo), 1:20, 1:50, y 1:100 (**Figura 51a**, **50b**, **50c** y **50d**, respectivamente). En general, se puede observar cómo al disminuir la relación molar entre los PtNCs y la amina primaria, tanto la intensidad de la señal de $^{195}\text{Pt}^+$ como la unión inespecífica aumentaron, dando lugar a un perfil de $^{195}\text{Pt}^+$ casi continuo en el que no es posible distinguir entre las capas diferentes capas de la retina (**Figura 51a**). Los resultados mostraron que la relación molar 1:50 permitía diferenciar la distribución de APP entre las diferentes capas, a la vez que se mantenía una elevada sensibilidad para la señal de $^{195}\text{Pt}^+$. Por lo tanto, esta fue la relación molar empleada para todos los experimentos posteriores con los PtNCs.

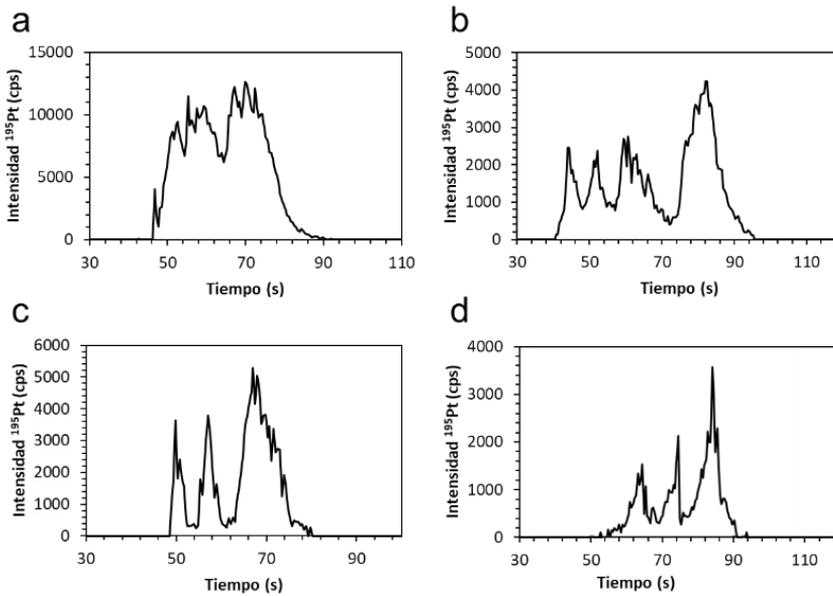


Figura 51: Perfil obtenido para la señal de $^{195}\text{Pt}^+$ en el análisis por LA-ICP-MS de una línea de ablación a lo largo de las capas de la retina en secciones consecutivas de tejido ocular humano control tras el protocolo de IHC empleando la inmunosonda Anti-h-APP:PtNCs y utilizando diferentes relaciones molares PtNCs:hidroxilamina: a) 1:0, b) 1:20, c) 1:50, y d) 1:100. La longitud de las líneas de ablación en los tejidos oculares oscila entre 165 mm y 285 mm.

E.4.2. *Imaging* de proteínas en tejidos oculares por LA-ICP-MS empleando PtNCs como marca elemental

Una vez seleccionada la relación molar adecuada para el bloqueo de los PtNCs, se procedió a la síntesis de las inmunosondas para las tres proteínas de interés (i.e., Anti-h-MT1/2:PtNCs, Anti-h-CFH:PtNCs, y Anti-h-APP:PtNCs) con el objetivo de estudiar la distribución de las proteínas en diferentes zonas de los tejidos oculares siguiendo para todas ellas la señal del $^{197}\text{Pt}^+$ (procedente de la etiqueta metálica). Aplicando las condiciones experimentales de LA-ICP-MS descritas en la **Tabla 8** (condiciones del *imaging* individual) se obtuvieron las distribuciones cualitativas individuales de las tres proteínas en la región de la retina neurosensorial. En las **Figura 52a, b, y c** se muestran respectivamente las distribuciones cualitativas de MT1/2, CFH, y APP obtenidas por LA-ICP-MS siguiendo la intensidad de la señal de $^{195}\text{Pt}^+$.

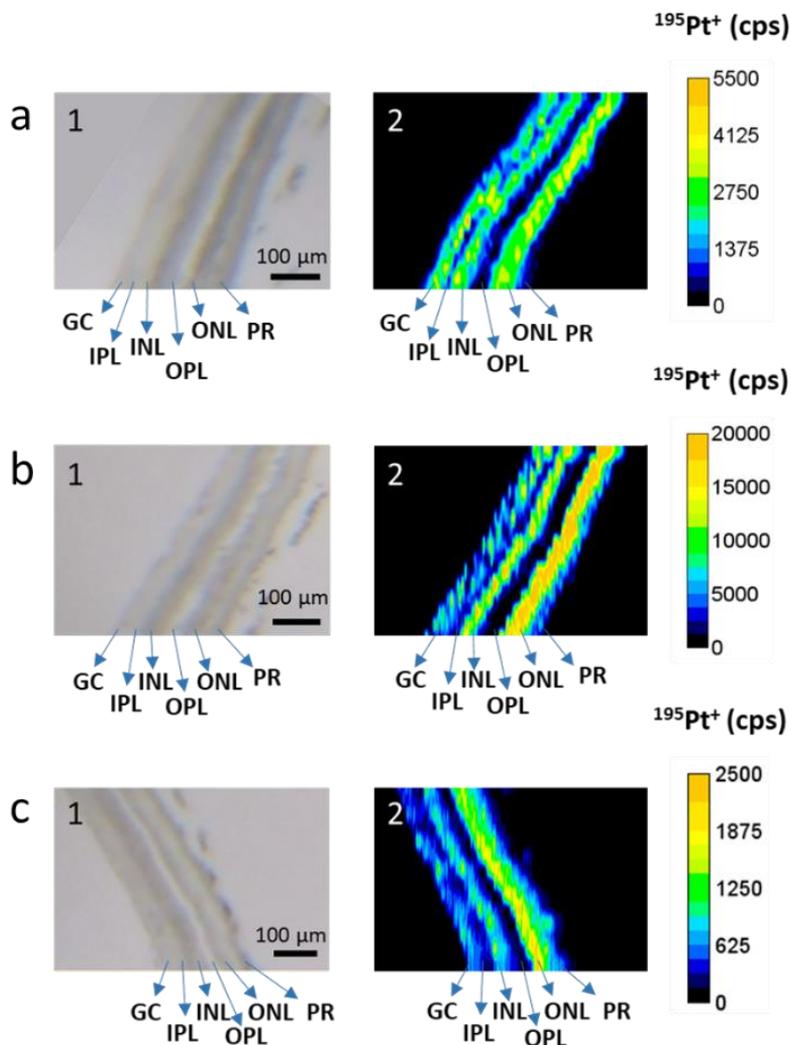


Figura 52: Distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las capas de la retina en tres secciones consecutivas de tejido ocular humano de un donante control empleando los PtNCs como etiqueta en la inmunosonda y detección por LA-ICP-MS. La columna 1 muestra en todos los casos las imágenes ópticas de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

En el caso de la MT1/2, la distribución obtenida para la proteína siguiendo la señal del $^{195}\text{Pt}^+$ (**Figura 52a**) fue comparada con las imágenes obtenidas en trabajos

previos en los que se emplearon AuNCs¹⁸ y AgNCs^{Error! Marcador no definido.} como etiquetas metálicas. De acuerdo con los estudios previos, la MT1/2 fue localizada en la capa nuclear externa (ONL), capa nuclear interna (INL) y células ganglionares (GC), con menor presencia en las capas plexiforme interna y externa (IPL u OPL, respectivamente). En el caso de la CFH y APP, estas proteínas no habían sido estudiadas previamente con inmunosondas marcadas con MNCs. Para la CFH, el *imaging* por LA-ICP-MS mostró que se localiza principalmente en la ONL y en el segmento externo de los fotorreceptores (PR), así como en la INL, con una distribución cualitativamente menor en el GC (**Figura 52b**). En el caso de la APP (**Figura 52c**), se encuentra principalmente en la ONL, con una menor presencia en la INL y el GC, de forma similar a lo observado para MT1/2 y APP. Cabe mencionar que la ausencia de expresión de las proteínas en el IPL y el OPL debe considerarse con cautela, ya que no se puede descartar pérdida de algunos tejidos o estructuras celulares durante el procesamiento de las muestras.

Para el caso de CFH y APP, las distribuciones obtenidas por LA-ICP-MS fueron validadas llevando a cabo las IHC empleando un Ab secundario marcado con Alexa® fluor 594 para la inmunolocalización fluorescente. Los resultados experimentales obtenidos, que confirman la distribución obtenida por LA-ICP-MS, se recogen en el siguiente Sección.

E.4.3. Microarrays de expresión de las proteínas y estudios por inmunofluorescencia empleando Fluor Alexa®

Con el objetivo de comprobar las localizaciones obtenidas empleando los PtNCs como marcas elementales y detección por LA-ICP-MS para la MT1/2, CFH, y APP, se llevaron a cabo otros dos tipos de estudios: (1) Análisis de *microarrays* de

¹⁸ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, L. Álvarez, H. González-Iglesias, H. Traub, N. Jakubowski, R. Peireiro, Bioimaging of metallothioneins in ocular tissue sections by LA-ICP-MS using bioconjugated gold nanoclusters as specific tags, *Microchim. Acta* 185 (2018) 64.

expresión de los genes que codifican las proteínas diana en diferentes regiones oculares, y (2) IHC convencional por IF para la validación de las distribuciones empleando un Ab secundario marcado con fluoróforo Alexa® 594.

En primer lugar, según los resultados obtenidos para el análisis de microarrays (**Figura 53**), las isoformas MT1/2 se expresan de manera elevada en la retina neurosensorial, seguidas de la APP, mientras que los niveles de expresión de CFH en la retina son mucho menores. Además de la retina, se estudió la expresión de los genes en otras tres regiones de los tejidos oculares: CB, EPR y esclera. La expresión de la CFH es menor comparada con la APP y MT1/2 en CB, retina y EPR, a excepción de la esclera donde su expresión es más elevada. Como se extrae de los análisis realizados, la expresión de los genes puede variar significativamente dependiendo de la proteína, así como de la región del ojo.

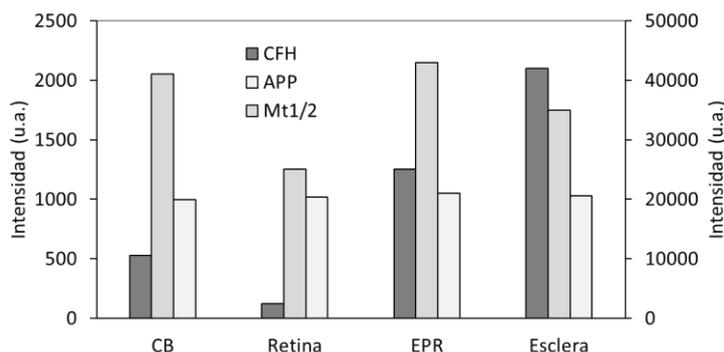


Figura 53: Perfil de expresión génica de las isoformas MT1/2 (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M Y MT1X, y MT2A), CFH, y APP en diferentes regiones de tejidos oculares humanos [cuerpo ciliar (CB), retina, epitelio pigmentario de la retina (EPR), y esclera]. La señal de hibridación relativa obtenida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

Por otro lado, se validaron las distribuciones observadas para la CFH y APP en la retina neurosensorial empleando IF convencional utilizando Alexa® 594 (en el caso de la MT1/2 se confirmaron los resultados obtenidos con trabajos previamente publicados¹⁸). Aunque la detección por fluorescencia sólo permite un análisis cualitativo, la distribución de las proteínas a lo largo de las estructuras micrométricas (e incluso submicrométricas) de los tejidos oculares puede identificarse fácilmente en

las imágenes obtenidas. La **Figura 54**: Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia para MT1/2, APP, y CFH en diferentes regiones de tejidos oculares humanos (donante control) donde se ha llevado a cabo IHC empleando anticuerpos secundarios de cada suero primario marcados con Alexa® 594 (emisión roja) y tinción DAPI de los núcleos celulares (emisión azul). Las imágenes a) y b) muestran la región de la retina neurosensorial, mientras que las imágenes c-f muestran la zona de los cuerpos ciliares (zona pars plicata). muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia para la CFH y APP (**Figura 54a** y **Figura 54b**, respectivamente) en la región de la retina de las secciones de tejido ocular, las cuales son consecutivas a las empleadas para los análisis por LA-ICP-MS. En ambos casos se observó una correlación en la localización de las proteínas a lo largo de las capas neurosensoriales de la retina mediante LA-ICP-MS e inmunofluorescencia. Adicionalmente, en las **Figura 54c-f** se muestran las imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de los procesos ciliares mediante IF convencional, mostrando una inmunolocalización celular específica preferente de CFH en el epitelio ciliar no pigmentado (NPCE), con ausencia de tinción en el epitelio ciliar pigmentado (PCE) y el estroma ciliar (CS). Sin embargo, la distribución de la APP es insignificante, aunque se observó una ligera tinción en el NPCE, mientras que MT1/2 está altamente distribuida en el NPCE y el CS. Hay que destacar que la autofluorescencia del PCE puede superponerse a cualquier señal existente (lo cual es una limitación intrínseca de la microscopía de fluorescencia convencional), dificultando la distinción de la localización correcta de las proteínas en dicha región.

La inmunolocalización obtenida por fluorescencia para la MT1/2, CFH, y APP en los cuerpos ciliares, se empleó como validación a las distribuciones obtenidas mediante LA-ICP-MS en esta región (detallado posteriormente en la **Sección E.4.4**).

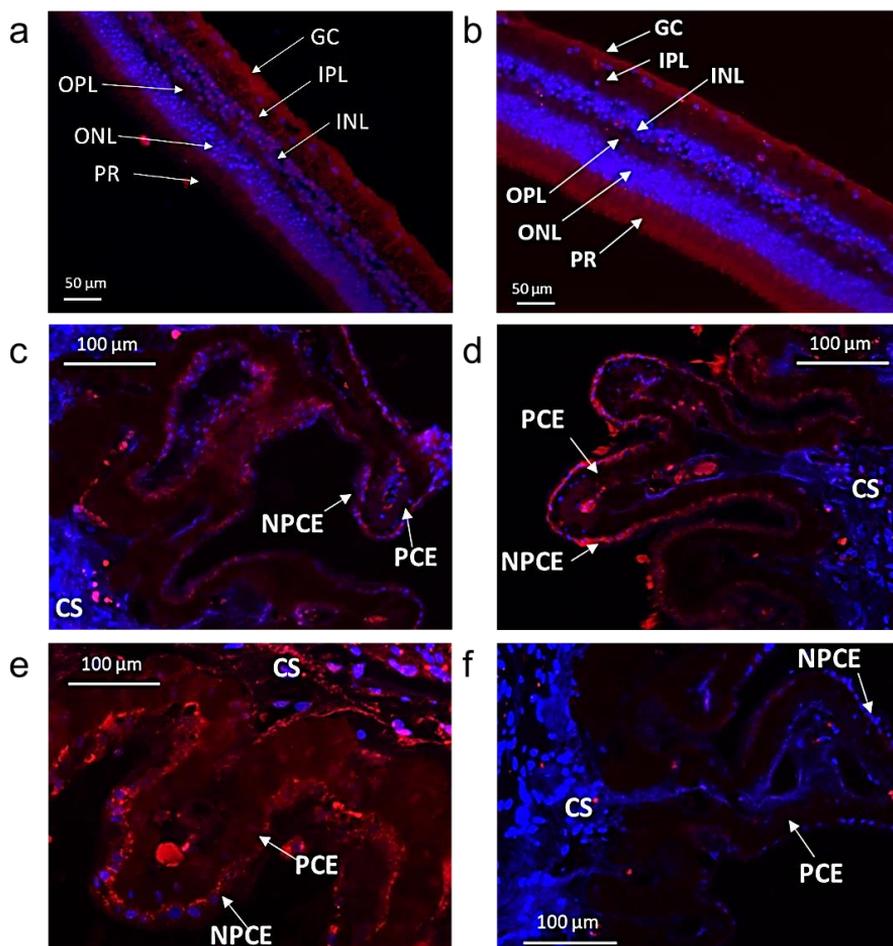


Figura 54: Imágenes obtenidas por inmunofluorescencia para MT1/2, APP, y CFH en diferentes regiones de tejidos oculares humanos (donante control) donde se ha llevado a cabo IHC empleando anticuerpos secundarios de cada suero primario marcados con Alexa® 594 (emisión roja) y tinción DAPI de los núcleos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

De acuerdo con los datos obtenidos por microarray (**Figura 53**), que muestran una baja expresión de CFH en la retina, podría resultar extraño la elevada señal obtenida por IF para la CFH en los tejidos oculares. De este modo, los niveles de expresión más altos de CFH observados en la retina neurosensorial por IF podrían indicar la existencia de uniones inespecífico del Ab primario empleado en el tejido. En la actualidad los trabajos publicados que estudian la localización por IHC de CFH

en la retina humana son limitados. La presencia de CFH en la retina neurosensorial fue confirmada mediante estudios por western blot¹⁹, y recientemente Bhutto et al.²⁰ encontraron una tinción negativa para la CFH en la retina neurosensorial. Por otra parte, estudios previos mostraron también una elevada expresión de CFH en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores humanos y en la capa de células ganglionares²¹. Por lo tanto, toda esta información previa avala los resultados obtenidos, si bien es cierto que no se puede descartar la limitación inherente a la especificidad del Ab de la CFH empleado en los experimentos. De este modo, en futuros estudios se debería abordar el uso de otros anticuerpos alternativos para confirmar la localización de la CFH. En cualquier caso, aun teniendo en cuenta estas limitaciones, la validación de la metodología analítica propuesta por LA-ICP-MS no se ve comprometida, ya que se obtuvieron resultados similares utilizando este Ab particular por IF y LA-ICP-MS.

E.4.4. Optimización de las condiciones para el *imaging* múltiple de proteínas por LA-ICP-MS

A continuación, se llevó a cabo la optimización de las condiciones experimentales para el análisis simultáneo de tres proteínas por LA-ICP-MS. Para ello, se utilizaron los tres MNCs como etiquetas: PtNCs, AgNCs, y AuNCs. Para lograr imágenes de distribuciones simultáneas de las tres proteínas con elevada resolución lateral fueron necesarios diferentes estudios tanto con el sistema de ablación láser (p.ej., temperatura de la muestra, frecuencia de repetición, y velocidad de barrido) como con el ICP-MS de doble enfoque (método de adquisición).

E.4.4.1. Optimización del método de adquisición del ICP-MS

¹⁹ M.D. Nawajes, A. Mandal, R. Ayyagari, Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 4091–4097.

²⁰ I.A. Bhutto, T. Baba, C. Merges, V. Juriasinghani, D.S. McLeod, G.A. Luty, C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration, *Br. J. Ophthalmol.* 95 (2011) 1323–1330.

²¹ S.D. Martin, E. Bodek, L. Geng, S. Schaal, H.J. Kaplan, T.H. Tezel, Complement factor H (CFH) expression in mammalian retinal pigment epithelial cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 206.

Se estudió el efecto de la adquisición secuencial de los isótopos en la resolución de los *imagings* obtenidos. Para ello se compararon las imágenes obtenidas para el análisis simultáneo de MT1/2, CFH, y APP en la misma región del tejido (i.e., se monitorizaron $^{197}\text{Au}^+$, $^{107}\text{Ag}^+$, y $^{195}\text{Pt}^+$ en el mismo método del ICP-MS) con las obtenidas en tres regiones adyacentes de la misma sección de tejido (i.e., se emplearon tres métodos diferentes del ICP-MS en el que se monitoriza un solo isótopo en cada *imaging*). Se debe tener en cuenta que en ambos casos se ha realizado un protocolo de IHC múltiple (las tres inmunosondas metálicas se incuban a la vez en el mismo tejido). Con la estrategia de análisis propuesta se comparan las condiciones de *imaging* múltiple e *imaging* individual recogidas en la **Tabla 8**.

La **Figura 55** recoge las imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT1/2 ($^{197}\text{Au}^+$), CFH ($^{107}\text{Ag}^+$), y APP ($^{195}\text{Pt}^+$) en la retina neurosensorial humana (donante control) para el *imaging* individual o múltiple (imágenes de la fila superior e inferior, respectivamente). Como se puede observar, la distribución de MT1/2, CFH, y APP puede distinguirse en ambos casos, con una localización preferente en la INL, la ONL y el GC para la MT1/2 y CFH, con una menor extensión en la INL y el GC para la APP, tal y como se había observado con anterioridad en los *imagings* individuales empleando los PtNCs como etiqueta metálica para las tres proteínas, así como en las imágenes obtenidas por IF empleando Fluor Alexa® 594. Sin embargo, el empleo del método de adquisición de un isótopo individual permite reducir el tiempo de adquisición del ICP-MS y, por tanto, se puede discriminar mejor la distribución de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las capas retinianas (se obtiene una mejor resolución lateral en las imágenes de la fila superior). Por otra parte, la adquisición múltiple permite co-localizar en el mismo punto de medida las tres proteínas, lo que proporciona información muy valiosa a la vez que se reduce el tiempo de análisis.

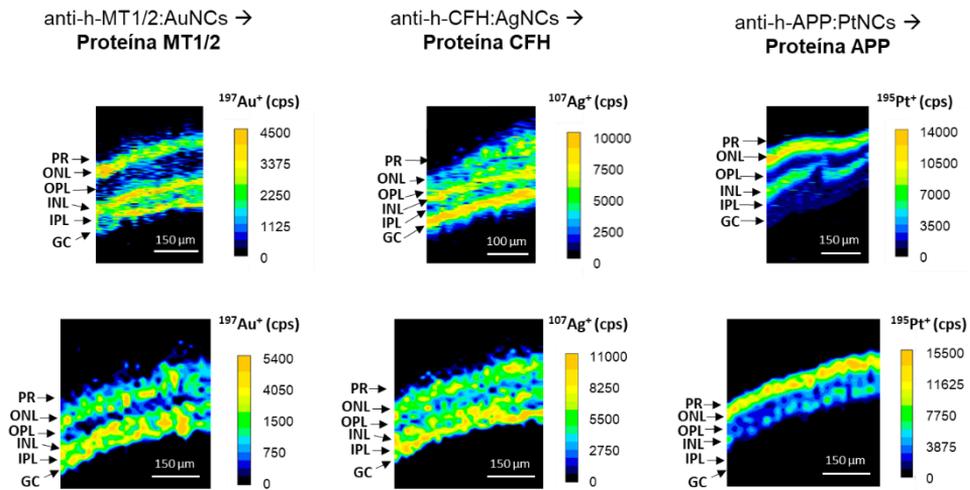


Figura 55: Imágenes obtenidas para la distribución de MT1/2, APP, y CFH en la región de la retina de un donante control obtenidas por LA-ICP-MS empleando los MNCs como marca elemental. Las imágenes de la fila superior han sido obtenidas con el método de ICP-MS de adquisición individual (3 secciones de retina adyacentes, monitorizando sólo 1 isótopo por región; tiempo de adquisición = 0,23 s). Las imágenes de la fila inferior fueron obtenidas empleado el método del ICP-MS de adquisición múltiple (1 sola región en un solo tejido, monitorizando 3 isótopos secuencialmente; tiempo de adquisición = 1,74s).

E.4.4.2. Optimización de los parámetros de ablación

Seleccionando el método de adquisición del ICP-MS que permite llevar a cabo el *imaging* múltiple, a continuación, se optimizaron las condiciones de ablación para intentar mejorar la resolución lateral de las imágenes manteniendo una buena sensibilidad en la detección. Para ello, se parte de unas condiciones de ablación previamente empleadas para la detección de MT1/2 en tejidos oculares¹⁷. Los parámetros evaluados fueron: la temperatura de la muestra durante el muestreo por ablación láser (LA), la velocidad de barrido, y el flujo de gas portador (He).

- ✓ Flujo de gas portador (He)

Una de las primeras optimizaciones que se realizaron a la hora de obtener una señal estable con una buena sensibilidad fue el flujo de gas portador (He). En principio, a mayor flujo, mayor es la sensibilidad obtenida (mayor arrastre). Sin embargo, trabajando a flujos altos de gas portador el ruido también aumenta y las señales son menos estables, incrementándose notablemente el valor de la desviación estándar

asociada a las mismas. Para realizar este estudio se empleó como muestra un patrón de calibración de gelatina suplementada con Au, Ag y Pt ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que permite obtener señales estables con el tiempo (los tejidos oculares son muy heterogéneos por lo que no son los más adecuados para este tipo de optimizaciones). Empleando la gelatina se puede evaluar la sensibilidad, así como la estabilidad de la señal adquiriendo líneas de una duración de 250 s. Se emplearon las condiciones de ablación recogidas en la **Tabla 8** con una velocidad de barrido de $5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ y ensayando diferentes flujos para el gas portador: 900, 1000, 1100 y $1200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de He (**Figura 56**). Se seleccionó el flujo de $1000 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de He como el más adecuado puesto que, a excepción del $^{197}\text{Au}^+$, las intensidades obtenidas son comparables con las de 1100 y $1200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y se descarta un aumento de la desviación y el ruido en la señal.

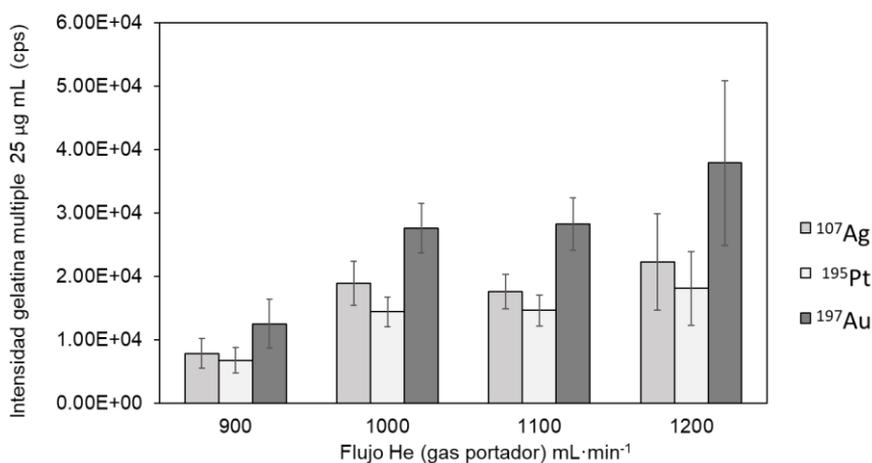


Figura 56: Estudio del efecto que tiene el flujo de He (gas portador) en la intensidad de las señales ($^{107}\text{Ag}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$, y $^{197}\text{Au}^+$) para el análisis en un patrón de gelatina ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por LA-ICP-MS. Las intensidades representan la señal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

- ✓ Temperatura de la muestra y velocidad de barrido.

En cuanto a la temperatura de la muestra, varios autores^{16,22-24} han estudiado la influencia de este parámetro en la resolución espacial de imágenes 2D para el análisis de diferentes heteroátomos en tejidos biológicos. En todos los casos se recoge que el análisis de las muestras a temperaturas inferiores a 0°C ofrece una mayor resolución lateral en comparación con los análisis realizados a temperatura ambiente. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que al disminuir la temperatura se observa un menor efecto térmico por lo que la región de la muestra afectada es menor y hay una menor redeposición de partículas en las estructuras adyacentes a la región ablacionada durante todo el tiempo de análisis.

En el caso de los tejidos oculares, para estudiar el efecto de la temperatura de la muestra durante el análisis por LA-ICP-MS, se comparó el uso de condiciones criogénicas (-20°C) y condiciones de temperatura ambiente (25°C). Para este estudio se realizó el análisis múltiple de las MT1/2, CFH, y APP en la región de los cuerpos ciliares, en concreto se seleccionó la región del *pars plicata*, ya que la forma sinuosa de dicha microestructura (como se puede observar en las imágenes ópticas de la **Figura 57**) hace que la selección de los parámetros de ablación sea crítica para obtener imágenes con una buena resolución. La presencia de MT1/2, CFH, y APP en la estructura del cuerpo ciliar fue corroborada mediante IF convencional (en secciones de tejido consecutivas a las empleadas para los análisis LA-ICP-MS, **Figura 54**). Además, los análisis de microarray de expresión también confirmaron la expresión de estas proteínas en esta región (**Figura 53**).

²² M. Zoriy, A. Matuch, T. Spruss, J.S. Becker, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin, *Int. J. Mass Spectrom.* 260 (2007) 102–106.

²³ S. Hamilton, E.L. Gorishek, P.M. Mach, D. Sturtevant, M.L. Ladage, N. Suzuki, P.A. Padilla, R. Mittler, K.D. Chapman, G.F. Verbeck, Evaluation of a custom single Peltier-cooled ablation cell for elemental imaging of biological samples in laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS), *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 1030–1033.

²⁴ J.S. Becker, A. Matusch, C. Depboylu, J. Dobrowolska, M.V. Zoriy, Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slugs-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6074–6080.

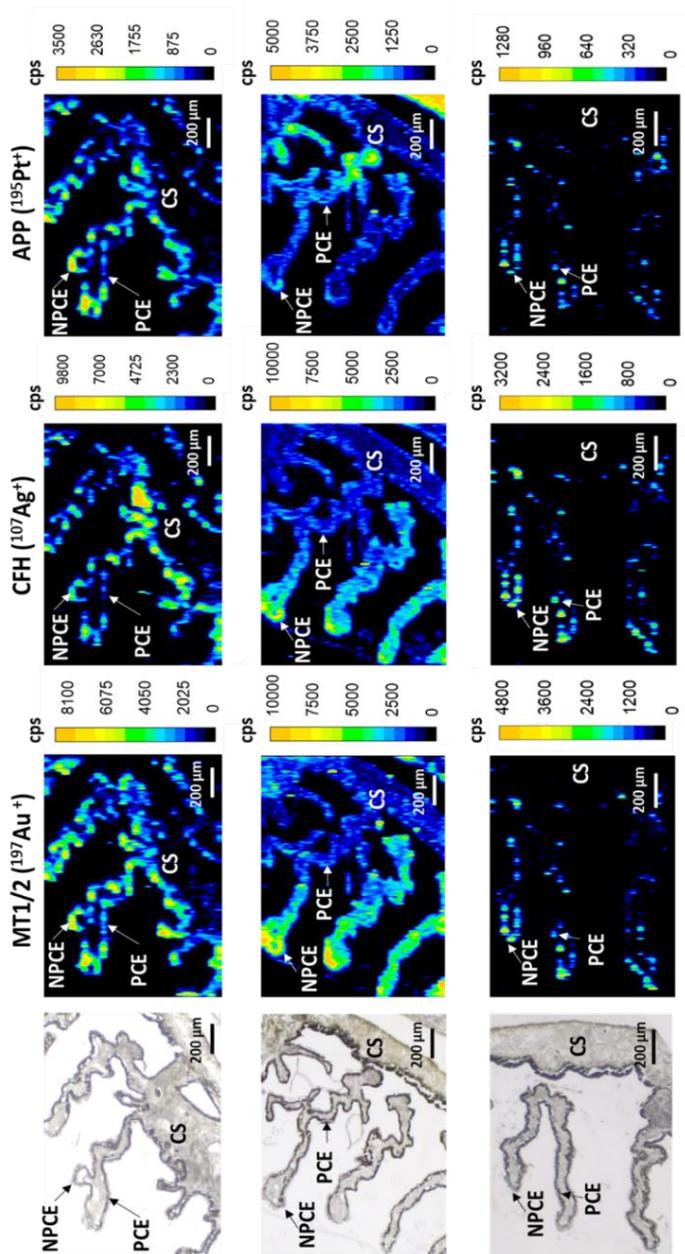


Figura 57: Imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las regiones adyacentes de la pars plicata del cuerpo ciliar de un donante humano control tras el protocolo de IHC con inmunosondas marcadas con MNCs (*Anti-b-MT1/2: AuNCs*, *Anti-b-CFH: AgNCs*, y *Anti-b-APP: PtNCs*).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

Las imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para los procesos ciliares utilizando las inmunosondas de MNCs permitieron visualizar la distribución de MT1/2, CFH, y APP en las diferentes estructuras de la región de la *pars plicata* (**Figura 57**). Las imágenes de la fila superior y la fila intermedia muestran, respectivamente, los *imagings* para la distribución de las proteínas trabajando en condiciones criogénicas (-20°C) y a temperatura ambiente (25°C). En ambos casos se observó que la MT1/2, CFH, y APP se localizaban principalmente en las células epiteliales ciliares, tanto en el epitelio ciliar no pigmentado (NPCE) como en el epitelio ciliar pigmentado (PCE). Sin embargo, el uso de bajas temperaturas ofreció imágenes con mayor resolución y así la MT1/2, CFH, y APP se identificaron específicamente en las células NPCE y PCE. Por el contrario, se observó una mayor deslocalización de las proteínas en los procesos ciliares para los análisis hechos a temperatura ambiente (fila intermedia). La mejor resolución observada a baja temperatura puede atribuirse a un menor daño tisular, así como a una menor contaminación de las líneas vecinas utilizando la celda criogénica y manteniendo la muestra a baja temperatura durante todo el tiempo de análisis.

Adicionalmente, trabajando en condiciones criogénicas (-20°C) se estudió una velocidad de barrido menor para evaluar su influencia en la resolución espacial (5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ frente 2,5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Las imágenes de la fila inferior de la **Figura 57** muestran la distribución de la MT1/2, CFH, y APP a lo largo de los procesos ciliares utilizando 2,5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Aunque se consiguió una mejor resolución lateral disminuyendo a la mitad la velocidad de barrido (filas superior e inferior de la imagen, respectivamente), la sensibilidad disminuyó drásticamente, haciendo casi imposible la identificación de las proteínas en algunas regiones del tejido (p.ej., el epitelio ciliar en la parte basal del proceso ciliar). Por lo tanto, se seleccionó una velocidad de barrido de 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para los análisis posteriores por LA-ICP-MS.

E.4.5. *Imaging* múltiple de proteínas en secciones de ojo humano

E.4.5.1. Caracterización de las inmunosondas

Para obtener no sólo la distribución de las proteínas a lo largo de las estructuras de las secciones de los tejidos oculares mediante LA-ICP-MS, sino también obtener la concentración de las proteínas, es necesario conocer la amplificación proporcionada por cada una de las inmunosondas marcadas con los MNCs. Los pasos necesarios para la caracterización de las inmunosondas metálicas pueden seguirse en el diagrama esquemático de la **Figura 58**. Para ello, debe determinarse la relación entre el metal detectado por ICP-MS (p.ej., Au, Ag o Pt) y el anticuerpo seleccionado en cada caso para la inmunosonda (p.ej., Anti-h-MT1/2, Anti-h-CFH o Anti-h-APP). Para conocer el factor de amplificación proporcionado por cada inmunosonda de MNCs (número de átomos de metal unidos a cada Ab disponible) es necesario realizar medidas por ICP-MS, así como un ELISA cuantitativo.

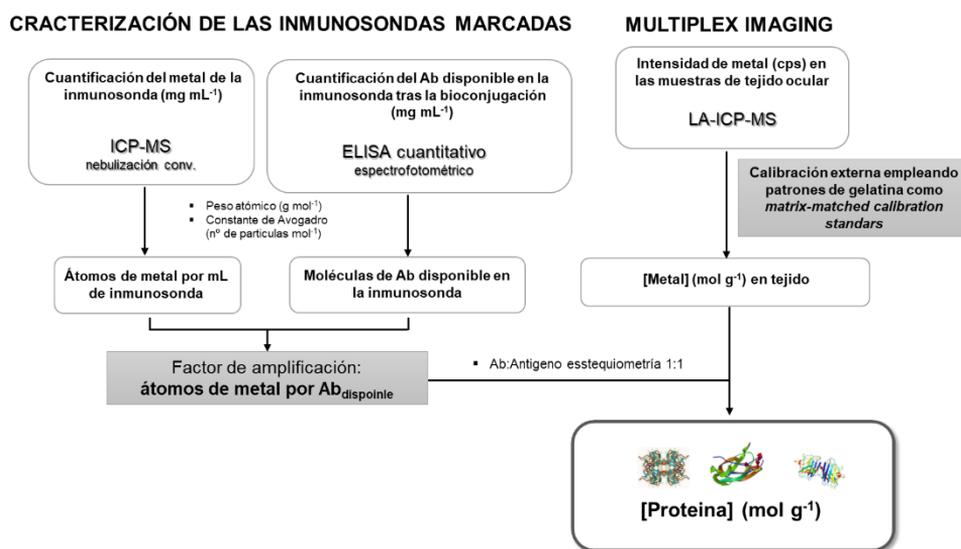


Figura 58: Esquema de las etapas experimentales llevadas a cabo para obtener el *imaging* cuantitativo de proteínas en secciones de tejidos biológicos empleando LA-ICP-MS y MNCs como marca elemental. Como se muestra en la parte de la izquierda del esquema, previamente al análisis por ICP-MS es necesario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

El factor de amplificación (N) de los Ab disponibles tras la síntesis de la inmunosonda metálica puede calcularse experimentalmente, tal y como se describe en la sección Experimental General A.3.2.5; *Error! Marcador no definido.*,¹⁷.

La determinación del factor de amplificación se realizó individualmente para cada inmunosonda marcada (y tras la etapa de bloqueo con hidroxilamina) empleando los anticuerpos específicos de las proteínas de interés (inmunosondas: Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs). Por una parte, la cantidad de Ab disponible en la reacción antígeno: anticuerpo se investigó primero mediante un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo utilizando IgG de conejo (Anti-h-APP: PtNCs y Anti-h-CFH: AgNCs) e IgG de ratón (Anti-h-MT1/2: AuNCs) como estándares para generar la curva de calibración (en el rango de 0-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A modo de ejemplo, en la **Figura 59** se muestra la curva de calibrado obtenida para las inmunosondas Anti-h-APP: PtNCs y Anti-h-CFH: AgNCs. La concentración de Ab obtenida para las inmunosondas Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-APP: PtNCs, y Anti-h-CFH: AgNCs (bloqueados con hidroxilamina y purificadas) está recogida en la **Tabla 9**. Teniendo en cuenta la masa molecular del Ab (Ab tipo IgG, 150 kDa) y la constante de Avogadro ($6,022\cdot 10^{23}$ moléculas $\cdot\text{mol}^{-1}$) es posible determinar el número de Ab por mL. Se encontró un valor promedio de $2,20\cdot 10^{13}$ moléculas de Anti-h-MT1/2, $2,07\cdot 10^{13}$ moléculas de Anti-h-APP, y $1,84\cdot 10^{13}$ moléculas de Anti-h-CFH por mL para las inmunosondas Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-APP: PtNCs, y Anti-h-CFH: AgNCs, respectivamente.

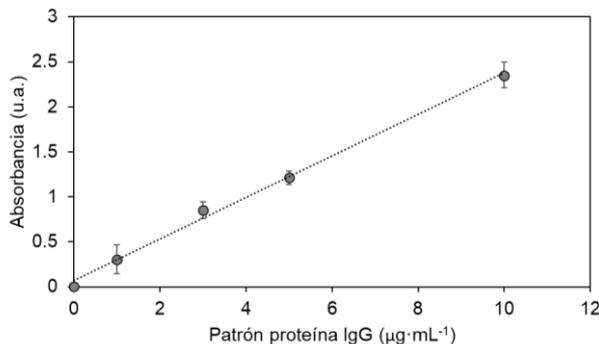


Figura 59: Curva de calibrado empleada para la caracterización de las inmunosondas Anti-h-CFH: AgNCs y Anti-h-APP: PtNCs. La representación muestra la curva de calibrado de patrón IgG de conejo para la cuantificación del Ab disponible en las inmunosondas.

Tabla 9: Resultados obtenidos para la caracterización de las inmunosondas metálicas, en términos de concentración de Ab disponible en la inmunosonda determinada por un inmunoensayo ELISA cuantitativo directo, concentración del metal determinada por ICP-MS, factor de amplificación (N), y relación molar Ab:MNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Inmunosonda	[Ab] disponible ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	[Metal] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	N	Ab:MNCs
Anti-h-MT1/2:AuNCs	$5,47 \pm 0,23$	$2,17 \pm 0.18$	310	1:1
Anti-h-CFH:AgNCs	$4,58 \pm 0,03$	$2,38 \pm 0.32$	723	1:1
Anti-h-APP:PtNCs	$5,14 \pm 0,15$	$7,99 \pm 0.22$	1194	1:11

Por otro lado, la concentración de Au, Pt, y Ag se determinó mediante análisis por ICP-MS con nebulización convencional empleando una calibración externa con patrones en disolución y utilizando Ir como patrón interno para Au y Pt, y Rh para Ag. La **Figura 60** muestra las rectas de calibrado para los tres metales. Las inmunosondas Anti-h-MT1/2:AuNCs, Anti-h-APP:PtNCs, y Anti-h-CFH:AgNCs tenían una concentración para dichos metales en el rango de 2.17-7.99 $\mu\text{g g}^{-1}$. En la **Tabla 9** se recogen las concentraciones obtenidas para Au, Pt, y Ag en las tres inmunosondas.

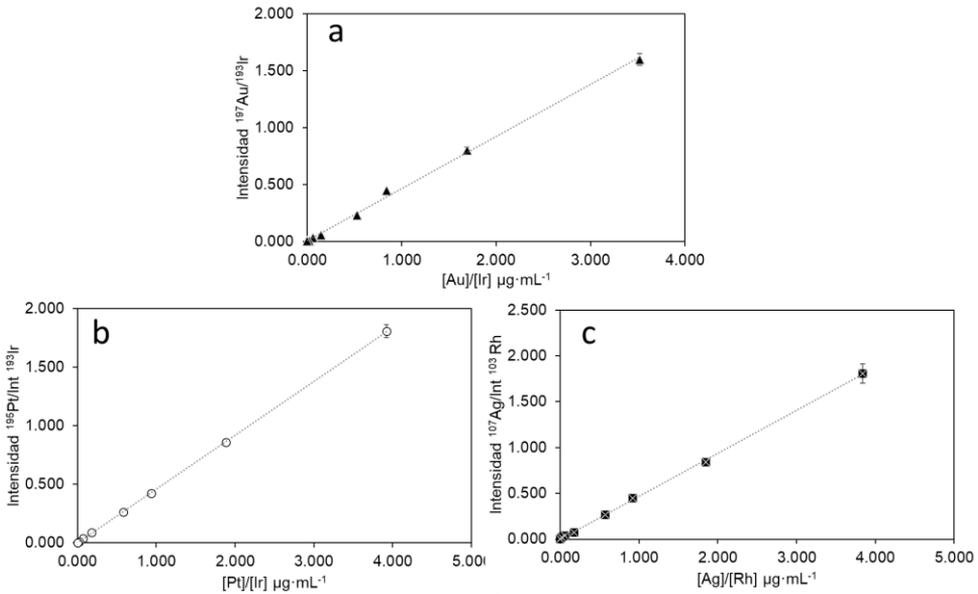


Figura 60: Curvas de calibrado obtenidas por ICP-MS para determinar la concentración de Au, Pt, y Ag en las Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.

Con todos los datos experimentales obtenidos, y teniendo en cuenta los pesos moleculares de los anticuerpos IgG, el peso atómico de cada metal, así como el número de Avogadro, se obtuvo el número de moléculas de Ab y número de átomos metálicos por inmunosonda. Al hacer la relación entre estos valores se puede obtener el factor de amplificación medio para cada una de las inmunosondas: 310 para Anti-h-MT1/2: AuNCs, 723 para Anti-h-CFH: AgNCs, y 1194 para Anti-h-APP: PtNCs (corresponde a unas relaciones molares Ab: MNCs de 1:1, 1:1, y 1:11, respectivamente). Cabe destacar que el factor de amplificación encontrado para la inmunosonda con PtNCs está de acuerdo con el valor previamente determinado para la inmunosonda Anti-h-IgE: PtNCs utilizada en el Capítulo I para la cuantificación de IgE.

E.4.5.2. Caracterización de los patrones de laboratorio de gelatina

Tal y como se describe en el esquema de trabajo de la **Figura 58**, además de llevar a cabo la caracterización de las inmunosondas es necesario caracterizar los patrones de gelatina fabricados en el laboratorio que serán empleados como patrones en la calibración por LA-ICP-MS. Para ello, tras la digestión de las gelatinas (**Sección □**), el contenido metálico de las mismas fue determinado por ICP-MS empleando una calibración externa con patrón interno (al igual que realizó para la caracterización del contenido metálico de las inmunosondas). En la **Tabla 10** se recoge la concentración de Au, Pt, y Ag determinada por ICP-MS para los patrones de gelatina.

***Tabla 10:** Concentraciones de Au, Pt, y Ag encontradas en los patrones de laboratorio de gelatina analizados por ICP-MS tras su digestión ácida. Las incertidumbres representan las desviaciones estándar de 3 medidas independientes.*

Patrón de Gelatina	[Au] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Pt] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Ag] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
#Patrón 1	22,50	15,22	17,53
#Patrón 2	20,3	14,45	18,56
#Patrón 3	23,65	15,89	15,90
Promedio (n=3)	22,15 \pm 1,70	15,19 \pm 0,72	17,33 \pm 1,34

Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos, las intensidades de los metales en los perfiles obtenidos para las gelatinas por LA-ICP-MS (**Figura 61a**) se pueden relacionar con la concentración de cada metal para construir las rectas de calibrado por LA-ICP-MS. La **Figura 61b** muestra las rectas de calibrado obtenidas empleando las gelatinas suplementadas con Au, Ag, y Pt, las cuales serán empleadas para la cuantificación de los metales de las inmunosondas en los estudios de *imaging* en las secciones de tejido ocular.

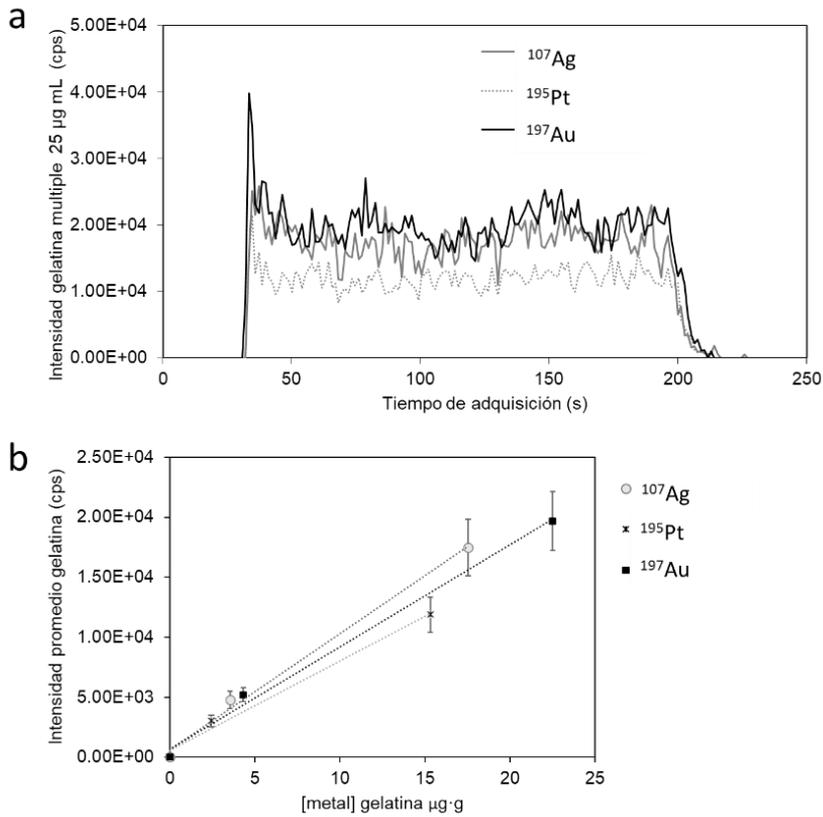


Figura 61: a) Perfil de ablación obtenido para el análisis de un patrón de gelatina por LA-ICP-MS empleando las condiciones optimizadas para el imaging de proteínas, y b) Curvas de calibración obtenidas para el Au, Pt, y Ag obtenidas tras el análisis por LA-ICP-MS de los patrones de gelatina dopadas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

E.4.5.3. Estudio sobre la penetración de la inmunosonda en las secciones de tejido

Para poder ofrecer valores de la concentración de las proteínas en los tejidos es crucial asegurar la completa penetración de las inmunosondas en todo el espesor del tejido. Para ello se evaluó la penetración de la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs en las secciones oculares de $10\ \mu\text{m}$ de grosor. Después de llevar a cabo el procedimiento IHC con la inmunosonda, se visualizó la distribución de la

MT1/2 empleando detección fluorescente y siguiendo para ello la emisión directa de la etiqueta metálica (los AuNCs). Se empleó el microscopio láser confocal ($\lambda_{\text{ex}}=405$, rango $\lambda_{\text{em}}=700-730$) a lo largo de la superficie del tejido (plano XY), así como a lo largo del eje Z. Para obtener una imagen en profundidad del tejido (eje Z), se tomaron 45 planos focales paralelos desde la superficie del tejido hasta el fondo del mismo en intervalos de $0,4 \mu\text{m}$. En la **Figura 62a** puede verse la suma de las 45 imágenes de intensidad máxima a lo largo de las capas de la retina. En las **Figura 62b y Figura 62c** se muestran las imágenes en profundidad (en $10 \mu\text{m}$ de espesor) justo en la INL de la retina (posición marcada por una línea naranja en la **Figura 62a**), mientras que las **Figura 62d y e** recogen las imágenes en profundidad obtenidas de la región transversal (región marcada con una línea gris en la **Figura 62a**), que corresponde con la capa nuclear interna, INL. Con este estudio se pudo localizar la MT1/2 a lo largo de los $10 \mu\text{m}$ de espesor siguiendo la emisión fluorescente de los AuNCs, y por tanto se confirmó la total penetración del Ab primario en el tejido.

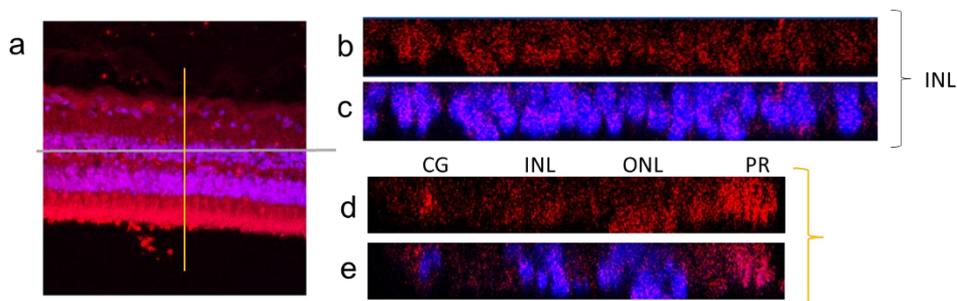


Figura 62: Imágenes obtenidas por microscopía láser confocal para la región de la retina neurosensorial en un tejido ocular (donante control) para estudiar la penetración de la inmunosonda Anti-h-MT1/2:AuNCs en todo el espesor del tejido. La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución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

E.4.5.4. *Imaging* cuantitativo de proteínas por LA-ICP-MS

Para obtener el *imaging* múltiple de las tres proteínas se ablacionaron secciones transversales de 10 μm de espesor de ojos humanos de donantes *post-mortem* control y con DMAE utilizando las condiciones experimentales recogidas en la **Tabla 8** (*imaging* múltiple). A diferencia de lo que ocurre en los procedimientos tradicionales de IHC e IF, las etiquetas de MNCs combinadas con LA-ICP-MS permiten determinar no sólo la distribución cualitativa de las proteínas (señales de $^{197}\text{Au}^+$, $^{107}\text{Ag}^+$, y $^{195}\text{Pt}^+$ en cps), sino también determinar su concentración a lo largo de las estructuras tisulares. Siguiendo las etapas descritas en el diagrama de flujo recogido en la **Figura 58** se pueden transformar las señales de intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, $^{107}\text{Ag}^+$, y $^{195}\text{Pt}^+$ (MNCs) en concentraciones de MT1/2, CFH, y APP, respectivamente. De este modo, tras la caracterización de las inmunosondas y la calibración por LA-ICP-MS con los estándares de gelatina se pudieron obtener las imágenes cuantitativas para la distribución de las tres proteínas en los tejidos oculares. Por lo tanto, para todas los *imaging*s mostrados a continuación se obtuvieron en primer lugar los mapas 2D con la distribución cualitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región RPE-corooides-esclera siguiendo las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$, $^{107}\text{Ag}^+$ y $^{195}\text{Pt}^+$ (MNCs). Los estudios se realizacon en secciones oculares de donantes *post-mortem* control y con depósitos drusenoides (donantes con DMAE) para evaluar si existe acumulación preferencial de proteínas específicas en pacientes con DMAE. A continuación, las intensidades fueron transformadas en concentración de metal con los calibrados de gelatina y, finalmente, la concentración de meta se transforma en concentración de proteína teniendo en cuenta el factor de amplificación de cada inmunosonda.

En la **Figura 63** se muestra la determinación simultánea de MT1/2, CFH, y APP para un donante control en la región RPE-corooides-esclera. La MT1/2 está ampliamente distribuida en la esclera, y se concentra en la monocapa del EPR. Los niveles observados en el estroma de la coroides son más bajos, con algunas regiones (coincidentes con los vasos sanguíneos) sin MT1/2. La proteína CFH está ampliamente distribuida y enriquecida en algunas partes de la capa del EPR, mostrando una

concentración similar en la región de la esclera y niveles más bajos en el estroma del coroides. Por su parte, la APP está distribuida de forma similar en la región de la esclera y el EPR, pero con una menor concentración si se compara con la MT1/2 y la CFH. La amplia distribución de las proteínas seleccionadas en la muestra del donante control es similar a los resultados obtenidos con el análisis de microarrays (**Figura 53**).

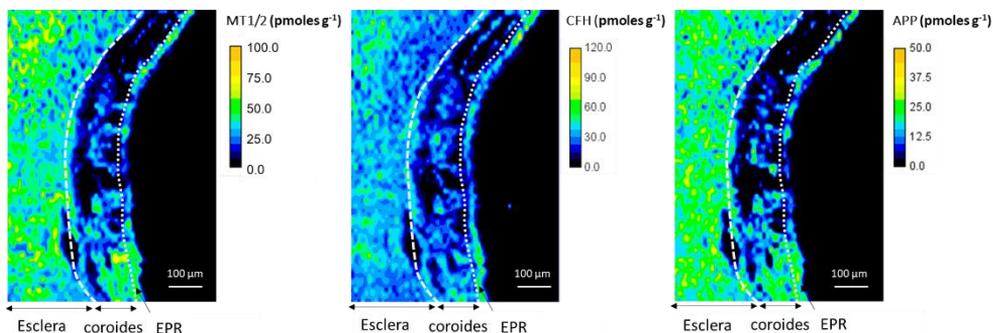


Figura 63: *Imaging cuantitativo de proteínas obtenido por LA-ICP-MS para un tejido ocular en la región del EPR de un donante control tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs, y Anti-h-APP: PtNCs) (60 líneas de ablación). a) MT1/2, b) CFH, y c)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

Las **Figura 64** y **Figura 65** muestran las imágenes obtenidas por LA-ICP-MS para la MT1/2, CFH, y APP para dos donantes con DMAE (#1 y #2). Como se puede observar, las proteínas MT1/2 y CFH estaban ampliamente distribuidas a lo largo de la monocapa del EPR, de forma similar al donante control, aunque con una mayor acumulación en los depósitos sub-PER en agregados hemisféricos específicos. Los depósitos de drusas están marcados con flechas en las imágenes para una mejor localización. La proteína APP se localizó de forma llamativa en los depósitos sub-RPE. En general, existe una acumulación preferencial de las proteínas seleccionadas en los depósitos drusenoides subretinianos con un enriquecimiento específico en los agregados anómalos. Hay que tener en cuenta que se fijaron diferentes escalas para las imágenes obtenidas en los tejidos de DMAE y de donantes control para observar adecuadamente la distribución de las proteínas en ambos casos (p.ej., la escala para la

MT1/2 varía entre 60-300 pmoles g⁻¹). Hay que destacar que algunas diferencias observadas en la distribución y el contenido de MT1/2, CFH, y APP a lo largo de las estructuras oculares pueden atribuirse a las características de diversidad biológica o a la gravedad de la enfermedad de cada paciente.

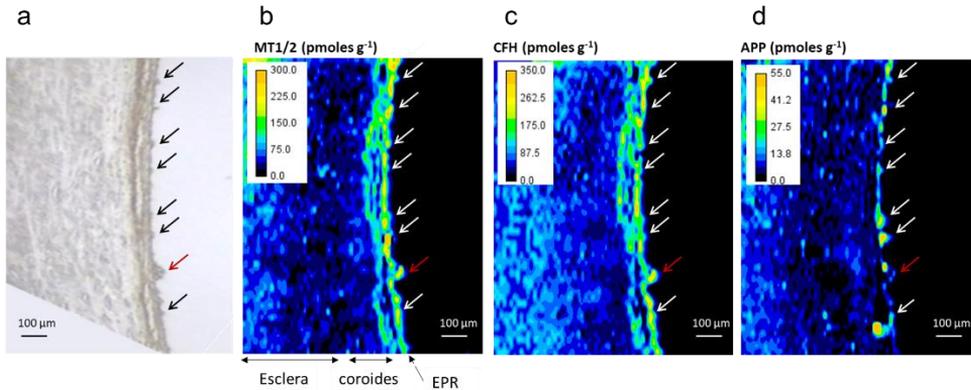


Figura 64: *Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-b-MT1/2: AuNCs, Anti-b-CFH: AgNCs, y Anti-b-APP: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

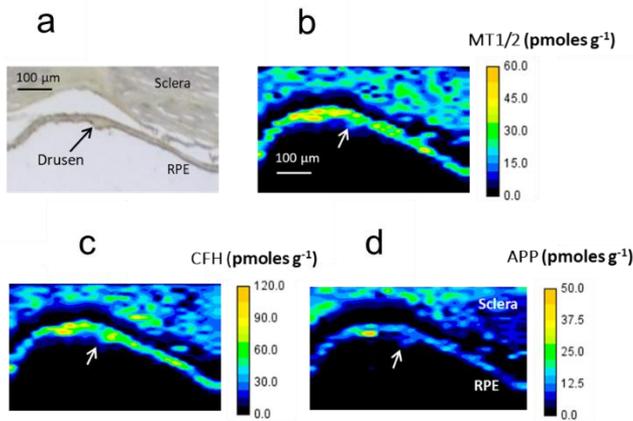


Figura 65: *Imaging obtenido por LA-ICP-MS para conocer la distribución cuantitativa de MT1/2, CFH, y APP en la región del EPR-coroides-esclera de un tejido ocular de un donante con DMAE (#1) tras un protocolo de IHC con tres inmunosondas metálicas (Anti-b-MT1/2: AuNCs, Anti-b-CFH: AgNCs, y Anti-b-APP: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

A la vista de los biomimaging múltiples semicuantitativos obtenidos, se puede decir que esta estrategia que combina la inmunohistoquímica múltiple y la detección por LA-ICP-MS, permite localizar simultáneamente en una misma sección de tejido ocular tres proteínas de interés en relación con la DMAE, y en concreto en regiones del EPR de donantes control y donantes con DMAE que presentan drusas en dicha región. La metodología de detección múltiple desarrollada en este trabajo no sólo permite la amplificación de la detección de proteínas diana MT1/2, CFH y APP debido a los cientos de átomos metálicos por etiqueta metálica empleada (AuNCs, AgNCs y PtNCs) sino que además se puede proporcionar un valor de concentración de dichas por píxel de tejido ablacionado.

E.5. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha descrito un método inmunohistoquímico para localizar simultáneamente en una misma sección de tejido ocular tres proteínas de interés en relación con la DMAE (MT-1/2, CFH y APP) mediante LA-ICP-MS. La metodología de detección múltiple desarrollada en este trabajo permite no sólo obtener una gran amplificación de la detección de proteínas debido a los cientos de átomos metálicos por etiqueta metálica empleada (AuNCs, AgNCs y PtNCs), sino también la obtención de distribuciones semicuantitativas de las mismas a lo largo de los tejidos oculares. De manera específica las conclusiones extraídas de este capítulo se pueden resumir en los siguientes puntos:

- ✓ Se ha evaluado el uso de los PtNCs como marcas elementales en la síntesis de inmunosondas específicas para la obtención de *biomimicings* proteicos en diferentes regiones oculares para MT-1/2, CFH y APP de manera individual.
- ✓ Se ha determinado una relación molar PtNCs:hidroxilamina, 1:50 para asegurar la no adsorción inespecífica de los PtNCs a los tejidos para la realización de manera fiable y reproducible de los IHC.
- ✓ Se ha realizado una caracterización de las tres inmunosondas: Anti-h-MT1/2: AuNCs, Anti-h-CFH: AgNCs y Anti-h-APP: AuNCs para conocer sus factores de amplificación (N) siendo 310, 723 y 1194 respectivamente.
- ✓ Se ha confirmado mediante IHC por IF la distribución de las proteínas en retina y cuerpos ciliares y además se confirmó la penetración de los Ab usando la inmunosonda Anti-h-Mt1/2: AuNCs como referencia al realizar un seguimiento de su fluorescencia (720 nm) mediante su medida con microscopía de láser confocal (ex 405 nm) en la sección transversal de un corte de 10 μm .
- ✓ Se han estudiado y optimizado las condiciones del sistema de ablación para lograr una buena sensibilidad en la detección y resolución lateral de los *imaging* múltiples. Para ello se ha elegido la baja temperatura (uso de celda criogénica) durante las medidas y una velocidad de barrido de 5 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

- ✓ Se ha evaluado y optimizado el método de adquisición empleando un ICP-MS de tipo sector magnético para lograr una buena sensibilidad y resolución en los *imaging* múltiples. Para ello se opta por la adquisición secuencial de los tres isótopos (^{197}Au , ^{107}Ag y ^{195}Pt) en el mismo método de medida sacrificando resolución frente al ahorro de tiempo en la medida y a la posibilidad de obtener información de las tres proteínas exactamente en la misma región ablacionada. Se obtuvieron las mejores condiciones posibles en cuanto a resolución lateral y sensibilidad teniendo en cuenta las limitaciones instrumentales de los equipos disponibles.
- ✓ Se han obtenido *bioimaging* de las tres proteínas de manera semicuantitativa usando patrones de gelatina suplementados con los metales (Au, Ag y Pt) como estándares de calibración *matrix-matched* para conocer la concentración de los metales en los bioimaging. Y finalmente, conociendo el número de átomos de la etiqueta por inmunosonda marcada, se puede lograr una semicuantificación de las proteínas en las secciones de tejido ocular.
- ✓ Cabe destacar que la combinación de MNCs como etiquetas de inmunosondas y LA-ICP-MS ha permitido la localización y determinación simultánea de las tres proteínas al mismo tiempo en un tejido ocular cuya autofluorescencia limita el uso de técnicas basadas en la inmunofluorescencia para detectar la distribución de proteínas. En particular, en el presente trabajo ha logrado la detección de MT1/2, CFH y APP en tejidos oculares que incluyen el EPR y el PCE, donde la autofluorescencia de estas células pigmentadas dificulta la visualización de la distribución de proteínas por inmunofluorescencia. De esta manera los *bioimaging* han permitido localizar acumulaciones de estas proteínas de manera semicuantitativa en las drusas formadas en las regiones de tejido de donantes *post-mortem* con DMAE, así como en las zonas conflictivas debido a la autofluorescencia del propio tejido (EPR y PCE). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar la localización de CFH empleando otro Ab distinto u otra técnica de análisis.

F. CAPÍTULO III

Desarrollo de una estrategia de cuantificación para la determinación de proteínas en células individuales por ablación láser ICP-MS empleando inmunosondas marcadas con AuNCs y estándares de calibración *matrix-matched*

F.1. INTRODUCCIÓN

En este Capítulo III se aborda la determinación de proteínas relacionadas con la DMAE en células individuales mediante su análisis directo por LA-ICP-MS empleando inmunosondas marcadas con AuNCs. En el Capítulo II de la Tesis Doctoral se puso de manifiesto la limitación que presenta la dispersión asociada al diámetro de los MNCs, ya que dicha variabilidad está directamente asociada con el número de átomos metálicos por marca y, por lo tanto, tiene un efecto directo en la concentración de la proteína determinada durante el análisis por MS elemental. En los Capítulos I y II se han llevado a cabo estudios cuantitativos en muestras de fluidos y tejidos biológicos donde la concentración de los analitos es relativamente elevada y/o se mide una gran cantidad de muestra (varios mL de suero o una superficie de varios mm² en los tejidos). Por lo tanto, la incertidumbre asociada al diámetro de los MNCs se ve compensada con el gran número de átomos de metal que se detectan en el ICP-MS. Sin embargo, en este Capítulo III se aborda la cuantificación de biomoléculas en células individuales (estructuras con dimensiones de 20-30 μm y baja concentración de biomoléculas) por lo que la incertidumbre asociada al tamaño de los MNCs puede resultar un parámetro crítico a la hora de obtener concentraciones exactas y precisas.

Tal y como está recogido en la Introducción General, los nuevos avances tecnológicos han permitido el desarrollo de sistemas de medida de células individuales empleando ICP-MS: *single cell* (sc) ICP-MS. Este tipo de análisis permite medidas célula a célula en diferentes tipos de aplicaciones al introducir suspensiones celulares intactas en el plasma ICP-MS^{1,2}. Sin embargo, en los análisis por sc-ICP-MS no se puede obtener una distribución subcelular de los analitos y, además, pueden producirse riesgos de muestreo no representativo debido a pérdidas celulares dependientes

¹ M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, A. Bazo, E. Bolea-Fernández, F. Vanhaecke. Living in a transient world: ICP-MS reinvented via time-resolved analysis for monitoring single events. Chem. Sci. 13, (2022), 4436.

² S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, J. Anal. At. Spectrom. 35 (2020) 35, 1784-1813.

del tamaño en el transporte hacia la ICP-MS (p.ej., las células más grandes se depositan más fácilmente y no llegan al plasma ICP-MS). Ambos aspectos pueden ser superados mediante el análisis directo de células empleando un sistema de ablación láser acoplado al ICP-MS.

Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios sobre células publicados empleando LA-ICP-MS se centran en la distribución de elementos presentes de forma natural o suplementados en las células, así como en la captación y el procesamiento de MNPs³⁴. Además, también hay estudios donde se estudian empleando estrategias de etiquetado con metales⁵. Para ello se han utilizado los ya mencionados complejos de Ln, las etiquetas poliméricas que contienen varios Ln, y MNPs. Aunque los estudios cualitativos donde se obtiene la distribución espacial de los heteroátomos en las células por LA-ICP-MS se han realizado con éxito para diferentes aplicaciones, los trabajos relacionados con la obtención de imágenes cuantitativas son aún escasos. Los importantes efectos de matriz que afectan a las medidas por LA-ICP-MS, junto con la persistente falta de materiales de referencia adecuados para la calibración (especialmente para las matrices biológicas), siguen dificultando aún la determinación de elementos y biomoléculas en células por LA-ICP-MS⁶.

Actualmente, las estrategias de cuantificación para metales y biomoléculas en células empleando LA-ICP-MS se basan en la generación de patrones de calibración

³ O. Reifschneider, A. Vennemann, G. Buzanich, M. Radtke, U. Reinholz, H. Riesemeier, J. Hogeback, C. Köppen, M. Großgarten, M. Sperling, M. Wiemann, U. Karst, Revealing Silver Nanoparticle Uptake by Macrophages Using SR- μ XRF and LA-ICP-MS. *Chem. Res. Toxicol.* 33, (2020), 1250–1255

⁴ J. A. Ko, N. Furuta, H.B. Lim, New approach for mapping and physiological test of silica nanoparticles accumulated in sweet basil (*Ocimum basilicum*) by LA-ICP-MS, *Analytica Chimica Acta*, 1069, (2019), 28-35.

⁵ D. Clases, R. Gonzalez de Vega, P. A. Adlard, P.A. Doble, On-line reverse isotope dilution analysis for spatial quantification of elemental labels used in immunohistochemical assisted imaging mass spectrometry via LA-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 34, (2019), 407-412.

⁶ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Quantitative imaging of specific proteins in the human retina by laser ablation ICPMS using bioconjugated metal nanoclusters as labels, *Anal. Chem.* 90, (2018), 12145–12151.

donde se intenta ajustar la matriz de los patrones a la matriz de la muestra (calibraciones *Matrix-matched*). Drescher et al.⁷ proponen el uso de membranas de nitrocelulosa con suspensión de NPs para la determinación de AuNPs y AgNPs en células eucariotas. Posteriormente, esta estrategia fue mejorada por Arakawa et al.⁸ utilizando un microarray para generar *spots* de los patrones con dimensiones bien controladas y reducir así el tamaño de las gotas secas de suspensión de NPs. En esta aplicación se obtuvo la distribución cuantitativa de AgNPs en esferoides 3D. Por otro lado, Wang et al.⁹ propusieron el empleo de residuos secos de pico-gotas impresas (generadas con una impresora comercial) para la cuantificación de AuNPs internalizadas en una línea celular de macrófagos monocíticos de ratón. Además, el grupo del Prof. Vanhaecke¹⁰ ha utilizado gelatinas enriquecidas con metales como estándares para la cuantificación del Cu o para la determinación de una biomolécula en células de cáncer de mama empleando un Ln quelato como etiqueta elemental. También se pueden encontrar otros trabajos centrados en la cuantificación de biomoléculas específicas de la membrana celular utilizando clústers de péptidos-Au como etiquetas y empleando residuos secos de gotas de metal como estándares de calibración^{11,12}. En todas las estrategias propuestas se intenta imitar la matriz de las células individuales,

⁷ D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, N. Jakubowski, Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9684–9688.

⁸ A. Arakawa, N. Jakubowski, S. Flemig, G. Koellensperger, M. Ruzs, D. Iwahata, H. Traub, T. Hirata, High-resolution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry used to study transport of metallic nanoparticles through collagen-rich microstructures in fibroblast multicellular spheroids, *Anal. Bioanal. Chem.* 411, (2019), 3497–3506.

⁹ M. Wang, L.N. Zheng, B. Wang, H.Q. Chen, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W.Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10252–10256

¹⁰ S.J.M. van Malderen, E. Vergucht, M. De Rijcke, C. Janssen, L. Vincze and F. Vanhaecke, Quantitative determination and subcellular imaging of Cu in single cells via laser ablation-ICP-mass spectrometry using high-density microarray gelatin standards, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5783–5789

¹¹ J. Zhai, Y. Wang, C. Xu, L. Zheng, M. Wang, W. Feng, L. Gao, L. Zhao, R. Liu, F. Gao, Y. Zhao, Z. Chai, X. Gao, Facile Approach to observe and quantify the α IIb β 3 Integrin on a Single-Cell, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2546–2549

¹² J. Zhai, L. Zhao, L. Zheng, F. Gao, L. Gao, R. Liu, Y. Wang, X. Gao, Peptide–Au Cluster Probe: Precisely Detecting Epidermal Growth Factor Receptor of Three Tumor Cell Lines at a Single-Cell Level, *ACS Omega*, 2 (2017) 276–282.

sin embargo, ninguna de ellas logra alcanzar en su totalidad las características de la compleja naturaleza que presenta la matriz celular.

Dentro de esta línea, en el Capítulo III de la Tesis Doctoral se plantea el desarrollo de una metodología de calibración *matrix-matched* para determinar el contenido de dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células individuales del epitelio pigmentario de la retina (EPR) mediante LA-ICP-MS. El interés de enfocar el estudio en las células del EPR es debido a que al ser esta la capa más externa sometida a un constante estrés oxidativo por factores externos (p.ej., luz solar), una mejor comprensión de los procesos biológicos involucrados con estas células puede aportar información adicional sobre el inicio y desarrollo de la DMAE. Se sabe que altos niveles de estrés oxidativo derivan en una respuesta inflamatoria crónica que provoca en gran medida la aparición de la DMAE (debido a la degeneración y muerte de las células fotorreceptoras). Durante el estrés oxidativo y la posterior inflamación, proteínas relevantes (p.ej., las MTs o la APOE) muestran cambios en sus niveles de expresión^{13,14}. Por ello, ensayar diferentes tratamientos inflamatorios en células de EPR inmortalizadas y estudiar los posibles cambios en la expresión de las proteínas puede proporcionar información relevante directamente relacionado con la DMAE.

Sin embargo, la gran heterogeneidad biológica limita muchos ensayos y en concreto aquellos que implican estudios a nivel celular. Es bien sabido que las células aun siendo de un mismo tipo, incluso bajo las mismas condiciones fisiológicas o estímulos externos, pueden responder de manera diferente, generando variaciones a nivel de célula a célula¹⁵. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas capaces de estudiar el contenido de metales y biomoléculas a nivel de células individuales es un campo de gran interés actualmente.

¹³ A. Álvarez-Barríos, L. Álvarez, M. García, E. Artime, R. Pereiro, H. González-Iglesias, Antioxidant Defenses in the Human Eye: A Focus on Metallothioneins, *Antioxidants* 11, (2021), 11-89.

¹⁴ M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue, Interactions between Apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration, *Life* 11, (2021), 635,

¹⁵ P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells, *Anal. Chem.* 91 (2019), 588-621.

F.2. OBJETIVOS

EL objetivo general de este Capítulo III es el desarrollo de una estrategia de cuantificación de proteínas en células individuales del epitelio pigmentario de la retina (línea celular HRPEsv) combinando metodologías de IHC en las que se emplean inmunosondas: AuNCs y la técnica de LA-ICP-MS. Este objetivo general se llevará a cabo a través de las siguientes etapas experimentales.

1. Síntesis de las inmunosondas específicas para el IHC
 - a. Búsqueda de una ruta sintética de AuNCs que logre disminuir la desviación asociada a la dispersión de tamaños de las nanoestructuras de cara a obtener valores de cuantificación fiables y reproducibles.
 - b. Síntesis y caracterización de las inmunosondas específicas de las proteínas MT2A y APOE: Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs
2. Optimización de los cultivos celulares HRPEsv. Estudio de diferentes tratamientos inflamatorios y tiempo de incubación en los niveles de expresión de las proteínas MT2A y APOE mediante qRT-PCR (expresión genética) y ELISA cuantitativos (expresión proteica).
3. *Bioimaging* de la distribución de las proteínas MT2A y APOE en las células HRPEsv control y sometidas al tratamiento proinflamatorio con IL1 α mediante dos estrategias:
 - a. IHC directa empleando las inmunosondas metálicas sintetizadas (de manera independiente) y detección elemental LA-ICP-MS.
 - b. IHC indirecto inmunofluorescente empleando anticuerpos secundarios con fluoróforo Alexa ® 594 y Alexa ® 488, para la detección de MT2A y APOE respectivamente.
 - i. Estudio de la concentración de anticuerpo primario
 - ii. Validación de la distribución de las proteínas encontrada por LA-ICP-MS.

4. Estudio de la penetración de la inmunosonda en las células y obtención de una distribución transversal mediante medidas de inmunofluorescencia empleando IHC directa con los AuNCs como marcas fluorescentes o los fluoróforos Alexa® 488.
5. Estudio de las interacciones inespecíficas de los AuNCs en las células individuales mediante media por fluorescencia.
6. Desarrollo de la estrategia de cuantificación por LA-ICP-MS de las proteínas MT2A y APOE en las células individuales de HRPEsv CT y sometidas a tratamiento inflamatorio con IL1 α durante 48 h.
 - a. Generación de los patrones de calibración para llevar a cabo una estrategia *matrix-matched*
 - i. HRPEsv suplementadas con diferentes concentraciones de AuNCs (0, 5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) durante 24 h.
 - ii. Caracterización elemental de los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs mediante ICP-MS para conocer el contenido de oro real.
 - b. Transformación de los *biomimaging* unicelulares de las proteínas bajo estudio en las células HRPEsv CT y tratadas de intensidades cualitativas de ^{197}Au a concentración de proteína (MT2A o APOE) por célula ablacionada. Tratamiento de datos mediante el software Iolite (v4)
7. Validación de los resultados obtenidos de concentración de proteína por célula con los obtenidos en células lisadas por cuantificación por inmunoensayo ELISA comerciales.

F.3. EXPERIMENTAL

F.3.1. Materiales y reactivos

En esta Sección se detallan los materiales y reactivos específicos empleados en el desarrollo del Capítulo III de la Tesis Doctoral. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que la mayor parte de los reactivos han sido previamente recogidos en el Experimental General.

F.3.1.1. Síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas

Los reactivos para la síntesis, purificación, y caracterización de las inmunosondas metálicas se recogen en la **Sección C.2.2.1**. Sin embargo, en el Capítulo III se llevan a cabo diferentes estrategias de síntesis para los AuNCs con el objetivo de disminuir la desviación asociada a su diámetro. A continuación, se recogen los reactivos empleados durante estos ensayos:

Síntesis de AuNCs. Se empleó $\text{NaAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99% polvo; Sigma-Aldrich) como sal precursora del metal. Como agentes de estabilización se evaluaron el ácido lipoico – LA (> 98% en polvo; Across Organics), ácido dihidrolipoico (DHHLA), y L-glutación reducido – GSH (>98% polvo; Sigma-Aldrich). Como reductor se empleó NaBH_4 (> 98% polvo; Sigma-Aldrich). Además, se utilizaron diferentes disolventes, como propan-2-ol (Fisher Scientific), acetona y metanol (ambos de VWR chemicals).

Síntesis de las inmunosondas metálicas.: Los anticuerpos primarios empleados para la síntesis de las inmunosondas Anti-h-APOE: AuNCs y Anti-h-MT2A: AuNCs son:

- Anticuerpo policlonal de cabra contra la APOE (Anti-h-APOE) de Fisher Scientific.
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la MT2A (Anti-h-MT2A) de la casa comercial Cloud Clone Corporation.

F.3.1.2. Cultivo y expansión de la línea celular y tratamientos inflamatorios de las células

Los reactivos empleados durante la expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular de células inmortalizadas del epitelio pigmentario de la reina (HRPEsv40) está descrito en la Sección C.4.7.-Adicionalmente, en este Capítulo III se evalúan diferentes tratamientos inflamatorios en las células HRPEsv40 con el objetivo de estudiar la expresión de las proteínas bajo su efecto. Los reactivos empleados durante este estudio fueron el factor de crecimiento transformante beta humana recombinante (TGF β 1) y la dexametasona (DEX), ambos de Sigma Aldrich, y la citoquina Interleuquina-1 α humana recombinante (IL-1 α , Gold Bio).

F.3.1.3. Protocolos de inmunocitoquímica

Los reactivos generales necesarios para llevar a cabo los protocolos de ICC en las células inmortalizadas tanto por IF convencional como empleando los AuNCs como marcas están recogidos en la **Sección** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.. Para llevar a cabo todos los experimentos de ICC en los cuales se realiza una detección por fluorescencia o elemental empleando LA-ICP-MS, se hacen crecer las células en dispositivos portaobjetos con el sistema Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Thermo Fisher Scientific). Este tipo de soporte para las células se denomina cámaras portaobjetos a lo largo del Capítulo III.

Para llevar a cabo la ICC por IF indirecta siguiendo la emisión del fluoróforo Alexa® se emplearon los anticuerpos primarios sin AuNCs y, adicionalmente, se incuban con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo Alexa® Fluor Plus (A32731 y A32814): IgG de cabra anti suero de conejo:Alexa® 594 (emisión en el rojo) e IgG de burro anti suero de cabra:Alexa® 488 (emisión en el verde) para la detección de los anticuerpos Anti-h-MT2A y Anti-h-APOE, respectivamente.

F.3.1.4. Análisis mediante qRT-PCR

Para conocer la expresión génica de la MT2A y APOE en las células HRPEsv40 bajo el efecto de diferentes tratamientos inflamatorios, se llevó a cabo la

reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El material y reactivos necesarios son para estos análisis incluye el RNeasy Mini Kit (Qiagen) que proporciona los reactivos y material necesarios para el lisado (buffer de lisis) de las células y posterior aislamiento del contenido total de ARN. Para evaluar la calidad y la concentración del ARN se usó el espectrofotómetro Picodrop™ (Picodrop Limited). El kit "High Capacity RNA-to-cDNA" (Applied Biosystems, Thermo Fisher) se empleó para obtener el ADN complementario (ADNc) a partir del RNA utilizando la enzima transcriptasa inversa, en el termociclador. La expresión de los genes de MT2A (Hs02379661_g1) y APOE (Hs00171168_m1) se determinó en un sistema de RT-PCR 7500 empleando la sonda fluorescente TaqMan® (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Adicionalmente, se empleó el gen beta de la glucoronidasa (GUSB; Hs00939627_m1) como control endógeno (cuantificación relativa).

F.3.1.5. Kits ELISA cuantitativos para la MT2A y APOE

Se emplearon dos kits comerciales de ensayo inmunoenzimático de Cloud-Clone Corporation para la determinación de la concentración de MT2A (SEB868Hu 96 Tests) y APOE (SEA704Hu 96 Tests) en las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 (tanto en las células control como en las tratadas con IL1 α). Además, se empleó el tampón Tris-HCl (pH 7,4) (Sigma Aldrich) para suspender el pellet celular justo antes de realizar la lisis de las células empleando la sonda de ultrasonidos con el objetivo de extraer el contenido citosólico (i.e., para obtener la muestra que se analiza con el Kit ELISA).

F.3.2. Instrumentación

Los sistemas de ablación láser e ICP-MS empleados para el desarrollo experimental del Capítulo III están descritos con detalle en la Instrumentación General. A modo resumen, a continuación, se describen los equipos empleados para cada análisis, así como las condiciones de trabajo.

Para llevar a cabo el análisis elemental por ICP-MS con nebulización convencional y determinar la concentración de Au (tanto en los lisados celulares de los patrones unicelulares como durante la caracterización de las inmunosondas) se empleó el ICP-MS 7900 (Agilent). Para obtener el *imaging* con la distribución de APOE y MT2A en las células por LA-ICP-MS (siguiendo la señal de $^{197}\text{Au}^+$ de los AuNCs empleados como etiqueta en las inmunosondas), se empleó el sistema de ablación tipo excímero NWR193 (Elemental Scientific - ESI) equipado con una celda de ablación de dos volúmenes (TwoVol2 Ablation Cell, ESI). Este sistema se usó para el análisis de células individuales HRPEsv fijadas en las cámaras portaobjetos, tanto las células HRPEsv@AuNCs empleadas como patrones de calibración como las células HRPEsv40 sometidas al ensayo ICC con las inmunosondas. Las condiciones de trabajo empleadas, tanto para los análisis por ICP-MS como por LA-ICP-MS, están recogidas en la **Tabla 11**.

Tabla 11: *Parámetros empleados para el análisis por nebulización convencional ICP-MS (lisados celulares e inmunosondas metálicas) y para los estudios de imaging por LA-ICP-MA con las células HRPEsv (CT y tratadas con IL1 α) y los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs.*

Parámetro (7900 Agilent ICP-MS)	Valor
RF – ICPS (W)	1500
Flujo de Ar - plasma (mL min ⁻¹)	18
Flujo de Ar - nebulizador (mL min ⁻¹)	0,9 (ICP-MS)
Flujo de Ar – “make-up” (mL min ⁻¹)	0,75 (LA-ICP-MS)
Isótopos monitorizados (m/z)	^{197}Au , ^{195}Pt (Patrón interno)
Dwell time (ms)	100 (ICP-MS) o 50 (LA-ICP-MS)
Parameter (NWR193 ESI - LA)	Valor
Diámetro haz láser (μm)	6
Velocidad de barrido ($\mu\text{m s}^{-1}$)	5
Energía láser, fluencia (J cm^{-2})	0,3 (5%)
Frecuencia de repetición (Hz)	20

Par el procesamiento de los datos (construcción de imágenes 2D de la distribución de $^{197}\text{Au}^+$ en células HRPEsv individuales, histogramas, y selección de las regiones celulares en píxeles) se empleó el software Iolite (v4). En todos los casos, el

imaging 2D fue construido aplicando el gradiente térmico como paleta de color y se aplicó un filtro de expansión por interpolación para el tratamiento de los datos.

Paralelamente, para el estudio de la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40 mediante detección por fluorescencia, se empleó un microscopio láser confocal (DM IRE2; Leica) con un objetivo de inmersión en aceite de 63x. Se obtuvieron imágenes con resolución tanto lateral (eje XY) como en profundidad (eje YZ o XZ). Los ajustes de adquisición son los mismos que los empleados en el Capítulo II de la Tesis Doctoral (fluoróforos: AuNCs y DAPI).

F.3.3. Procedimientos experimentales

F.3.3.1. Protocolo para la síntesis de AuNCs monodispersos

El protocolo de síntesis para obtener AuNCs monodispersos (empleados en los Capítulos III y IV de la Tesis Doctoral) está recogido en la Sección de Procedimientos Generales. Se trata de una síntesis *bottom-up* empleando un ligando tiolado como agente estabilizante y NaBH₄ como reductor. Sin embargo, con el objetivo de reducir la dispersión asociada al diámetro de los AuNCs obtenida previamente con otra síntesis (AuNCs empleados en el Capítulo II), se evaluaron diferentes parámetros experimentales partiendo de los AuNCs previamente sintetizados¹⁶. En la **Figura 66** se resumen las diferentes estrategias ensayadas. Por una parte, con el objetivo de reducir la cinética de la reacción de reducción y tener un mayor control de la síntesis se evaluaron diferentes condiciones, como la temperatura de la síntesis (25°C u 8°C), el disolvente de la síntesis (agua o metanol), el disolvente utilizado para disolver el agente reductor (acetona o metanol), el pH de la síntesis (se evaluó un pH más básico), el tiempo de reacción, o el efecto que produce la disminución de la agitación durante la formación de los AuNCs (menos rpm). Adicionalmente, se evaluaron dos ligandos tiol: el ácido lipoico reducido (DHLLA) y el glutatión (GSH). Finalmente, se evaluó un post-tratamiento de los AuNCs recién sintetizados. En concreto, los

¹⁶ M. Cruz-Alonso, B. Fernandez, A. Navarro, S. Junceda, A. Astudillo, R. Pereiro. Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease. *Talanta*. 197, (2019), 413-421

AuNCs polidispersos se sometieron a un tratamiento de “enfoco de tamaño” para formar AuNCs monodispersos incubando la síntesis a 50°C durante 2 h.

Los AuNCs sintetizados fueron caracterizados en todos los casos siguiendo las etapas descritas en el Experimental General (**Sección C.4.3**): medidas por DLS para comprobar su índice de polidispersidad (PDI), medida de la emisión fluorescente (λ_{em} , 720 nm), y caracterización elemental por ICP-MS (se determinó el rendimiento de la síntesis y la concentración de Au en la suspensión coloidal). Finalmente, las síntesis de AuNCs seleccionadas como óptimas se midieron por HR-TEM para conocer el tamaño y estructura cristalina de los AuNCs (de manera similar a la caracterización llevada a cabo en el Capítulo I para los PtNCs).

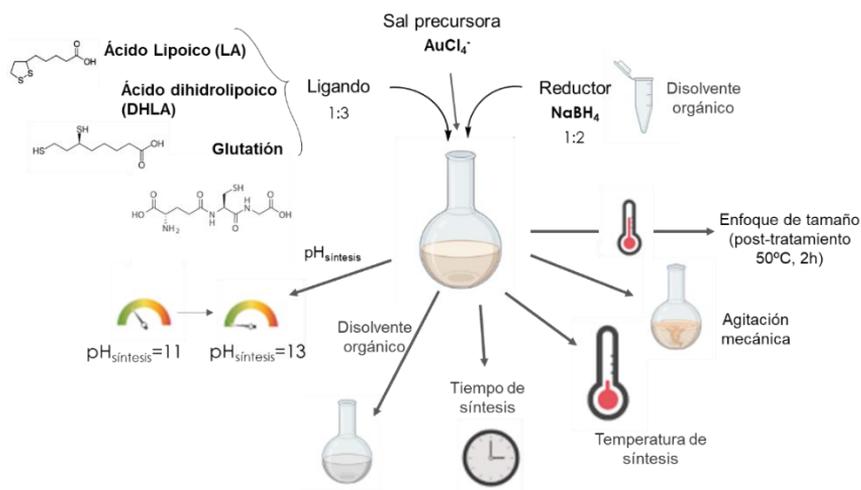


Figura 66: Esquema resumen de las diferentes estrategias ensayadas para la síntesis (bottom-up) de AuNCs monodispersos.

F.3.3.2. Síntesis y caracterización de las inmunosondas

Los AuNCs monodispersos fueron empleados como etiquetas de dos anticuerpos específicos para APOE y MT2A (Anti-h-APOE o Anti-h-MT2A). Para la bioconjugación se siguió el método de la carbodiimida, empleando una relación molar 1:3 Ab:AuNCs. Tras la purificación por ultracentrifugación, las inmunosondas

fueron caracterizadas para determinar su estequiometría (i.e., el factor de amplificación). Al igual que se describe en el Capítulo II para la caracterización de las inmunosondas con PtNCs, AuNCs y AgNCs, se realizó un ensayo ELISA directo con una proteína IgG de concentración conocida como estándar de calibración (concentraciones de 0 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para determinar la concentración de Ab disponible en la inmunosonda tras la bioconjugación. Además, se llevó a cabo el análisis elemental por ICP-MS para determinar la concentración de Au en la inmunosonda. Para ello, se realizó un calibrado externo de Au (de 0-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) empleando Pt como patrón interno (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

F.3.3.3. Cultivo de células HRPEsv40 y tratamientos inflamatorios

Las células HRPEsv40 se sembraron en diferentes soportes (p.ej., frascos, placas de 6 pocillos, o cámaras portaobjetos) y a diferentes niveles de concentración (rango entre $6\cdot 10^4$ - $20\cdot 10^6$ células/pocillo) dependiendo del tipo de ensayo a realizar; ensayo ELISA, qPCR, medias por fluorescencia, nebulización convencional ICP-MS, o LA-ICP-MS. Para una mejor comprensión de las diferentes condiciones celulares empleadas, en la **Tabla 12** se recoge de manera resumida el número de células, el tipo de soporte, y el procesamiento de las células para cada tipo de ensayo llevado a cabo en este Capítulo III de la Tesis Doctoral.

Tabla 12: Resumen de los diferentes experimentos llevados a cabo con las células HRPEsv40. En la Tabla se recoge el soporte empleado para el crecimiento celular, el número de células, y las etapas de procesamiento celular necesarias para realizar los diferentes experimentos. Trip.: tripsinización (tripsina-EDTA al 0,25%), Extr.: extracción.

Experimento	Soporte celular	Nº de células	Procesamiento celular	Denominación de la Muestra
Inmunoensayo ELISA	Flask T125	20·10 ⁶ células/flask	Trip. + lisado	Facción citosólica
qRT-PCR	Placa p6	1,2·10 ⁶ células/pocillo	Trip. + lisado + Extr. RNA	cDNA
Imaging celular (fluorescencia/LA-ICP-MS)	Cámara portaobjetos	6·10 ⁴ células/pocillo	Fijación (4% PFA)	Células intactas en portaobjetos
Patrones HRPEsv@AuNCs (LA-ICP-MS)	Cámara portaobjetos	6·10 ⁴ células/pocillo	Fijación (4% PFA)	Células intactas en portaobjetos
Patrones HRPEsv@AuNCs (ICP-MS)	Placa p6	1,2·10 ⁶ células/pocillo	Fijación (4% PFA) + Trip. + digestión ácida	Células digeridas

Los protocolos, tanto de crecimiento y expansión de la línea celular, como para la etapa de tratamiento proinflamatorio con IL-1 α están recogidos en la Sección Experimental General. Sin embargo, adicionalmente se investigaron también otros tratamientos inflamatorios con las células para seleccionar aquel que provoca un mayor cambio en la expresión de las proteínas bajo estudio (APOE y MT2A). A continuación, se describe el protocolo de manera resumida. Una vez las células HRPEsv40 alcanzan el 80% de confluencia en el soporte deseado, se les retira el medio completo (DMENF12 +10%FBSi +1% P/S), se lavan con PBS1x, y se les añade el medio libre de suero Hibridoma™ (suplementado con 5% de L-glutamina y 1% de P/S). Transcurridas 24 h (para asegurar que las células se adaptan al nuevo medio), estas son tratadas con el reactivo inflamatorio elegido en cada caso (**Tabla 13**). Paralelamente, en todos los diseños experimentales llevados a cabo (exceptuando los patrones unicelulares de calibración) se prepara un control celular (CT), es decir, células HRPEsv40 sin tratamiento. Para ello se mantienen en el medio libre de suero Hibridoma™ (5% de L-glutamina y 1% +P/S) durante 24 o 48 h. Trascurrido este tiempo, las células se lavan con PBS1x, y se preparan/procesan dependiendo del ensayo.

Tabla 13: Resumen de los diferentes tratamientos inflamatorios ensayados con las células HRPEsv40. TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta humana recombinante, DEX: Dexametasona, IL-1α: Interleuquina-1α humana recombinante.

Experimento	Tratamiento inflamatorio			Objetivo
	Reactivo	[Reactivo] (ng·mL ⁻¹)	Tiempo (h)	
qRT-PCR	TGFβ1	10, 60 y 120	24	Elección de tratamiento inflamatorio
	IL-1α	100	24 y 48	
	DEX	118, 235 y 392	24	
Inmunoensayo ELISA	IL-1α	100	24 y 48	Evaluación del tiempo
Imaging fluorescencia	IL-1α	100	48	Localización APOE y MT2A
Imaging LA-ICP-MS	IL-1α	100	48	Localización & cuantificación APOE y MT2A

F.3.3.4. Preparación de las células HRPEsv40 para qRT-PCR

La muestra necesaria para realizar las medidas de qRT-PCR es el DNA complementario (**Tabla 12**). Para su obtención, a partir de las células HRPEsv40 sembradas en las placas p6 (~1,2·10⁶ células por pocillo), tanto no tratadas (control) como tratadas (3 réplicas por condición - **Tabla 13**) se siguieron las siguientes etapas:

(1) Lisis de las células. Se añadieron 350 μL del tampón de lisis proporcionado por el kit comercial (RNeasy Mini Kit) que despega y lisa directamente las células en los pocillos. Se recogió el contenido en tubos Eppendorf (libres de RNAsas) y, posteriormente, se aisló el contenido total de ARN siguiendo las instrucciones y empleando los reactivos del Kit.

(2) Determinación de la concentración y calidad del RNA extraído. Para ello se midió la relación de absorbancias medidas a 260 nm y 280 nm con el espectrofotómetro Picodrop™ (valores entre 2,0-2,2 unidades indican buena calidad del ARN), y se utilizó una concentración conocida de BSA como estándar de calibración.

(3) Obtención de DNA complementario. Se toma 1 µg de ARN (de cada condición y réplica) y se transcribe a ADN complementario (ADNc) mediante la enzima transcriptasa inversa ("High Capacity RNA-to-cDNA") utilizando el siguiente protocolo: 5 min a 25°C, 90 min a 37°C, y 5 min a 95°C en el termociclador.

(4) Realización de la qRT-PCR. La expresión génica de APOE y MT2A se determinó mediante detección fluorescente de los ciclos de expresión utilizando la sonda fluorescente TaqMan®. Todas las amplificaciones PCR se realizaron mediante el siguiente protocolo: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los ciclos de PCR obtenidos para cada gen (APOE o MT2A) se compararon con un gen control endógeno (gen GUSB) realizando cada medida por triplicado.

Indicar que, durante el manejo de las muestras, estas se mantuvieron en hielo todo el tiempo y se empleó material y reactivos libres de ARNsas.

F.3.3.5. Preparación de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante inmunoensayo ELISA

La cuantificación de APOE y MT2A empleando los kits comerciales ELISA se llevaron a cabo en las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 (**Tabla 12**). Para ello, una vez transcurridas las 24 ó 48 h de tratamiento inflamatorio con citoquina IL1α (**Tabla 13**), las células son recolectadas y procesadas de la siguiente manera:

(1) Tripsinización y recolección del pellet celular. Se añaden 6 mL de tripsina-EDTA al 0,25% a las células sembradas en los *flask* T125, se incubaron durante 3 min (37°C en 5% de CO₂) y, posteriormente, se añadieron 20 mL por *flask* de DMENF12 para detener la actividad de la tripsina (y evitar así el lisado de las células). El contenido de cada *flask* (1 *flask* por condición, n=3) se recogió en diferentes tubos falcon y se aisló el pellet celular mediante centrifugación suave (3 min a 1176 g), descartando el sobrenadante. Por último, para eliminar las células muertas, el pellet

se lavó una vez con PBS1x, y se descartó el sobrenadante tras su centrifugación (3 min a 1176 g).

(2) **Conteo celular.** Se realiza el conteo manual de las células con el hemocitómetro para llevar a cabo la posterior normalización de los resultados. Para ello las células son suspendidas en PBS1x. Tras llevar a cabo el conteo, se retira el PBS1x mediante centrifugación suave.

(3) **Lisado mecánico del pellet celular.** Se añaden 500 μ L de tampón Tris-HCl (pH 7,4) para resuspender el pellet celular justo antes de realizar la lisis celular empleando la sonda de ultrasonidos. Para ello, los pellets celulares se sometieron a ciclos de ultrasonidos de 10 kHz de forma intermitente durante 30 s (3 veces) en un baño con hielo. A continuación, se centrifugó el lisado celular (15300 g x 30 min a 4°C) para separar la fracción citosólica de la membrana celular. Finalmente, se recogió el sobrenadante (fracción citosólica) y se almacenó a -80°C para la cuantificación de APOE y MT2A con los kits ELISA, mientras que el pellet (membrana celular) se desechó.

F.3.3.6. Preparación de las células HRPEsv40 para inmunocitoquímica

Para llevar a cabo los procesos de ICC en las células HRPEsv40, tal y como se describe en la **Tabla 12**, las células fueron sembradas en las cámaras portaobjetos en una concentración de $6 \cdot 10^4$ células por pocillo, con el objetivo de tener una monocapa de células individuales. Tras someterlas al tratamiento proinflamatorio con IL-1 α durante 48 h (o sin tratamiento, células control 48 h, **Tabla 13**), se retira el medio mediante drenaje y se lava con PBS 1x. Posteriormente, y previo a la ICC, las células deben ser fijadas. Para ello se añadieron 400 μ L de paraformaldehído al 4% (PFA 4 %) a cada pocillo y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el contenido y se procedió a su lavado añadiendo PBS 1x (3 veces). Las células se dejaron con 200 μ L de PBS 1x y en nevera (4°C) hasta ser empleadas.

F.3.3.7. Protocolo de ICC para la inmunolocalización de APOE y MT2A en células HRPEsv40 fijadas

□ ICC empleando las inmunosondas con AuNCs

Los ensayos ICC para la determinación de las dos proteínas citosólicas seleccionadas en células HRPEsv40 se llevaron a cabo utilizando una estrategia de biomarcador único usando de manera secuencial (i.e., en dos muestras diferentes de células) las dos inmunosondas metálicas sintetizadas (Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs), tanto en células control (CT) como en células sometidas al tratamiento con IL-1 α durante 48 h (**Tabla 13**). A continuación, se detallan las etapas del protocolo ICC llevado a cabo, donde se indica también las etapas adicionales dependiendo de cómo se realiza la detección de las proteínas; ICC con detección directa de la fluorescencia (se emplean las inmunosondas marcadas con AuNCs y se detecta la fluorescencia de los AuNCs por microscopía confocal) o detección elemental por LA-ICP-MS siguiendo la intensidad de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (AuNCs).

Las etapas comunes del protocolo ICC (**Figura 67**) incluyen: 1) permeabilización de las membranas celulares empleando 400 μL de PBS con 0,1% de Triton X-100 durante 30 min, 2) lavado (3 veces) con 400 μL de PBS-0,05% de tween-20, 3) etapa de bloqueo con 400 μL de PBS con 10% de suero de burro y 1% de BSA durante 1 h a temperatura ambiente, 4) incubación durante la noche a 4°C de las inmunosondas con AuNCs (400 μL de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Anti-h-APOE:AuNCs o 400 μL de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Anti-h-MT2A:AuNCs, concentración relativa al Ab) en PBS con 5% de suero de burro y 1% de BSA, y 5) lavado con 400 μL de PBS (3 veces).

- En el caso del ICC directo con detección elemental (LA-ICP-MS) las células HRPEsv40 se mantuvieron en PBS1x en las cámaras portaobjetos hasta su análisis para garantizar la integridad celular (el PBS se retiró justo antes del análisis por LA-ICP-MS).
- En el caso del ICC directo con detección fluorescente (microscopía láser confocal) se deben añadir dos etapas al protocolo anterior: 6) tinción con 4',6-diamino fenilindol (DAPI) durante 10 min (temperatura ambiente y

oscuridad) para la visualización de los núcleos celulares, y 7) tras un lavado con PBS se añade una gota de medio de montaje de fluorescencia para finalmente colocar un cubreobjetos sobre cada muestra y poder medirla por microscopía confocal.

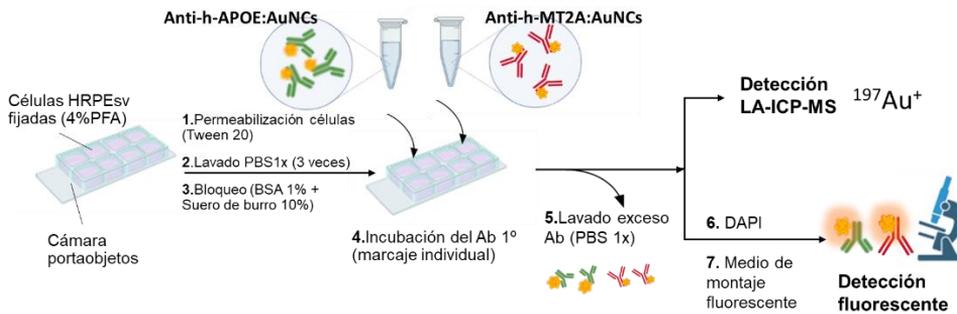


Figura 67: Etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección directa de los AuNCs por LA-ICP-MS o fluorescencia empleando las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs.

Indicar que además se prepararon controles negativos tanto para las células HRPEsv40 CT como para las tratadas con IL-1 α . Estos controles incluyeron la adición de AuNCs sin el Ab primario para evaluar la existencia de posibles interacciones inespecíficas de los AuNCs.

□ ICC indirecto para la detección fluorescente empleando Alexa®

Este ensayo se realizó para determinar la concentración óptima de los anticuerpos primarios empleados en el ensayo ICC directo, así como para validar la distribución de la APOE y MT2A encontradas por la metodología de análisis desarrollada en este Capítulo III donde las proteínas se determinan por LA-ICP-MS. El protocolo incluye todas las etapas previamente descritas para el ICC directo (etapas 1-5), teniendo en cuenta que, en la etapa 4 en vez de las inmunosondas marcadas con AuNCs, se incuban los anticuerpos sin bioconjugador (Anti-h-APOE o Anti-h-MT2A:AuNCs). En la **Figura 68** se resumen las etapas llevadas a cabo para el protocolo ICC indirecto.

Los pasos adicionales para la detección indirecta de la fluorescencia incluyen: 6) incubación con el Ab secundario IgG de cabra anti suero de conejo:Alexa® 594 e IgG de burro anti suero de cabra:Alexa® 488 para detectar respectivamente los Ab primarios Anti-h-MT2A y Anti-h-APOE (2 h a temperatura ambiente y en oscuridad), 7) lavado 3 veces con PBS, 8) adición de la tinción DAPI durante 10 min (temperatura ambiente y oscuridad) para la localización de los núcleos celulares, 9) lavado con PBS; y 10) adición de una gota de medio de montaje de fluorescencia para colocar un cubreobjetos sobre cada muestra.

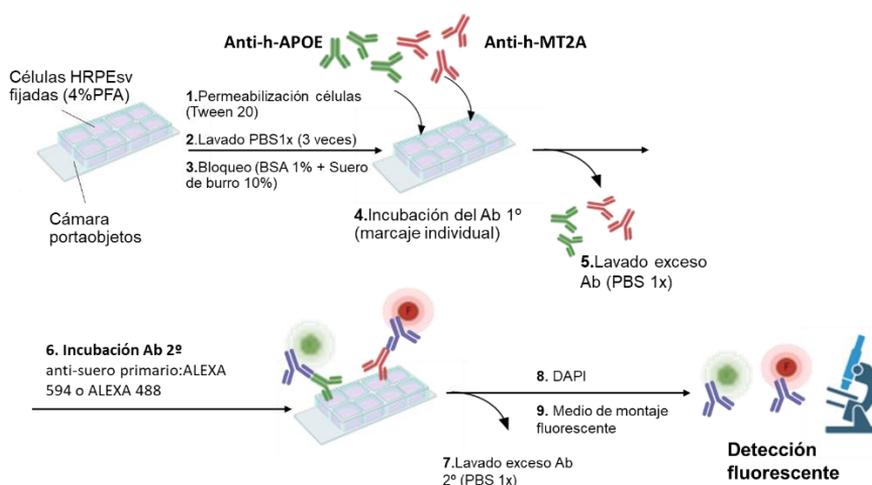


Figura 68: Esquema de las etapas del protocolo ICC con las células HRPEsv40 para la detección indirecta empleando anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos Alexa®.

En este caso, los controles negativos incluyeron no añadir el Ab primario para evaluar la especificidad del Ab secundario y asegurar así que la fluorescencia detectada sólo procede de las proteínas de interés.

F.3.3.8. *Imaging* de proteínas en células individuales mediante LA-ICP-MS

Las células HRPEsv40 sometidas al ensayo ICC con las inmunosondas metálicas (Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2:AuNCs) fueron analizadas por LA-ICP-MS con las condiciones optimizadas recogidas en la **Tabla 11**. De esta manera se obtuvo el *imaging* con la distribución de APOE o MT2A en cada célula individual siguiendo la señal de la marca metálica ($^{197}\text{Au}^+$), tanto para células HRPEsv40 CT

como sometidas a tratamiento inflamatorio con IL-1 α . Las imágenes 2D se construyeron a partir de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ para cada célula individual utilizando el software Iolite (v4). Además, el programa permitió conocer la intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ total para el *imaging* de cada célula individual y conocer el número de píxeles que ocupa cada célula. De esta manera, se obtuvieron valores para la intensidad total de Au normalizada por píxel, para cada célula analizada por LA-ICP-MS. En el esquema de la **Figura 69** en azul se resumen las etapas que se deben llevar a cabo para obtener el *imaging* de cada proteína en cada célula.

F.3.3.9. Preparación de los patrones de calibración unicelulares (HRPEsv@AuNCs)

Con el fin de realizar una calibración con patrones *matrix-matched* por LA-ICP-MS, se propone la preparación en el laboratorio de patrones unicelulares empleando las mismas células que las células que son analizadas como muestra (HRPEsv40). Para ello, una vez las células han crecido en los soportes adecuados (ver **Tabla 12**) y siguiendo el protocolo de expansión y crecimiento celular descrito en la **Sección C.4.7**, estas fueron suplementadas con diferentes concentraciones de una suspensión de AuNCs libres (i.e., sin bioconjugado con ningún Ab). Para la internalización de los AuNCs por parte de las células HRPEsv40, se emplearon suspensiones de AuNCs con una concentración de 0, 5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (suspensiones de AuNCs en medio rico en suero DMEMF12) durante 24 h siguiendo un protocolo descrito previamente en la bibliografía¹⁷. Tras la internalización de los AuNCs, las células son tratadas de dos maneras diferentes: a) por un lado, las células son caracterizadas para determinar el contenido de Au promedio por célula en cada tratamiento de suplementación, y b) las células son fijadas en las cámaras portaobjetos para ser analizadas por LA-ICP-MS (en las mismas condiciones que las células HRPEsv40 donde se quiere determinar APOE y MT2A).

¹⁷ X. Cai, H.H. Chen, C.L. Wang, S.T. Chen, S.F. Lai, C.C. Chien, Y.Y. Chen, I.M. Kempson, Y. Hwu, C.S. Yang, G. Margaritondo, Imaging the cellular uptake of tiopronin-modified gold nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 809-816.

En la **Figura 69** (parte izquierda de la imagen), se detalla un esquema con la preparación y caracterización de los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs. Por un lado, con los patrones HRPEsv@AuNCs se llevó a cabo un análisis por ICP-MS con nebulización convencional para determinar la concentración de Au en cada una de las células. Para ello, se recogieron las células HRPEsv@AuNCs de las placas de 6 pocillos: 1) las células se incubaron con 0,5 mL/pocillo de 0,25% tripsina-EDTA (pH 7,4) dentro de la incubadora durante 3 min, 2) se añadieron 2 mL de medio completo DMEMF12 (+10% de FBSi +1% de P/S) para bloquear la actividad de la tripsina, 3) se recogió la suspensión celular en un tubo Eppendorf, 4) tras el lavado del pellet celular por centrifugación con PBS1x las células se contaron manualmente con el hemocitómetro, 5) posteriormente, se llevó a cabo la digestión celular utilizando agua regia. Para ello se añadieron 0,5 mL de agua regia (HNO₃:3HCl) por pellet celular y, tras 1 h, se sometieron a vibración por ultrasonidos durante 2 h. Las digestiones de las células HRPEsv@AuNCs se diluyeron finalmente con agua ultra-pura, hasta una concentración adecuada para su análisis por ICP-MS. Para determinar el contenido de Au en cada una de las poblaciones celulares (HRPEsv40 células suplementadas con diferentes concentraciones de AuNCs), se realizó una calibración externa con estándares de Au en disolución, utilizando Pt como patrón interno. La concentración de Au encontrada por ICP-MS para cada una de las poblaciones celulares se normalizó teniendo en cuenta el número de células.

Por otro lado, los patrones de células HRPEsv@AuNCs fijadas en las cámaras portaobjetos fueron analizados individualmente por LA-ICP-MS. Las células fijadas (cultivadas y tratadas en los portaobjetos) se almacenaron en el frigorífico con un pequeño volumen de PBS (~200 µL) para evitar su secado y rotura celular. Tal y como se ha comentado para las muestras, justo antes de ser analizadas por LA-ICP-MS se retiran las paredes de la cámara portaobjetos y se drena cuidadosamente el PBS1x. Para el análisis de los patrones HRPEsv@AuNCs se analizaron ~30 células individuales para cada concentración suplementada con AuNCs. Como se muestra en la **Figura 69**, tras el análisis de las células por LA-ICP-MS es posible construir una imagen 2D de la señal de ¹⁹⁷Au⁺ para cada célula individual utilizando el software

Iolite (v4), y de este modo determinar la intensidad promedio de $^{197}\text{Au}^+$ por píxel en cada célula.

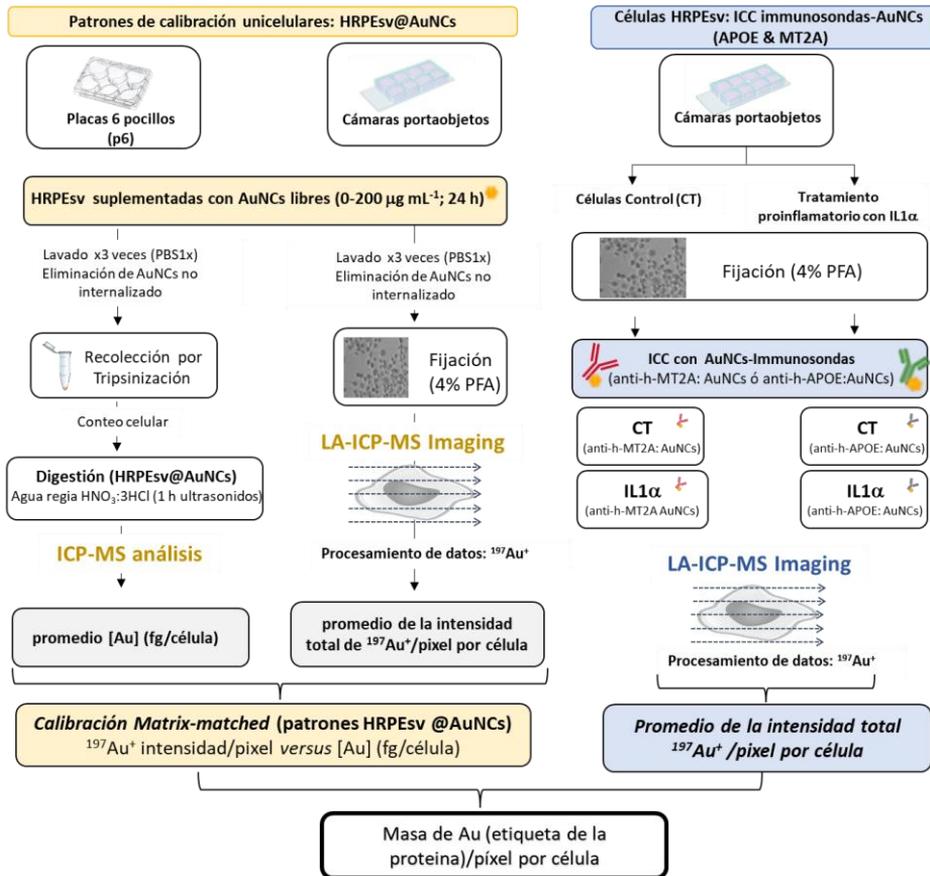


Figura 69: Resumen de las etapas necesarias para llevar a cabo la determinación de proteínas (APOE y MT2A) en células HRPEsv40 empleando LA-ICP-MS y marcaje de las células con AuNCs. La estrategia de calibración propuesta está basada en la síntesis y caracterización de patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs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

F.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se detallan los resultados experimentales obtenidos para el Capítulo III. Los mismos están divididos en tres secciones: 1) síntesis de AuNCs homogéneos, así como caracterización de su tamaño, 2) estudios relacionados con los tratamientos inflamatorios de las células HRPEsv40, donde se evalúa la expresión de APOE y MT2A, y 3) desarrollo de una nueva estrategia de calibración *matrix-matched* empleando patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs para obtener el *imaging* cuantitativo de APOE y MT2A en células HRPEsv40 (CT & IL1 α) empleando LA-ICP-MS e inmunosondas marcadas con AuNCs.

F.4.1. Síntesis de AuNCs monodispersos

F.4.1.1. Evaluación del índice de polidispersidad (PDI)

El primer estudio realizado para la síntesis de AuNCs monodispersos fue la evaluación del tiempo de reacción. Para ello, se estudiaron diferentes tiempos de reacción en el rango de 0 a 24 h, evaluando las diferentes disoluciones de AuNCs por DLS. Los resultados experimentales obtenidos mostraron que los tiempos de reacción más largos aumentan la dispersión en tamaño de los AuNCs: al disminuir el tiempo de reacción de 15 h a 4 h, se observó una mejora significativa del índice de polidispersidad (PDI) de 0,4 a 0,28. En la **Figura 70** se muestran los valores de PDI obtenidos para la síntesis de AuNCs hasta un tiempo de 24 h de reacción.

Por otra parte, también se midió la emisión de fluorescencia para cada una de las síntesis de AuNCs a los diferentes tiempos de reacción ($\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 730 \text{ nm}$). Como se muestra en la **Figura 70b**, se observó una mayor emisión de fluorescencia utilizando un tiempo de reacción entre 4-8 h frente a las síntesis que emplean tiempos más largos, confirmando así los valores observados para el PDI a bajos tiempos de reacción.

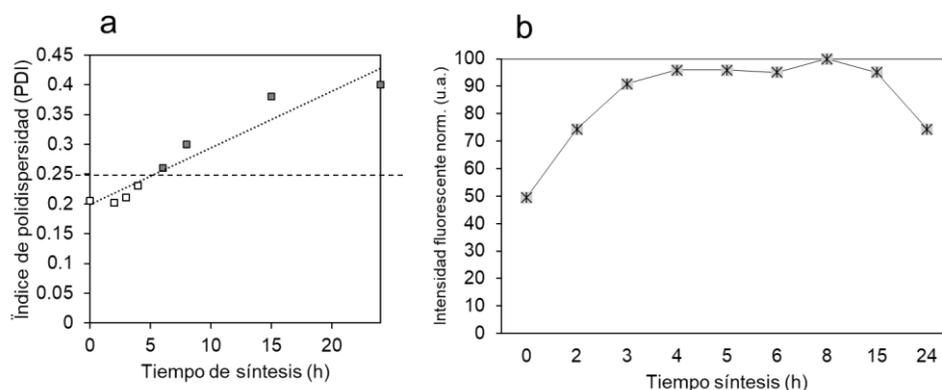


Figura 70: Caracterización de la síntesis de AuNCs empleando diferentes tiempos de reacción (temperatura ambiente). a) Índice de polidispersidad (PDI) en función del tiempo de síntesis, y b) Emisión fluorescente a 720 nm. La raya discontinua horizontal en la gráfica a, denota el nivel máximo al cual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

Una vez seleccionadas 4 h como tiempo máximo para la síntesis de AuNCs, se ensayaron varias estrategias para disminuir la cinética de reducción química. Tal y como se discutió en el Capítulo 1 de la Tesis Doctoral, una elevada desviación de los tamaños está directamente asociado a un bajo control de la reacción de reducción química. El NaBH_4 es un reductor fuerte y, por tanto, las reacciones son rápidas e incontroladas. En este contexto, se planteó la hipótesis de que una cinética más lenta de la reducción química puede permitir un mejor control en el crecimiento de los AuNCs, dando lugar a tamaños más homogéneos. De este modo, se utilizaron diferentes estrategias para disminuir el poder de reducción del agente reductor: emplear un medio más básico, disolventes orgánicos (metanol), o bajas temperaturas (síntesis a 4°C para disminuir el poder de reducción del agente reductor. Los resultados experimentales mostraron que sólo al aumentar el pH de la síntesis (pH = 13) fue posible reducir el PDI hasta un valor de 0,12, siendo el PDI de la síntesis original de 0,4 (pH de 11 y un tiempo de reacción de 15 h), valor que indica una dispersión de tamaños moderada.

En cuanto al uso de diferentes ligandos tiolados, se confirmó que los tioles bidentados (p.ej., el ácido lipoico, LA) son los que proporcionan un mejor control

durante el crecimiento de las AuNCs. El uso del LA, especialmente en su forma reducida (i.e., DHLA), aseguró que los grupos sulfhidrilos estuvieran disponibles para la quimisorción directa en la superficie de Au. Las medidas por DLS de los AuNCs sintetizados con DHLA mostraron un PDI de 0,18. Por el contrario, el uso de ligandos monodentados (p.ej., GSH) para la síntesis de AuNCs mostró medidas de mala calidad por DLS: se encontraron poblaciones de diferentes tamaños, así como un valor de PDI >1 (altamente polidisperso).

La última estrategia evaluada para la síntesis de AuNCs monodispersos se basó en el empleo de un paso post-síntesis (denominado como etapa de envejecimiento, o de enfoque de tamaños), consistente en incubar los AuNCs sintetizados a 50°C durante 2 h (justo después de la síntesis). Este enfoque basado en estrategias *top-down*, produjo un reajuste de tamaño de los AuNCs polidispersos (PDI 0,38) hasta alcanzar una elevada monodispersidad en el tamaño de los AuNCs: se obtuvo un valor para el PDI inferior a 0,1 (elevada monodispersión de la suspensión coloidal).

F.4.1.2. Caracterización estructural de los AuNCs@LA y AuNCs@DHLA

Las estrategias que mostraron resultados prometedores según el PDI (i.e., PDI bajos), fueron la síntesis empleando DHLA como ligando (AuNCs@DHLA) y la síntesis empleando LA con el tratamiento de enfoque de 2 h a 50°C (AuNCs@LA-*post-trat*). Por este motivo, ambas fueron caracterizadas por HR-TEM para conocer su tamaño, dispersión, y esclarecer su estructura cristalina.

A partir de las micrografías obtenidas para cada síntesis (**Figura 71**), se miden con el programa Fiji-ImageJ los diámetros de las estructuras. Las imágenes de HR-TEM mostraron que los AuNCs@DHLA tienen un diámetro de $1,99 \pm 0,4$ nm, mientras que los AuNCs@LA-*post trat* tienen un diámetro de $1,90 \pm 0,4$ nm (99% confianza, $n = 100$ AuNCs en cada caso). Además, a partir de los patrones de difracción SAED (**Figura 71 c y f**), se pueden obtener dos conclusiones (ver protocolo de caracterización estructural en la **Sección C.4.3.2**): 1) Atendiendo a los anillos de difracción, los cuales están formados por puntos aislados, se confirma que es una estructura cristalina, y 2) se pudieron obtener los valores de dL -spacing (separación entre

planos atómicos de la estructura cristalina), mostrando en ambos casos una estructura cristalina con red cúbica centrada en las caras (i.e., 4 átomos de Au por celda unidad).

Por lo tanto, una vez conocidos sus radios atómicos y su celda unidad (4 átomos de Au por celda), y teniendo en cuenta la densidad del Au ($19,32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y su peso atómico ($196,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) se puede determinar el número de átomos de Au que forman cada AuNCs. Para el caso de los AuNCs@DHHLA, están compuestos por 243 átomos de Au, mientras que en el caso de los AuNCs@LA-*post-trat* están compuestos por 212 átomos de Au.

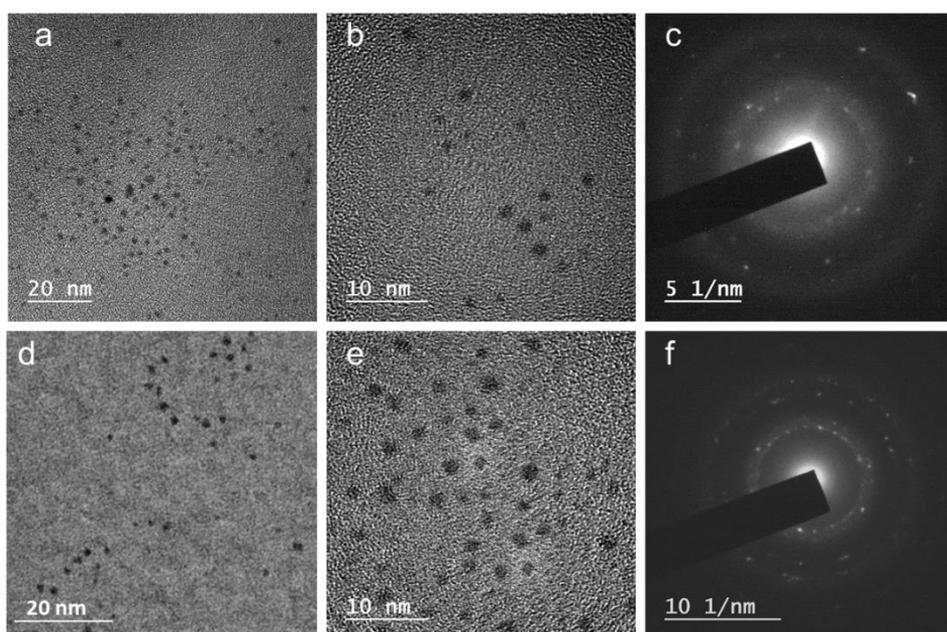


Figura 71: Micrografías obtenidas por HR-TEM para la caracterización estructural de las síntesis de AuNCs. a-c) AuNCs @DHHLA, y d-f) AuNCs@LA-aging. Las imágenes e y f se corresponden con las imágenes obtenidas para el patrón SAED.

F.4.1.3. Caracterización elemental de los AuNCs@LA y AuNCs@DHHLA por ICP-MS

Al igual que se hizo en el Capítulo I para los PtNCs, para averiguar el rendimiento de la síntesis de AuNCs, así como la concentración de Au en la suspensión coloidal, los AuNCs fueron digeridos con agua regia (ver protocolo en **Sección**

C.4.2) y tras ser diluidos en agua ultrapura (% ácido <3% v/v), el contenido de Au fue determinado por ICP-MS con nebulización convencional llevando a cabo un calibrado externo de Au con patrones en disolución (Ir como patrón interno). Los rendimientos de las síntesis se determinaron teniendo en cuenta la concentración de Au en la disolución madre (sal precursora del metal), la cual fue de $94,72 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Las concentraciones de Au y de AuNCs se resumen en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Resultados obtenidos por ICP-MS para la determinación de la concentración de Au en las síntesis de AuNCs: AuNCs@LA-aging y AuNCs@DHHLA. Rend.: rendimiento de la reacción. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar de tres digestiones ácidas de cada síntesis medida por ICP-MS.

Síntesis	[Au] síntesis AuNCs ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	% Rend.	Molaridad (moles Au $\cdot\text{L}^{-1}$)	Nº átomos Au por AuNCs	Molaridad (moles AuNCs $\cdot\text{L}^{-1}$)
AuNCs@LA-aging	$83,30 \pm 0,06$	88	$4,23\cdot 10^{-4}$	212	$1,99\cdot 10^{-6}$
AuNCs@DHHLA	$82,46 \pm 0,05$	87	$4,19\cdot 10^{-4}$	246	$1,72\cdot 10^{-6}$

Ambas síntesis presentan unas características similares en cuanto a desviación de tamaños, diámetro de las nanoestructuras, o rendimiento de la síntesis, y ambas poseen un PDI cercano a 0,1 (suspensión altamente monodispersa). Sin embargo, la síntesis empleando DHHLA como ligando protector no presenta elevada fluorescencia: la emisión fluorescente en los AuNCs@DHHLA apenas alcance las 30 cuentas de intensidad, mientras que la síntesis de AuNCs@LA-aging presenta una intensidad cercana a las 200 cuentas. Por tanto, tras todos los estudios de caracterización se selecciona la síntesis de AuNCs@LA-aging como la óptima para emplearlos como marca elemental (y fluorescente) para la síntesis de inmunosondas específicas para la determinación de proteínas en células individuales.

F.4.2. Elección del tratamiento inflamatorio para las células HRPEsv40: análisis qRT-PCR y ELISA

Tanto la APOE como la MT2A son dos proteínas implicadas en procesos biológicos relacionados con la inflamación. Además, se conoce que ambas proteínas bajo efectos de estrés oxidativo y consecuente inflamación de los tejidos oculares (complejo ERP-MBr-coroides) presentan cambios en sus niveles de expresión (in-

cremento o disminución). De esta manera, el primer estudio que se realizó es la evaluación de diferentes tratamientos inflamatorios en las células inmortalizadas HRPEsv40 para encontrar el tratamiento que provoque cambios en la expresión de dichas proteínas, los cuales serán posteriormente evaluados empleando LA-ICP-MS (y posteriormente en el Capítulo IV por sc-ICP-MS).

En la **Tabla 13**, se recogen los reactivos, concentraciones, y tiempos aplicados durante los tratamientos inflamatorios en los cultivos celulares HRPEsv40. Para las diferentes condiciones se tuvieron en cuenta estudios previamente publicados^{18,19,20,21}. Sin embargo, exceptuando la IL-1 α (la cual había sido previamente estudiada con HRPEsv40¹⁸), la TFGB1¹⁹ y la DEX²⁰ habían sido aplicados en otro tipo de células (monocitos y células del estroma, respectivamente). Por ello, una manera rápida de hacer un cribado de los tratamientos es mediante el estudio de la expresión de los genes que codifican las proteínas: el gen Hs02379661_g1 (MT2A) y el gen Hs00171168_m1 (APOE) bajo los efectos de cada tratamiento llevando a cabo análisis por qPCR. Este tipo de análisis es una manera indirecta de conocer la tendencia de la expresión de las proteínas bajo diferentes tratamientos de suplementación.

F.4.2.1. Análisis de la expresión genética por qRT-PCR (APOE y MT2A)

Tal y como se comentó en el apartado experimental, se lleva a cabo una cuantificación por PCR relativa, es decir los ciclos de la expresión de cada gen obtenidos tras realizar la PCR son normalizados con los ciclos de un gen control o “*housekeeping*”. En nuestro caso se empleó el gen de GUSB. El número de ciclos del gen “*housekeeping*” deben permanecer por definición invariables, independientemente de cuales sean las

¹⁸ L. Alvarez, H. Gonzalez-Iglesias, M. Garcia, S. Ghosh, A. Sanz-Medel, M. Coca-Prados, The stoichiometric transition from Zn6Cu1-metallothionein to Zn7-metallothionein underlies the up-regulation of metallothionein (MT) expression: quantitative analysis of MT-metal load in eye cells, *J. Biol. Chem.* 287, (2012), 28456-28469.

¹⁹ N.N. Singh, D.P. Ramji. Transforming growth factor-beta-induced expression of the apolipoprotein E gene requires c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase, and casein kinase 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, (2006), 1323-1329.

²⁰ S. Zeitouni, B.S. Ford, S.M. Harris, M.J. Whitney, C.A. Gregory, D.J. Prockop. Pharmaceutical induction of ApoE secretion by multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). *BMC Biotechnol.* 29, (2008), 75.

condiciones a las que se someten las células. Si se producen cambios en los ciclos de expresión de GUSB, se debe seleccionar otro gen “*housekeeping*” puesto que los resultados no son fiables. Adicionalmente, de cara a poder evaluar y comparar los cambios de expresión de cada gen de APOE y MT2A, paralelamente se preparan células HRPEsv40 CT para 24 y 48 h (i.e., células que no se someten al proceso de inflamación).

En la **Figura 72** se pueden observar los resultados obtenidos por qRT-PCR para los diferentes tratamientos. Por una parte, se pudo observar que el TGFB1 no provoca variación en la expresión de los genes, independientemente de la concentración ensayada (20-120 ng·mL⁻¹). Para poder considerar un incremento en la expresión o disminución, se debe experimentar al menos una alteración de 2 ó 0,5, respectivamente. De la misma manera, las condiciones de tratamiento con DEX, aunque parece favorecer un incremento a la alza de la expresión del gen de la MT2A (el valor para RQ es el doble que sin tratamiento), el gen de la APOE permanece invariable. Por otro lado, si se presta atención al tratamiento con la citoquina proinflamatorio (IL-1 α) a las 24 h de tratamiento, se observa un incremento de casi 5 veces la expresión del gen de MT2A (RQ de 4,7) y una disminución de la expresión en el caso de APOE (RQ de 0,5). Este efecto antagonista que provoca la IL-1 α en la expresión de la APOE y MT2A resulta interesante desde el punto de vista biológico y por ello se ensayó adicionalmente un tiempo de tratamiento más largo (48h), para el cual se observó la misma tendencia.

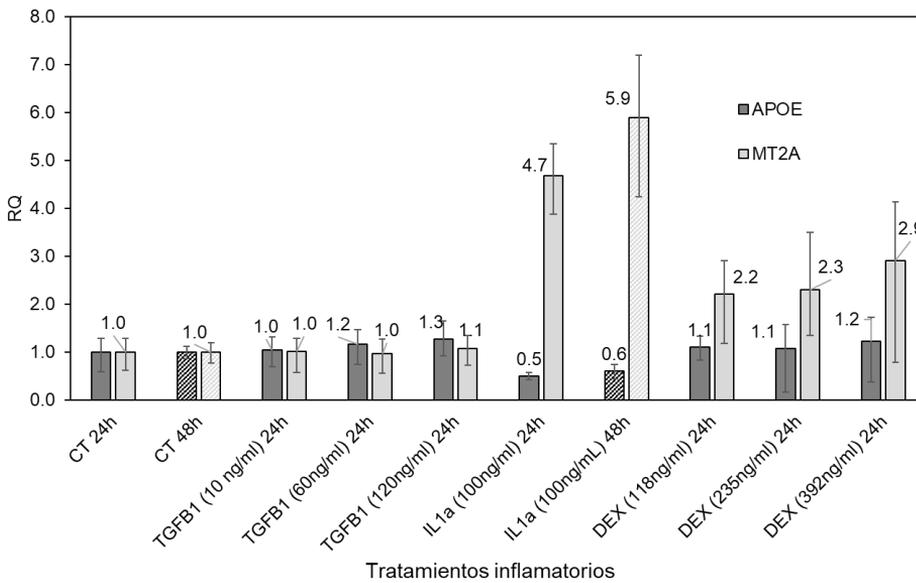


Figura 72: Resultados de qRT-PCR para los genes de APOE y MT2A tras varios tratamientos inflamatorios: TGFB1, IL-1 α y DEX empleando diferentes concentraciones y tiempo de incubación. Empleo del gen GUSB como control endógeno para la normalización. Las barras de error corresponden a los números de ciclos de expresión obtenidos para RQ máximo y RQ mínimo. RQ: cuantificación relativa.

F.4.2.2. Determinación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 por ELISA

A continuación se realizó la cuantificación de las dos proteínas (APOE y MT2A) en las fracciones citosólicas de células HRPEsv40 que fueron sometidas a un tratamiento de suplementación con IL-1 α (100 ng·mL⁻¹) durante 24 h y 48 h mediante ensayo inmunoenzimático ELISA. Además, también se llevó a cabo el análisis de células CT (i.e., sin tratamiento con IL-1 α),

Tras determinar la concentración promedio de APOE en las fracciones citosólicas de un cultivo de células HRPEsv40 CT (24 y 48 h) y tratado con IL-1 α (24 y 48 h), los valores obtenidos se normalizaron con el número de células determinado mediante conteo manual previamente a la lisis. Los resultados indicaron que la expresión de la proteína disminuía en las células tras las 48 h de tratamiento, pasando de $17,94 \pm 1,30$ a $10,19 \pm 0,53$ fg de APOE promedio por célula. Esto corresponde con una reducción en la concentración de proteína de un factor de 0,44. Así mismo, no se observó esa disminución tan clara en la concentración de APOE a las 24 h de

tratamiento (**Figura 73a**). Estos resultados coinciden con lo esperado tras los resultados obtenidos previamente por qPCR. La qPCR indicaba que a las 24 h se producía una disminución del 50% de expresión del gen que codifica dicha proteína, sin embargo, este efecto en la síntesis nueva de proteína en las muestras se observa a posteriori (una vez eliminada la proteína basal de la muestra por los procesos metabólicos comunes).

Paralelamente, en otra alícuota de la misma fracción citosólica obtenida de la población de células tratadas 48 h con IL-1 α , se determinó la concentración de MT2A (normaliza de nuevo con el número de células). En este caso se observó un incremento en la concentración de MT2A en un factor de 1,9: $1,74 \pm 0,28$ fg de MT2A promedio por célula en las células HRPEsv40 CT que se incrementa hasta $3,36 \pm 0,50$ fg de MT2A promedio por célula tras el tratamiento inflamatorio (**Figura 73b**).

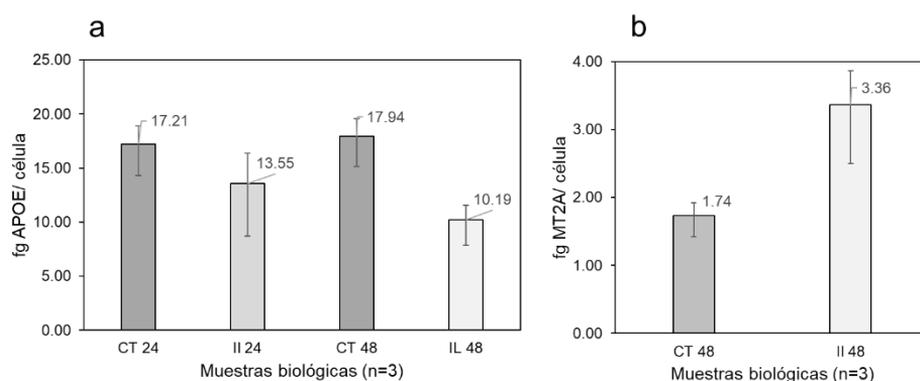


Figura 73: Concentración de proteína (expresada en fg de proteína por célula) obtenida mediante un ensayo ELISA (kit comercial) para las células HRPEsv40 CT y sometidas a un tratamiento inflamatorio con IL-1 α (24 h y 48 h). a) APOE, y b) MT2A. Las barras de error corresponden a la desviación propagada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

F.4.3. Optimizaciones previas del ensayo inmunocitoquímico para la detección de APOE y MT2A

Entre las optimizaciones llevadas a cabo para asegurar un total reconocimiento de las proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en las células fijadas HRPEsv40 (células

CT y tratadas con IL-1 α 48 h) se incluyen: 1) estudios de caracterización de las inmunosondas (Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs) para determinar el número de átomos de Au por Ab disponible, y 2) optimización de la concentración adecuada de Ab primario así como asegurar una correcta penetración de las inmunosondas en las células, que asegure la completa detección de cada proteína en las células del HRPEsv.

F.4.3.1. Caracterización de las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs

Para obtener la cuantificación absoluta de proteínas en las células es necesario conocer el número medio de átomos de Au por inmunosonda (i.e., el factor de amplificación). Siguiendo una estrategia similar a la descrita en el Capítulo II, se llevaron a cabo dos experimentos después de realizar el procedimiento de bioconjugación de los anticuerpos primarios con los AuNCs (inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs). En primer lugar, se realizó la cuantificación del Ab disponible después de la bioconjugación empleando un ensayo ELISA directo con un estándar de proteína (IgG) para construir la curva de calibración (0 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los resultados experimentales mostraron una concentración para el Ab disponible de $7,40 \pm 0,31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que corresponden a $2,95\cdot 10^{13} \pm 0,12\cdot 10^{13}$ moléculas de Ab en las inmunosondas. Respecto a la concentración de Au en las inmunosondas, los bioconjugados digeridos se analizaron mediante ICP-MS con nebulización convencional obteniéndose unos valores para la concentración de Au de $4,46 \pm 0,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ que corresponden a $1,37\cdot 10^{16} \pm 0,23\cdot 10^{16}$ moles de átomos de Au. De este modo, el factor de amplificación calculado como la relación entre el número de átomos de Au y las moléculas de Ab disponible resultó ser de 466 ± 18 átomos de Au por inmunosonda (relación molar Ab:AuNCs de 1:2,2). Indicar que el factor de amplificación es el mismo para las dos inmunosondas (Anti-h-APOE:AuNCs y anti-h-MT2A:AuNCs): en ambos casos se emplean los mismo AuNCs y los anticuerpos primarios son de la misma clase (IgG). Se observó un resultado similar para los

PtNCs empleado en el Capítulo II con las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs y Anti-h-APP:PtNCs.

F.4.3.2. Optimización la concentración de los anticuerpos primarios

Con el objetivo de garantizar el reconocimiento completo de las proteínas (APOE y MT2A) en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 α) empleando las inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, se optimizó la concentración de los anticuerpos primarios para llevar a cabo el protocolo de ICC. Para llevar a cabo este estudio se ensayó el protocolo de ICC con detección indirecta fluorescente utilizando un anticuerpo secundario marcado con Alexa[®]488 (APOE) o Alexa[®]594 (MT2A). En ambos casos se evaluaron tres diluciones diferentes para cada Ab primario (no conjugado con AuNCs) de manera independiente. El protocolo llevado a cabo se encuentra detallado en la **Sección F.3.3.7**. Las concentraciones ensayadas para cada Ab primario fueron seleccionadas de acuerdo con el rango recomendado en las especificaciones de cada Ab.

La concentración de la disolución de partida del Ab específico de la APOE (IgG de cabra Anti-h-APOE) es de 1 mg·mL⁻¹ y las diluciones ensayadas fueron: 1:50, 1:100, y 1:200 (i.e., 20, 10, y 5 μ g·mL⁻¹ de Ab). En la **Figura 74** (a-d) se muestran las imágenes de fluorescencia (color verde del fluoróforo Alexa[®]488) obtenidas para la distribución de APOE en células HRPEsv40 de una muestra control negativo (sin el Ab primario) empleando las diluciones 1:50, 1:100, y 1:200, respectivamente. Se puede observar que la intensidad se mantuvo constante para las diluciones 1:50 y 1:100. Sin embargo, la intensidad fue significativamente menor con 1:200 (**Figura 74d**), lo que indica que la mayor dilución (1:200) no tiene una concentración de Ab suficiente para detectar completamente el contenido de APOE en las células HRPEsv40. Indicar que tras la incubación del Ab primario, todo aquel Ab no enlazado (i.e., el Ab empleado en exceso) es eliminado de la muestra tras los lavados con PBS1x, por lo que emplear una concentración de Ab mayor de la estrictamente necesaria no supone problemas adicionales. Por lo tanto, se puede afirmar que observar

una mayor intensidad con una dilución 1:100 respecto a 1:200 indica una mejor detección de la proteína diana. Así mismo, al observarse una intensidad comparable al emplear las diluciones 1:50 y 1:100, se puede indicar que con la dilución 1:50 se añade un exceso de Ab primario (el cual es eliminado tras los lavados) y que la dilución 1:100 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) asegura la detección completa de la proteína. Por tanto, $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fue la concentración seleccionada para el ICC directo usando la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs.

De manera análoga, se realizó un estudio similar para la MT2A. La **Figura 74** (e-h) muestra las imágenes de fluorescencia (color rojo debido a Alexa®594) obtenidas para la distribución de MT2A en células HRPEsv40 de una muestra control negativo empleando unas diluciones 1:23, 1:46, y 1:115 del Ab (10 , 5 , y $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Ab, respectivamente). En este caso, se seleccionó una dilución 1:46 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) del Ab primario para realizar la detección total de MT2A en células HRPEsv40. La dilución 1:115 ($2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se descartó debido a la baja intensidad de fluorescencia, y las diluciones 1:23 y 1:46 mostraron señales de fluorescencia similares.

Cabe destacar que las **Figura 74a** y **Figura 74e** son los controles negativos del inmunoensayo para APOE y MT2A, respectivamente. En este caso, dichas imágenes permitieron descartar cualquier detección inespecífica por parte de los anticuerpos secundarios (IgG de burro anti cabra:Alexa®488 -color verde e IgG de cabra anti-conejo:Alexa®594 - color rojo), demostrando que la intensidad mostrada en las imágenes de fluorescencia sólo corresponden a la detección de las proteínas diana APOE y MT2A, respectivamente.

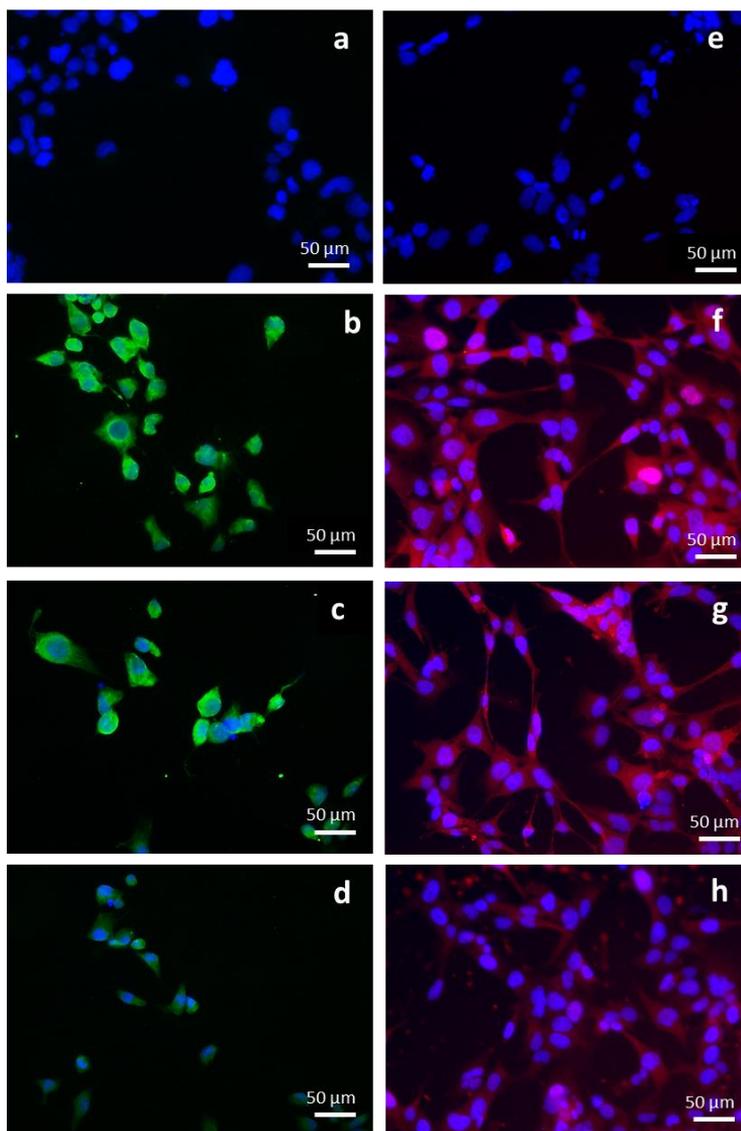


Figura 74: Imágenes de fluorescencia obtenidas para el fluoroinmunoanálisis indirecto en células HRPEsv40 utilizando Fluor Alexa® (el color verde se debe al Fluor Alexa® 488, mientras que el color rojo se debe al Fluor Alexa® 594). Estos estudios se han realizado para la optimización de la concentración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

F.4.3.3. Evaluación de la penetración de la inmunosonda en las células por microscopía confocal

Aprovechando la detección bimodal que ofrecen las inmunosondas con AuNCs, además de emplear el análisis por LA-ICP-MS para estudiar la distribución de las proteínas en las células HRPEsv40 se estudió su localización empleando microscopía confocal (detección por fluorescencia siguiendo la emisión de los AuNCs: $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 650\text{-}750 \text{ nm}$). El principal objetivo de este estudio fue evaluar la penetración de la inmunosonda metálica (Anti-h-APOE:AuNCs) en las células, para asegurar una completa detección de toda la proteína y asegurar así una cuantificación absoluta de la proteína por LA-ICP-MS. Además, estos estudios sirven también para validar las distribuciones de APOE obtenidas mediante el análisis elemental por LA-ICP-MS empleando la misma inmunosonda metálica. Por otro lado, se llevó a cabo también una ICC con detección por fluorescencia indirecta empleando el Ab secundario marcado con Alexa®488 (emisión verde), permitiendo validar los resultados obtenidos para la APOE con la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs.

La **Figura 75** muestra las imágenes de fluorescencia obtenidas para la distribución de APOE siguiendo la emisión de los AuNCs para las células HRPEsv40 CT (a y b) y tras el tratamiento proinflamatorio (c y d) en el plano XY (mapa de distribución). Adicionalmente, la imagen de la derecha recoge el plano XZ (perfil en profundidad) de las células marcadas con una línea discontinua en las imágenes a y c. Se puede observar, como la emisión de la inmunosonda se distribuye a lo largo de todo el citoplasma de la célula, confirmando una completa penetración de la misma en todo su volumen.

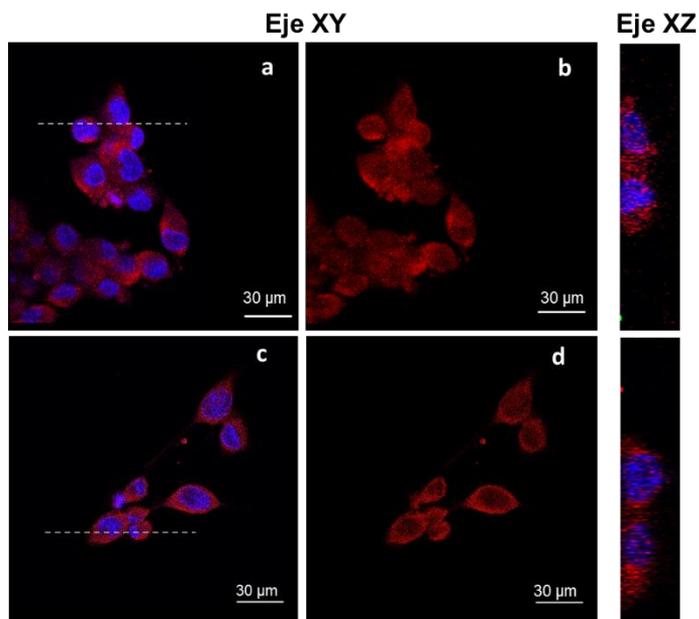


Figura 75: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1 α (c y d). La emisión roja corresponde a la emisión de los AuNCs (distribución de APOE: inmunosonda Anti-b-APOE:AuNCs) y la emisión azul a la tinción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

Paralelamente se llevó a cabo la medida de la fluorescencia indirecta empleando un Ab secundario marcado con Alexa®488 (emisión verde) para el estudio de la distribución de APOE en las células HRPEsv40. Como se puede observar en la **Figura 76**, la APOE se localiza a lo largo del citoplasma de las células con una mayor concentración perinuclear, observando también gracias a las imágenes en el eje XZ, cómo su presencia es apenas detectable en el interior del núcleo. Esta localización está de acuerdo con la observada para la APOE empleando la inmunosonda con los AuNCs **Figura 75** y permitirá validar además las imágenes 2D obtenidas tras el análisis de las células por LA-ICP-MS. Las imágenes en profundidad (eje XY) utilizando el fluoróforo Alexa® confirmaron además la menor presencia de la proteína APOE dentro de los núcleos celulares en comparación con las regiones perinuclear y citoplasmática. Por otro lado, la penetración total de la inmunosonda con AuNCs

(i.e., del Ab Anti-h-APOE) dentro de las células quedó confirmada al poder observarse emisión de fluorescencia dentro de todo el volumen celular.

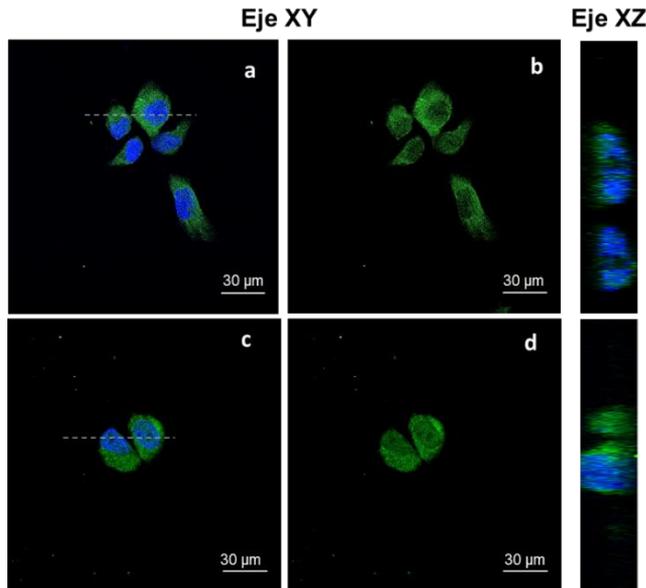


Figura 76: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal para la distribución de APOE en células HRPEsv40 CT (a y b) y tratadas con IL-1a (c y d). Las imágenes a y c corresponden con la superposición del canal DAPI (azul) y del canal verde correspondiente a la emisión del Ab secundario fluor Alexa®488 (distribución de APOE en verde), y las imágenes b y d corresponden con la distribución de APOE (Ab secundario fluor Alexa®488). Las imágenes XZ de la derecha corresponden a los perfiles en profundidad en las células marcadas con las líneas blancas discontinuas en las imágenes a y c. (Alexa®488 (verde): $\lambda_{ex}=488$ y $\lambda_{em}=500-520$ nm y DAPI (azul): $\lambda_{ex}=405$ y $\lambda_{em}=450-470$ nm)

Tal y como se detalló en la sección experimental de este Capítulo III, es muy importante realizar controles negativos en los experimentos de ICC para asegurar que no existen interacciones no específicas del Ab secundario o de los AuNCs. Además, teniendo en cuenta que el objetivo final de este Capítulo es determinar la concentración de proteínas empleando los AuNCs como marcas resulta imprescindible evaluar si los AuNCs se adhieren a las células HRPEsv40 de manera inespecífica. Para ello, se realizó un control negativo, añadiendo los AuNCs libres a las células fijadas durante el protocolo de ICC (en lugar de añadir la inmunosonda marcada). En

la **Figura 77** se muestra la imagen de fluorescencia obtenida para los controles negativos de AuNCs (células CT y tratadas con IL-1 α). Como se puede observar, en ningún caso se detecta emisión fluorescente en el rojo (emisión de los AuNCs), demostrando la ausencia de interacciones no específicas.

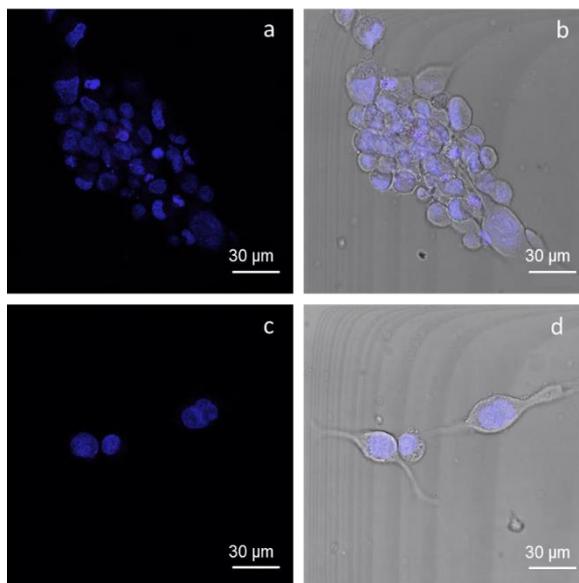


Figura 77: Imágenes de fluorescencia obtenidas por microscopía láser confocal de los controles negativos del inmunoensayo empleando AuNCs como etiqueta de fluorescencia. Para realizar estas medidas se añadieron AuNCs libres (i.e., no conjugados) a las células HRPEsv40. a y b) Células HRPEsv40 CT y, c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

F.4.1. Inmunolocalización de las proteínas citosólicas en células HRPEsv individuales mediante LA-ICP-MS

El uso de los AuNCs como una única etiqueta metálica para el estudio de APOE y MT2A en células HRPEsv40 permitió determinar directamente la distribución cualitativa de las dos proteínas citosólicas mediante microscopía de fluorescencia confocal y LA-ICP-MS, en ambas condiciones de tratamiento (células CT y tratadas con IL-1 α).

Respecto al análisis por LA-ICP-MS de las células HRPEsv40 marcadas con las inmunosondas metálicas (Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs), se obtuvieron imágenes 2D de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (i.e., distribución de APOE o MT2A dependiendo de la inmunosonda de AuNCs empleada). A modo de ejemplo, la **Figura 78** recoge las imágenes 2D obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de APOE en células CT (**Figura 78a**) y tratadas con IL-1 α (**Figura 78c**). Además, las **Figura 78b y c** muestran la distribución de APOE (señal de $^{197}\text{Au}^+$, en cps) solapado con la imagen óptica de las células HRPEsv40 (imagen obtenida previamente a su ablación) para poder identificar mejor la distribución de la proteína a lo largo de la estructura de cada célula. La variabilidad biológica intrínseca y las diferencias esperadas entre células hacen difícil definir un comportamiento común en la población celular, aunque se observaron algunas tendencias: la APOE se localizó en todo el citoplasma, principalmente presente en la región perinuclear (p.ej., las células #2 y #4 mostraron un nivel más alto cerca del núcleo), mostrándose casi ausente dentro del núcleo (p.ej., células #1 y #5). Además, se encontró una distribución similar de APOE independientemente del tratamiento de las células (CT o tratadas con IL-1 α).

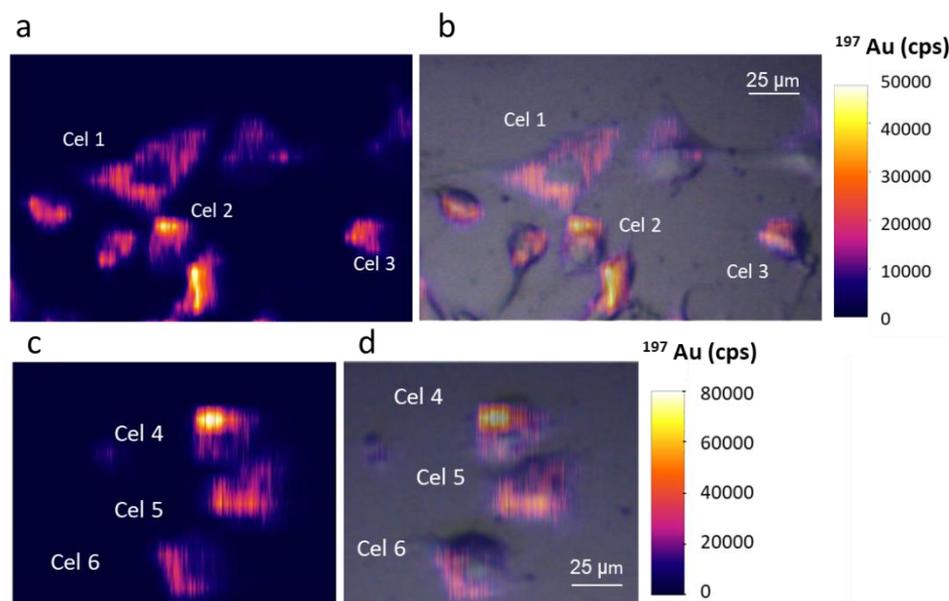


Figura 78: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs. a) Distribución de APOE en células CT, b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de APOE en células tratadas con IL-1 α , b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células tratadas con IL-1 α antes del muestreo por LA.

Además de las imágenes cualitativas, empleando el software Iolite es posible obtener el histograma de intensidad ($^{197}\text{Au}^+$ en cps; APOE) para cada célula HRPEsv40 individual analizada por LA-ICP-MS. Estos histogramas permiten conocer mejor la distribución de la proteína dentro de una célula, aportando información complementaria a las imágenes 2D. Además, debido a la elevada variabilidad entre células y por tanto a la existencia de una gran diferencia en los valores de las intensidades entre células de una misma imagen (i.e., que comparten una misma escala de intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ en cps), a veces surgen problemas para visualizar correctamente la distribución de la proteína en todas las células de una imagen. Para evitar que las células con un mayor nivel de proteína se observen saturadas en las imágenes, se ajusta la escala de colores hasta un máximo en el que se observe una buena distribución de la proteína en la célula sin llegar a la saturación. El problema surge cuando en la misma imagen hay células con un nivel de proteína más bajo; en este caso la

distribución de las proteínas en las células no se puede conocer bien por estar limitada por la escala seleccionada. De este modo, realizando los histogramas individuales para cada célula dentro de una misma imagen 2D, es posible ver las regiones en la que hay un mayor o menor nivel de proteína. La **Figura 79** muestra el histograma obtenido para dos células HRPEsv40 CT y dos tratadas con IL-1 α (las imágenes 2D de estas células están en la **Figura 78**), representando el número de píxeles para cada intensidad de $^{197}\text{Au}^+$. Como puede observarse, un gran porcentaje del área de las células analizadas por LA-ICP-MS (i.e., un elevado número de píxeles) presentó señales con una baja intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, lo que indica bajos niveles de proteína. Además, se observó una alta variabilidad para la intensidad máxima de $^{197}\text{Au}^+$ (20.000 cps y 125.000 cps para las células #1 y #4, respectivamente), lo que puede atribuirse a la variabilidad biológica intrínseca de las células cultivadas, tanto en condiciones CT como sometidas a un tratamiento de inflamación.

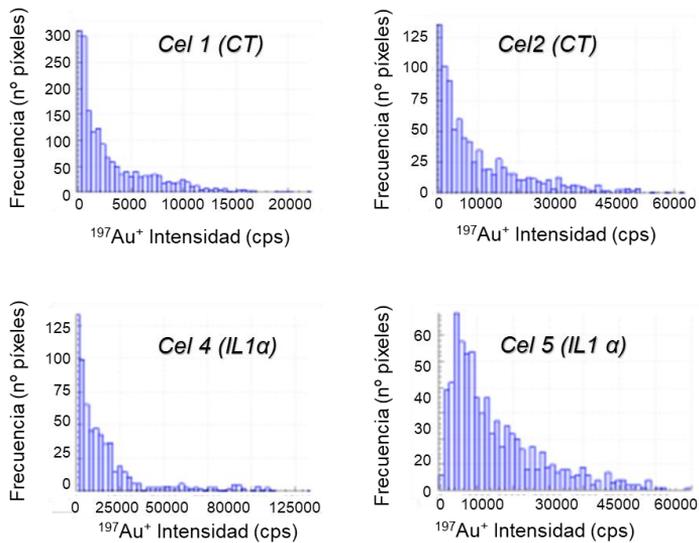


Figura 79: Histogramas (frecuencia de píxeles frente a intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, en cps) obtenidos para el análisis de APOE en células HRPEsv40 CT (células #1 y #2) y tratadas con IL-1 α (células #4 y #5) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs se utilizó en la etapa de ICC para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

Con respecto a la MT2A, se siguió un protocolo similar al empleado con la APOE utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. La **Figura 80** muestra las imágenes 2D obtenidas por LA-ICP-MS para la distribución de MT2A siguiendo la intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ en células HRPEsv CT (**Figura 80a** y **b**) y tratadas con IL-1 α (**Figura 80c** y **d**). A diferencia de la APOE, la MT2A se distribuye homogéneamente en el citoplasma, con una mayor presencia en el núcleo (p.ej., células #2 y #3 en CT y células #5 y #9 en IL-1 α). La variabilidad observada para la acumulación intracelular de MT2A es elevada, pero concuerda con la distribución de la proteína encontrada por microscopía de fluorescencia empleando anticuerpos secundario marcados con Alexa®594 (**Figura 74**). Además, la distribución homogénea observada para la MT2A a lo largo de la célula, así como la ausencia de cambios significativos en la localización de la proteína entre células CT y tratadas con IL-1 α es consistente con estudios previos²¹.

²¹ S. Rodríguez-Menéndez, M. García, B. Fernández, L. Álvarez, A. Fernández-Vega-Cueto, M. Coca-Prados, R. Pereiro, H. González-Iglesias, The Zinc-Metallothionein Redox System Reduces Oxidative Stress in Retinal Pigment Epithelial Cells, *Nutrients*, 10 (2018) 1874.

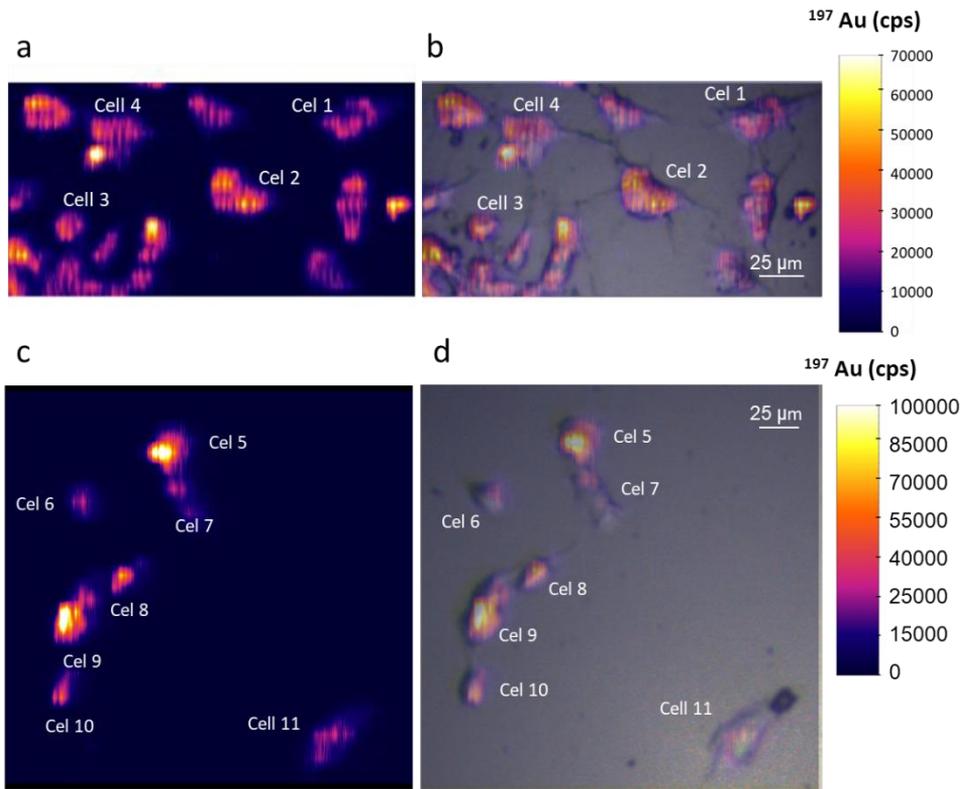


Figura 80: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (cps) en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs. a) Distribución de MT2A en células CT, b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA, c) Distribución de MT2A en células tratadas con IL-1 α , b) Superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células tratadas con IL-1 α antes del muestreo por LA.

Al igual que para la APOE, se estudiaron los histogramas de intensidades en las células individuales CT y tratadas con IL-1 α . En la **Figura 81** se muestran los histogramas para tres células HRPEsv40 CT y tres tratadas con IL-1 α , representando el número de píxeles para cada intensidad de $^{197}\text{Au}^+$. En este caso, la MT2A se localizó de forma más homogénea dentro de toda la célula (comparada con la distribución observada para la APOE): se obtiene un gran número de píxeles con señales de $^{197}\text{Au}^+$ del orden de 10.000-40.000 cps. En el caso de las células tratadas con IL-1 α , un gran porcentaje del área de las células presentó señales bajas de $^{197}\text{Au}^+$ (i.e., niveles bajos de proteína), a la vez que existen regiones específicas de las células en las que las señales de $^{197}\text{Au}^+$ son muy elevadas (p.ej., en la célula #5 la intensidad asciende

hasta un valor de 125.000 cps). Este hecho puede atribuirse a una acumulación de MT2A, probablemente en la región del núcleo tal y como identificó en la **Figura 80**.

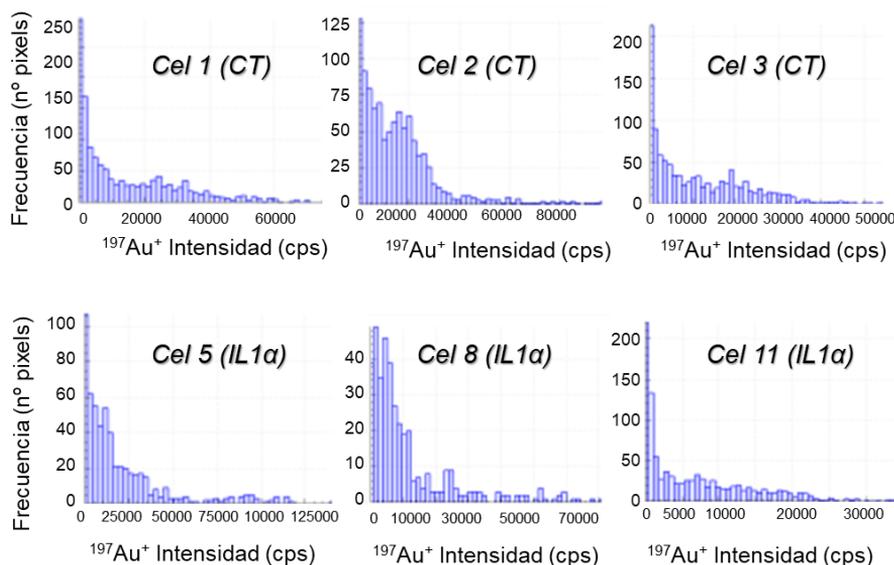


Figura 81: Histogramas (frecuencia de píxeles frente a intensidad de $^{197}\text{Au}^+$, en cps) obtenidos para el análisis de MT2A en células HRPEsv40 CT (células #1, #2, y #3) y tratadas con IL-1 α (células #5, #8, y #11) empleando LA-ICP-MS. La inmunosonda Anti-b-MT2a:AuNCs se utilizó en la etapa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

F.4.2. Desarrollo de una nueva estrategia de cuantificación *matrix-matched* para determinar proteínas en células por LA-ICP-MS

Una vez se ha caracterizado la inmunosonda metálica (466 ± 18 átomos de Au por Ab) empleada para la localización de las proteínas (APOE o MT2A), está optimizada la concentración de Ab primario que asegura el total reconocimiento de la proteína, se ha confirmado la penetración total de las inmunosondas en las células HRPEsv40, así como la ausencia de interacciones no específicas por parte de los AuNCs, es posible plantear una estrategia de calibración que permita no solo conocer la distribución de las proteínas sino también su concentración. Sin embargo, tal y como se discute en la Introducción, para llevar a cabo una cuantificación por LA-ICP-MS en tejidos biológicos se debe disponer de patrones de calibración adecuados

que imiten la matriz de las células. Por ello, se ha desarrollado una metodología de calibración basada en el empleo de patrones *matrix-matched* (i.e., con una matriz idéntica a la de la muestra) para lo cual se han empleado células HRPEsv40 como patrones de calibración. El protocolo para la preparación de los patrones de células que han internalizado AuNCs libres (HRPEsv@AuNCs) está detallado en la **Sección F.3.3.9**. Para una mejor comprensión de las diferentes etapas de síntesis y caracterización de los patrones, así como de la obtención de los *imaging*s cuantitativos para APOE y MT2A en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 α), en la **Figura 69** se resume un diagrama con el flujo de trabajo.

Tal y como se describe en la Sección Experimental, para generar los patrones de calibración unicelulares HRPEsv@AuNCs, las células HRPEsv40 se incubaron con diferentes concentraciones de AuNCs libres (sin bioconjugado) durante 24 h. Posteriormente, para poder relacionar las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidas mediante LA-ICP-MS para los patrones HRPEsv@AuNCs con una concentración de Au, los patrones fueron caracterizados mediante ICP-MS con nebulización convencional. De este modo fue posible determinar la masa media de Au en la población de células para las diferentes concentraciones de AuNCs añadidas durante la incubación (concentraciones de AuNCs entre 0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El protocolo seguido con las células se encuentra detallado en la Sección Experimental de este Capítulo III.

Inicialmente, se estudiaron diferentes concentraciones de AuNCs para la suplementación de las células (hasta 350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Sin embargo, la viabilidad de las células HRPEsv40 disminuyó drásticamente después de la incubación de las mismas a altas concentraciones de AuNCs (24 h de tratamiento). En la **Figura 82** se recogen los conteos de las células tras ser incubadas con las diferentes concentraciones de AuNCs. Se observa una disminución de la viabilidad celular a medida que se incrementa la suplementación. Tras este estudio inicial, se decidió emplear concentraciones de AuNCs para la suplementación por debajo de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

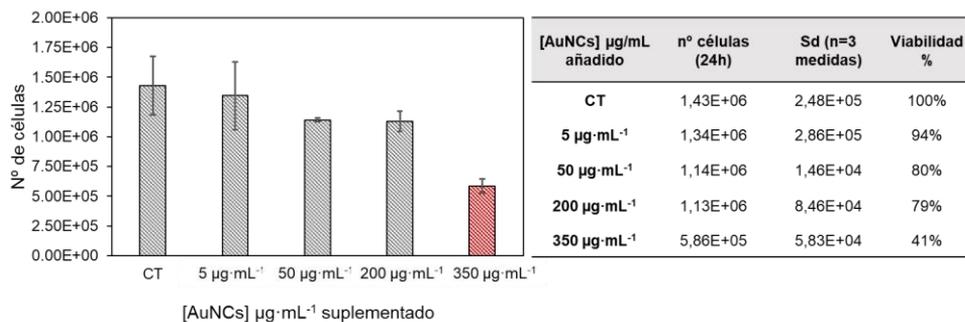


Figura 82: Estudios de viabilidad celular para preparar los patrones HRPEsv40@AuNCs unicelulares. En la gráfica y la figura se muestran los valores obtenidos para el número de células al con concentraciones de AuNCs en el rango entre 0-350 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las desviaciones estándar corresponden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

Tras la incubación de las células HRPEsv40 con los AuNCs, se determinó la concentración de Au en cada grupo de células por ICP-MS con nebulización convencional. Como se muestra en la **Figura 83**, se obtuvo un comportamiento lineal para la concentración media de Au en los estándares HRPEsv cells@AuNCs determinada por ICP-MS (expresada como fg de Au por célula) y la concentración de AuNCs utilizada para la suplementación de las células, en el rango de concentraciones entre 0-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

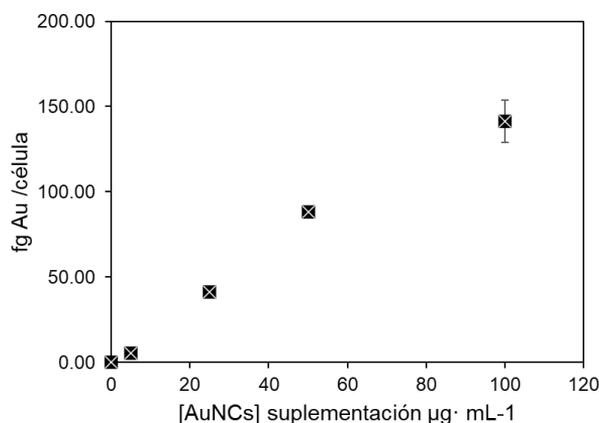


Figura 83: Representación gráfica de la relación observada entre las concentraciones de AuNCs empleadas para la suplementación de las células HRPEsv40 (0-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y los fg de Au por célula para los patrones HRPEsv@AuNCs tras análisis por ICP-MS. Las desviaciones estándar corresponden a 3 réplicas de la suplementadas con la misma concentración.

Por otro lado, los estándares de calibración HRPEsv@AuNCs preparados en cámaras portaobjetos y suplementados con diferentes concentraciones de AuNCs (0, 5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) fueron analizados individualmente por LA-ICP-MS. Se analizaron 30 células por condición empleando las mismas condiciones de análisis que las optimizadas para el *imaging* de las proteínas por LA-ICP-MS (**Tabla 1f**). El *imaging* obtenido para cada célula individual HRPEsv@AuNCs mediante LA-ICP-MS fue tratado con el software Iolite siguiendo el protocolo que se describe a continuación. A modo de ejemplo, a continuación, se detalla el protocolo de tratamiento de datos para 3 células individuales (suplementación con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs) recogidas en la **Figura 84**: *Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv@AuNCs empleando el imaging de 3 células (suplementadas con 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de*

i) Se obtiene la imagen 2D de la distribución de $^{197}\text{Au}^+$ (en cps) para cada célula individual HRPEsv@AuNCs mediante análisis por LA-ICP-MS (**Figura 84a**);

ii) Se utiliza una imagen óptica de cada célula (tomada justo antes del muestreo por LA) para compararla con la imagen obtenida por la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (**Figura 84b**);

iii) Se selecciona específicamente el área de cada célula individual en la imagen cualitativa 2D de $^{197}\text{Au}^+$ (superficie roja en la (**Figura 84c**), siguiendo la superficie de la célula desde la imagen óptica. De este modo es posible obtener un valor del área de cada célula expresado en píxeles. En el ejemplo de la **Figura 84**, las células #1, #2, y #3 están constituidas por 717, 815, y 889 píxeles, respectivamente. Es importante hacer notar que el área de la célula no puede seleccionarse directamente a partir de la imagen de intensidad ($^{197}\text{Au}^+$) ya que no hay una distribución homogénea de los AuNCs en toda la superficie de la célula;

iv) La intensidad total de $^{197}\text{Au}^+$ para cada célula se calcula como la suma de las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ para todos los píxeles que componen una célula ($1,10\cdot 10^6$ cps, $9,78\cdot 10^5$ cps, y $8,77\cdot 10^5$ cps para las células #1, #2, y #3, respectivamente);

v) La intensidad total de $^{197}\text{Au}^+$ por célula se normaliza con el tamaño de la célula (i.e., el número de píxeles que la constituye). En el ejemplo recogido en la **Figura 84**, se encontraron $1,53 \cdot 10^3$ cps, $1,14 \cdot 10^3$ cps, y $9,86 \cdot 10^2$ cps como intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ por píxel para las células #1, #2, y #3, respectivamente.

Todos los estándares de HRPEsv@AuNCs (diferentes concentraciones de AuNCs para la suplementación) fueron analizados por LA-ICP-MS y procesados siguiendo la estrategia propuesta. La **Figura 85** recoge las imágenes 2D obtenidas para dos estándares de laboratorio de células individuales utilizando una concentración de $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AuNCs.

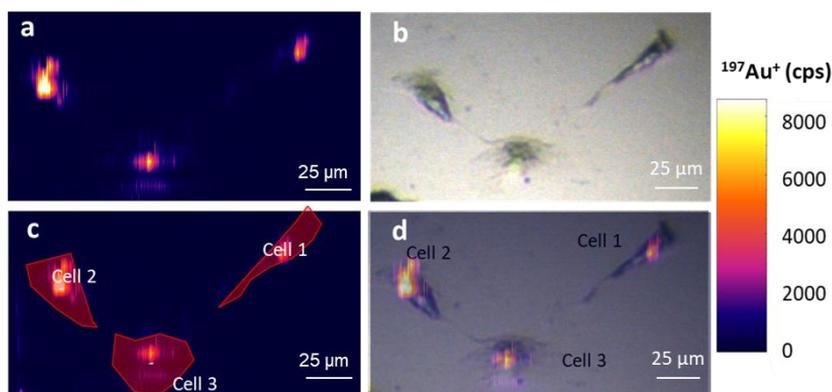


Figura 84: Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv@AuNCs empleando el imaging de 3 células (suplementadas con $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AuNCs) analizadas por LA-ICP-MS.

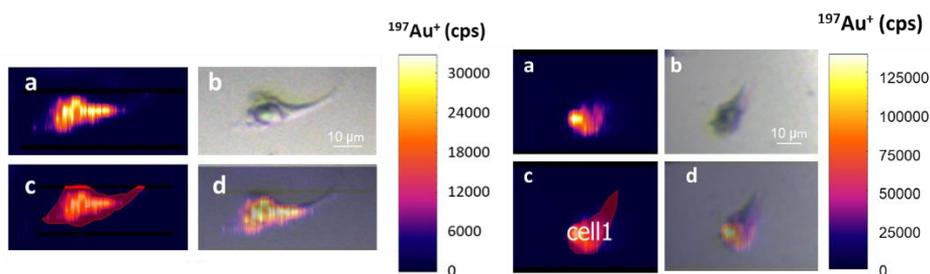


Figura 85: Ejemplo de cómo se realiza el tratamiento de datos empleando el software Iolite para la cuantificación de Au en los patrones HRPEsv@AuNCs empleando el imaging de 2 células analizadas por LA-ICP-MS. Imágenes de la izquierda a-d) Suplementación de las células con $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$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

En la **Figura 86** se muestra un gráfico de cajas donde se recogen las intensidades medias de $^{197}\text{Au}^+$ por célula tras el tratamiento de los datos de los patrones HRPEsv@AuNCs analizados por LA-ICP-MS para los diferentes tratamientos de suplementación con AuNCs (0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs). Se observó como la captación de AuNCs por las células aumentó de forma dependiente de la dosis suplementada hasta la saturación celular. En este caso se observa como existe una señal con una tendencia constante para la concentración de Au en los patrones para concentraciones a partir 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AuNCs. Indicar que los valores de la desviación estándar relativa para los análisis por LA-ICP-MS son mayores que para las medidas con células en disolución, oscilando entre el 9% y el 22% (análisis de 30 células individuales por condición).

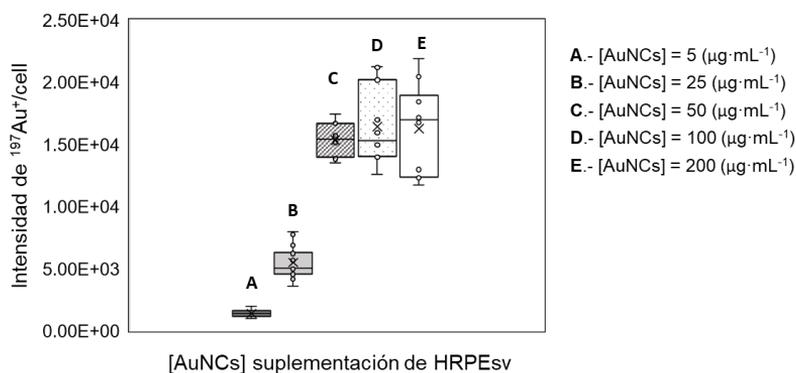


Figura 86: Gráfico de cajas que representa el promedio de las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ por célula (determinada por LA-ICP-MS) para los diferentes patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs obtenidos tras la suplementación de las HRPEsv con diferentes concentraciones de AuNCs (0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).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

Finalmente, tras el análisis de los estándares de laboratorio unicelulares por ICP-MS con nebulización convencional y LA-ICP-MS, y su correspondiente tratamiento de datos, se construyó un gráfico de calibración que representa la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ por píxel para cada célula (determinada por LA-ICP-MS) frente a la concentración de Au de los estándares unicelulares HRPEsv@AuNCs (determinada por ICP-MS con nebulización convencional). La **Figura 87** muestra el gráfico de calibración de Au obtenido, el cual es utilizado en una etapa posterior para transformar

las imágenes cualitativas con la distribución de APOE y MT2A (obtenidas por LA-ICP-MS) en imágenes cuantitativas con la masa de proteína por célula. Indicar que, como era de esperar, tanto la variabilidad biológica asociada al propio cultivo de células HRPEsv como las posibles diferencias en la internalización de los AuNCs contribuyeron a la incertidumbre de las medidas.

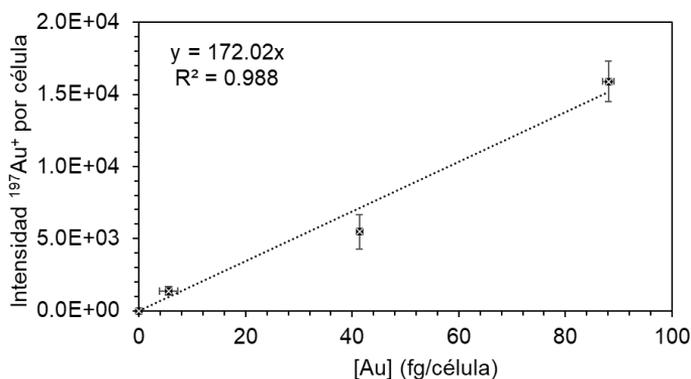


Figura 87: Gráfica de calibración obtenida empleando los patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs que es empleada para la determinación de la concentración de proteínas en las células HRPEsv40 tras su análisis por LA-ICP-MS (se utilizan las inmunosonda con AuNCs como etiqueta específica de cada proteína).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

F.4.3. Cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv40 mediante LA-ICP-MS utilizando patrones unicelulares HRPEsv@AuNCs

La estrategia de análisis propuesta se aplicó a la determinación del contenido de APOE y MT2A (de manera secuencial, en diferentes cultivos) en células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α mediante LA-ICP-MS. Utilizando la recta de regresión obtenida con los estándares HRPEsv@AuNCs (**Figura 87**) y calculando la intensidad total de ¹⁹⁷Au⁺ por célula en las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α (al igual que se ha descrito para los estándares de laboratorio unicelulares), se

determinó la masa total de Au por célula (expresada como fg de Au por célula). A continuación, la masa total de Au por célula se puede transformar en la masa de la proteína por célula (APOE o MT2A dependiendo de la inmunosonda utilizada: Anti-h-APOE: AuNCs o Anti-h-MT2A: AuNCs, respectivamente) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II para la cuantificación de proteínas en secciones de tejidos (es necesario tener en cuenta el factor de amplificación de cada inmunosonda).

La masa de APOE obtenida por LA-ICP-MS para cada célula HRPEsv40 individual (CT & IL-1 α) se recoge en la **Tabla 15**. La Tabla resume los valores individuales obtenidos para 22 células CT y 11 células tratadas con IL-1 α analizadas con la metodología propuesta. Se puede observar que la masa media de APOE para cada condición indicó una disminución en los niveles de proteína de $27,2 \pm 7,9$ fg de APOE/célula para las células CT a $16,0 \pm 5,8$ fg de APOE/célula para las células tratadas con IL-1 α (cambio de 0,58 veces). Esta disminución en los niveles de proteína de las células HRPEsv40 sometidas al tratamiento proinflamatorio con IL-1 α coincide con los ensayos previos llevados a cabo. Por una parte, los resultados de qPCR mostraban que el nivel de expresión de ARN (gen codificante de la síntesis de APOE) disminuía entorno al 40% su expresión tras el tratamiento con IL-1 α (**Figura 72**). Además, la masa de APOE determinada por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda con AuNCs fue validada mediante los resultados obtenidos para las fracciones citosólicas de las células HRPEsv40 con el Kit ELISA (**Figura 73**). La masa de APOE determinada por el ELISA es de $17,94 \pm 1,30$ fg APOE/célula para las células CT y de $10,19 \pm 0,53$ fg APOE/célula para las células tratadas con IL-1 α (cambio de 0,56 veces). Por lo tanto, se puede confirmar que los valores obtenidos experimentalmente por ELISA para la APOE concuerdan con el contenido proteico determinado por LA-ICP-MS: en ambos casos se confirma una menor expresión de APOE tras someter el cultivo celular a un tratamiento de estrés proinflamatorio.

Cabe destacar que utilizando la metodología propuesta por LA-ICP-MS no sólo se puede estudiar la masa total de proteína por célula, sino también la distribución cuantitativa de la proteína, es decir, se pueden obtener el *imaging* cuantitativo de

CAPÍTULO III

la proteína por célula. A modo de ejemplo, la distribución de APOE expresada como fg de proteína por píxel se muestra en la **Figura 88** para la célula #4.

Tabla 15: Resultados obtenidos para la masa de APOE en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 α) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-b-APOE:AmNCs.

	Célula	Int. Total $^{197}\text{Au}^+$ (cps)	Célula tamaño (píxels)	$^{197}\text{Au}^+$ Int./píxel	Masa Au (fg/cel)	Masa APOE (fg/cel)	Promedio Masa APOE (fg/cel)
APOE - CT	1	8.19E+06	594	1.38E+04	80.20	29.7	27.2 \pm 7.9
	2	6.56E+06	770	8.52E+03	49.53	18.3	
	3	7.22E+06	543	1.33E+04	77.34	28.6	
	4	1.07E+07	1031	1.04E+04	60.53	22.4	
	5	7.45E+06	587	1.27E+04	73.79	27.3	
	6	1.22E+07	803	1.52E+04	88.51	32.8	
	7	5.64E+06	512	1.10E+04	63.99	23.7	
	8	1.17E+07	606	1.93E+04	112.39	41.6	
	9	7.82E+06	494	1.58E+04	92.04	34.1	
	10	1.04E+07	666	1.56E+04	90.69	33.6	
	11	8.09E+06	640	1.26E+04	73.47	27.2	
	12	1.08E+07	1149	9.38E+03	54.54	20.2	
	13	3.83E+06	424	9.04E+03	52.57	19.5	
	14	3.53E+06	415	8.50E+03	49.42	18.3	
	15	1.34E+07	1732	7.71E+03	44.82	16.6	
	16	6.84E+06	817	8.37E+03	48.66	18.0	
	17	9.05E+06	882	1.03E+04	59.67	22.1	
	18	1.42E+07	1108	1.28E+04	74.32	27.5	
	19	5.52E+06	456	1.21E+04	70.42	26.1	
	20	1.00E+07	542	1.85E+04	107.26	39.7	
	21	2.31E+07	1132	2.04E+04	118.42	43.8	
	22	1.72E+07	1294	1.33E+04	77.12	28.5	
APOE - IL1 α	1	5.30E+06	634	8.36E+03	48.63	18.0	16.0 \pm 5.8
	2	5.30E+06	634	8.36E+03	48.63	18.0	
	3	6.07E+06	655	9.27E+03	53.87	19.9	
	4	4.06E+06	726	5.59E+03	32.51	12.0	
	5	7.24E+06	658	1.10E+04	63.96	23.7	
	6	5.09E+06	1104	4.61E+03	26.80	9.9	
	7	6.90E+06	639	1.08E+04	62.77	23.2	
	8	4.83E+06	1460	3.31E+03	19.24	7.1	
	9	5.35E+06	789	6.79E+03	39.45	14.6	
	10	3.53E+06	840	4.21E+03	24.45	9.0	
	11	5.51E+06	568	9.70E+03	56.40	20.9	

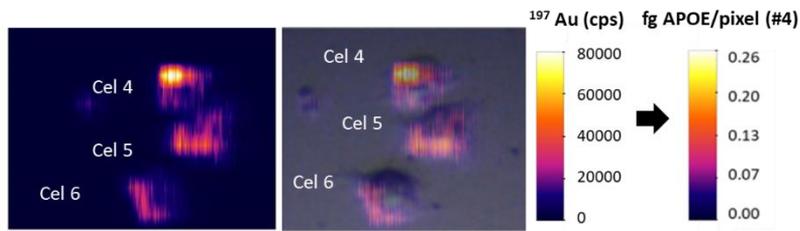


Figura 88: Imágenes 2D obtenidas para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ en las células HRPEsv40 por LA-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. La escala de color en unidades de cps y fg APOE/pixel para la célula #4 ejemplifica cómo se puede hacer la cuantificación de las imágenes cualitativas obtenidas por LA-ICP-MS empleando la metodología propuesta. En la imagen de la izquierda se muestra la distribución de APOE en células CT y en la de la derecha la superposición de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ con la imagen óptica de las células CT antes del muestreo por LA.

De la misma manera que en el caso de la APOE, en la **Tabla 16** se recogen los resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 α) mediante la metodología desarrollada por LA-ICP-MS. Se midieron 23 células CT y 14 células tratadas con IL-1 α . Como puede observarse en los resultados promedio, el tratamiento de las células HRPEsv40 con 100 ng·mL $^{-1}$ de IL-1 α durante 48 h produjo un incremento en la síntesis de MT2A por parte de las células: $2,1 \pm 0,9$ fg/célula de MT2A en CT frente a $4,6 \pm 1,6$ fg/célula de MT2A en las células sometidas al estrés inflamatorio (incremento de un factor de 2,1). El análisis de qPCR confirmó este aumento a nivel de expresión génica de MT2A (**Figura 72**) y la masa de proteína obtenida mediante el kit ELISA cuantitativo también coincide con los resultados experimentales obtenidos por LA-ICP-MS. Tal y como se detalla en la **Figura 73**, la masa de MT2A determinada por el ensayo ELISA cuantitativo fue de $1,74 \pm 0,28$ fg MT2A/célula para células CT y $3,36 \pm 0,50$ fg MT2A/célula para las células HRPEsv40 tratadas con IL-1 α (incremento de 1,9 veces), lo que confirma la sobreexpresión de MT2A bajo condiciones inflamatorias.

CAPÍTULO III

Tabla 16: Resultados obtenidos para la masa de MT2A en las células HRPE_{sv40} (CT & tratadas con IL-1 α) tras su análisis por LA-ICP-MS empleando la inmunosonda Anti-b-MT2A: AuNCs.

	Célula	Int. Total $^{197}\text{Au}^+$ (cps)	Célula tamaño (pixels)	$^{197}\text{Au}^+$ Int./pixel	Masa Au (fg/cel)	Masa MT2A (fg/cel)	Promedio Masa MT2A (fg/cel)
MT2A CT	1	4.21E+06	1241	3.39E+03	19.70	1.3	2.1±0.9
	2	3.72E+06	835	4.45E+03	25.88	1.7	
	3	2.64E+06	600	4.39E+03	25.54	1.7	
	4	3.09E+06	635	4.87E+03	28.29	1.9	
	5	1.84E+06	334	5.50E+03	32.00	2.1	
	6	1.58E+06	418	3.79E+03	22.03	1.4	
	7	1.29E+06	516	2.49E+03	14.48	1.0	
	8	2.51E+06	567	4.42E+03	25.68	1.7	
	9	1.53E+06	538	2.85E+03	16.54	1.1	
	10	3.87E+06	943	4.11E+03	23.87	1.6	
	11	2.94E+06	994	2.96E+03	17.21	1.1	
	12	2.67E+06	847	3.16E+03	18.35	1.2	
	13	1.91E+06	537	3.57E+03	20.73	1.4	
	14	2.53E+06	598	4.23E+03	24.57	1.6	
	15	3.80E+06	935	4.06E+03	23.61	1.6	
	16	8.55E+06	1193	7.17E+03	41.66	2.7	
	17	1.15E+7	1350	8.55E+03	49.72	3.3	
	18	1.05e+07	1100	9.57E+03	55.65	3.7	
	19	1.08E+07	1230	8.82E+03	51.25	3.4	
	20	7.10E+06	841	8.44E+03	49.06	3.2	
	21	7.60E+06	980	7.76E+03	45.11	3.0	
	22	4.11E+06	435	9.46E+03	54.98	3.6	
	23	2.56E+06	398	6.44E+03	37.46	2.5	
MT2A IL1 α	1	9.59E+06	620	1.55E+04	89.88	5.9	4.6 ±1.6
	2	8.01E+06	792	1.01E+04	58.81	3.9	
	3	3.85E+06	339	1.13E+04	65.97	4.3	
	4	9.58E+06	636	1.51E+04	87.56	5.8	
	5	2.63E+06	367	7.18E+03	41.72	2.7	
	6	6.34E+06	984	6.45E+03	37.51	2.5	
	7	1.14E+07	575	1.98E+04	115.33	7.6	
	8	4.40E+6	396	1.12E+04	65.36	4.3	
	9	1.38E+7	706	1.95E+04	113.58	7.5	
	10	3.19E+6	307	1.04E+04	60.40	4.0	

	11	7.85E+6	587	1.34E+04	77.69	5.1	
	12	5.66E+6	471	1.20E+04	69.87	4.6	
	13	7.77E+6	789	9.85E+03	57.25	3.8	
	14	5.16E+6	760	6.79E+03	39.46	2.6	

A la vista de los resultados obtenidos para la cuantificación de las proteínas APOE y MT2A en células individuales HRPEsv (CT y sometidas al tratamiento con IL-1 α) se puede afirmar que la estrategia desarrollada de cuantificación empleando los HRPEsv@AuNCs como patrones unicelulares para la calibración por *matrix-matched* logra llevar a cabo una buena cuantificación por LA-ICP-MS y se presenta como una alternativa a las estrategias de cuantificación comentadas en la introducción del Capítulo III.

F.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados presentados en el Capítulo III son las siguientes:

En cuanto a la síntesis de las inmunosondas metálicas:

- ✓ Se han evaluaron diferentes aproximaciones de la síntesis de AuNCs y finalmente se optó por un tratamiento de enfoque de tamaños (envejecimiento) que permitió obtener AuNCs más homogéneos, fluorescentes y de mayor calidad: $1,90 \pm 0,04$ nm.
- ✓ Se sintetizaron y caracterizaron las dos inmunosondas específicas de las proteínas estudiadas (APOE y MT2A), Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, las cuales presentaron un factor de amplificación: 466 ± 18 átomos de Au.

En cuanto a la elección del tratamiento inflamatorio de las HRPEsv:

- ✓ Se estudiaron diferentes tratamientos inflamatorios (TGF β , dexametasona e IL-1 α) en los cultivos celulares de HRPEsv mediante qPCR para evaluar cambios en la expresión genética de APOE y MT2A y se eligió la citoquina proinflamatoria Interleuquina-1 α (IL-1 α) durante 48 h como el tratamiento que afecta de manera antagonista a APOE y MT2A, generando sobreexpresión y subexpresión de estas, respectivamente.
- ✓ Las concentraciones de APOE y MT2A en las condiciones de tratamiento inflamatorio se determinaron con enzimoimmunoensayos ELISA (Kits comerciales), y sirvieron como validación de la metodología LA-ICP-MS desarrollada.

En cuando a la obtención de distribuciones 2D de las proteínas APOE y MT2A en las HRPEsv:

- ✓ La estrategia de detección que emplea la inmunosonda metálica junto con LA-ICP-MS permitió obtener bioimaging de distribución

cualitativa de las proteínas APOE y MT2A (de manera secuencial e independiente) en células HRPEsv control y tratadas con IL1 α . Además, la detección bimodal de los AuNCs, permitió obtener la distribución de la proteína APOE por inmunofluorescencia para: comprobar las distribuciones elementales obtenidas, confirmar la completa penetración del Ab en todo el volumen celular siguiendo la fluorescencia de la inmunosonda en el eje XZ y, evaluar las interacciones inespecíficas de los AuNCs con las células.

- ✓ Las distribuciones de proteínas obtenidas por LA-ICP-MS así como la elección de la concentración del Ab primario, y la penetración del Ab fueron experimentos validados al ensayar paralelamente una ICC indirecta empleando Ab 2^o marcado con Alexa[®]488 (para detección de APOE) y Alexa[®] 594 (para detección de MT2A).

En cuanto a la cuantificación de APOE y MT2A en células HRPEsv mediante una nueva estrategia de calibración por LA-ICP-MS:

- ✓ Se desarrolló con éxito y por primera vez una estrategia de calibración ajustada a la matriz con el objetivo de superar las limitaciones actuales relativas a la cuantificación de LA-ICP-MS en cultivos celulares.
- ✓ Se generaron patrones de calibración unicelulares HRPEsv@AuNCs que imitan completamente la compleja matriz celular. Para ello, las células HRPEsv fueron suplementadas con concentraciones crecientes de suspensiones que contenían AuNCs libres.
- ✓ Se llevó a cabo una caracterización completa de los estándares de células HRPEsv@AuNCs mediante ICP-MS de nebulización convencional y LA-ICP-MS, y se desarrolló una estrategia de tratamiento de datos para cada célula individual analizada por LA-ICP-MS. Esta estrategia permitió la obtención de imágenes cuantitativas de la expresión de proteínas de célula a célula, lo cual es realmente interesante debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares.

- ✓ Como prueba de concepto, se llevó a cabo la determinación secuencial de MT2A y APOE en células individuales HRPEsv mediante LA-ICP-MS en células sometidas a inflamación con la citoquina Interleukina-1 α y controles.
- ✓ Los resultados medios de las cantidades de MT2A y APOE obtenidos con la metodología propuesta concuerdan con los resultados cuantitativos obtenidos por los kits comerciales de ELISA, indicando que los niveles de APOE disminuyeron tras el tratamiento proinflamatorio mientras que MT2A mostró una sobreexpresión de la proteína tras el tratamiento. Cabe destacar que utilizando la metodología propuesta por LA-ICP-MS no sólo se puede determinar la masa total de la proteína por célula (que será posible conseguir por sc-ICP-MS) sino también la distribución cuantitativa de la proteína objetivo.

G. CAPÍTULO IV

Determinación de proteínas citosólicas en células individuales empleando inmunosondas específicas marcadas con AuNCs y detección por *single cell*-CP-MS

G.1. INTRODUCCIÓN

En el Capítulo IV de la Tesis Doctoral se emplea la técnica de *single cell*-ICP-MS (sc-ICP-MS) para la cuantificación secuencial de dos proteínas relevantes en el estudio del desarrollo y progresión de la DMAE (MT2A y APOE) en una línea celular inmortalizada del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40). Como se ha detallado en el Capítulo III, la importancia del estudio y comprensión de estas dos proteínas radica en su implicación en procesos biológicos de protección frente al estrés oxidativo el cual desarrolla ciclos severos de inflamación crónica en la zona ocular que provocan daño celular siendo uno de los factores de riesgo más comunes en el desarrollo de la DMAE^{1,2}.

Al igual que ocurre con los análisis de cultivos celulares empleando LA-ICP-MS, la técnica sc-ICP-MS proporciona información unicelular muy valiosa superando las limitaciones de las técnicas convencionales de cuantificación de proteínas en digeridos o lisados celulares que no tienen en cuenta la heterogeneidad de las muestras biológicas. Aunque la obtención de imágenes de distribución proteica en células individuales da información acerca de la localización y acumulación de las proteínas en las células, este tipo de estudios implican tiempos largos de análisis para evaluar una población representativa de células. En este sentido, la técnica sc-ICP-MS permite el análisis de cientos de células individuales en apenas unos minutos, por lo que es posible extraer información de una población mayor. Por ello, y de manera complementaria a los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo III por LA-ICP-MS, se ha desarrollado una metodología para la determinación de MT2A y APOE por sc-ICP-MS en células HRPEsv40. Este tipo de estudios puede arrojar información muy valiosa sobre procesos biológicos en las células, a la vez que validar los resultados obtenidos mediante otras metodologías.

¹ X.B. Ling, H.W. Wei, J. Wang, Y.Q. Kong, Y.Y. Wu, J.L. Guo, T.F. Li, J.K. Li, Mammalian Metallothionein-2A and Oxidative Stress, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 1483.

² M.L. Hu, J. Quinn, K. Xue. Interactions between Apolipoprotein E metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration. *Life (Basel)* 11 (2021) 635.

Los valores cuantitativos promedio obtenidos por metodologías convencionales de análisis de proteínas en cultivos celulares (p.ej., ELISA) no ofrecen en algunos casos la información adecuada. Es bien sabido que la heterogeneidad celular genera variabilidad no solo en la composición elemental y molecular de cada célula individual, sino que el comportamiento frente a un estímulo (sea este interno o externo) del conjunto de la población celular no sea representativo del comportamiento célula a célula³. Por ello la técnica sc-ICP-MS es una herramienta de análisis elemental que permite llevar a cabo la determinación de la composición elemental célula a célula en muestras con un gran número de células en tan sólo unos pocos segundos⁴. Además, permite conocer la composición elemental de metales naturalmente presentes dentro de las células⁵, así como aquellos metales internalizados de forma artificial: componentes metálicos y metaloides o metalofármacos⁶, o internalización de NPs compuestas por metales⁷ en sistemas unicelulares de distinto origen (p.ej., líneas celulares humanas o de otros mamíferos, bacterias, levaduras, o algas unicelulares).

Como se ha descrito en la Introducción General, la técnica sc-ICP-MS se ha aplicado recientemente a la cuantificación de proteínas en diferentes tipos de aplicaciones, todos ellos basándose en el empleo de estrategias de etiquetado metálico de anticuerpos específicos para generar inmunosondas metálicas detectables por sc-ICP-MS. Sin embargo, la cuantificación de proteínas celulares endógenas sigue siendo un reto debido en gran parte a la necesidad de realizar un inmunoensayo en

³ P.E. Oomen, M.A. Aref, I. Kaya, N.T.N. Phan, A.G. Ewing, Chemical analysis of single cells, *Anal. Chem.* 91 (2019), 588-621

⁴ S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 35, 1784–1813.

⁵ K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 637–645.

⁶ E. Mavrakis, L. Mavrouidakis, N. Lydakakis-Simantiris, S.A. Pergantis, Investigating the uptake of arsenate by *Chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and easy ambient sonic-spray ionization-MS. *Anal. Chem.* 91 (2019) 9590–9598.

⁷ Z. Chen, B. Chen, M. He, B. Hu, Droplet-splitting microchip online coupled with time-resolved ICPMS for analysis of released Fe and Pt in single cells treated with FePt nanoparticles, *Anal. Chem.* 92 (2020) 12208–12215.

células suspendidas, que compromete la integridad de las células. Las etapas de permeabilización, lavados o incubaciones largas pueden afectar de manera significativa a la membrana celular, provocando su debilitación y por ello su fácil ruptura durante su introducción en plasma ICP. Por ello, algunos trabajos resaltan la utilidad de la monitorización de un elemento intrínseco de las células como estrategia de chequeo para evaluar el estado de las células tras las diferentes etapas de preparación de la muestra, así como para confirmar el número de eventos celulares detectados al monitorizar el elemento de la marca¹¹. Cabe resaltar el uso de intercaladores de ADN, normalmente complejos con Ir y Rh, los cuales se emplean a su vez como patrón interno de las medidas por sc-ICP-MS. Sin embargo, en este tipo de aplicaciones implica una etapa adicional en la preparación de las muestras, aumentando así el riesgo de perder la integridad celular.

En cuanto a las etiquetas metálicas empleadas para la detección de biomoléculas en células mediante análisis por sc-ICP-MS tras la realización de un inmunoensayo en suspensión, las más empleadas son las estructuras quelantes de Ln (p.ej., MAXPAR®⁸ o DOTA⁹). Sin embargo, con el objetivo de obtener una mayor amplificación de la señal, especialmente para la cuantificación de proteínas de baja abundancia, ha surgido el uso de nanoestructuras que proporcionan un mayor número de etiquetas elementales por inmunosonda. Por ejemplo, se ha demostrado que las NPs similares a los virus proporcionan una amplificación significativa de la señal. Como alternativa, los NCs se presentan como etiquetas metálicas ideales en la detección por ICP-MS debido a su pequeño tamaño de núcleo metálico (por debajo de 3 nm), junto con el alto factor de amplificación que proporcionan (los NCs están compuestos por cientos de átomos metálicos)¹⁰. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que para

⁸ M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15532–15538.

⁹ Y. Liang, Q. Liu, Y. Zhou, S. Chen, L. Yang, M. Zhu, Q. Wang, Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8341–8349.

¹⁰ Y. Zhang, C. Zhang, C. Xu, X. Wang, C. Liu, G.I.N. Waterhouse, Y. Wang, H. Yin, Ultrasmall Au nanoclusters for biomedical and biosensing applications: A mini-review, *Talanta* 200 (2019) 432–442.

llevar a cabo un análisis cuantitativo de proteínas, el factor de amplificación de la inmunosonda metálica empleada, es decir, el número de átomos de metal por inmunosonda, debe ser perfectamente conocido¹¹.

En el Capítulo IV se investiga por primera vez una estrategia de biomarcador único utilizando AuNCs como etiquetas elementales de anticuerpos específicos para la determinación secuencial de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 por sc-ICP-MS. Además, para simular los ciclos de estrés e inflamación, las células son tratadas con una citoquina proinflamatoria (Interleuquina 1 α ; IL-1 α). Así, se puede estudiar cómo estos tratamientos proinflamatorios pueden incrementar o disminuir la síntesis de APOE o MT en los tejidos. La metodología propuesta se basa en un inmunoensayo realizado en una suspensión celular mediante el uso de AuNCs bioconjugados con anticuerpos específicos de proteínas para su determinación secuencial en células HRPEsv40 bajo condiciones CT y pro-inflamatorias (IL-1 α).

¹¹ M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, Trends Anal. Chem. 132 (2020) 116042.

G.2. OBJETIVOS

El objetivo general del Capítulo IV es el desarrollo de una estrategia de cuantificación de proteínas citosólicas en células individuales mediante la técnica sc-ICP-MS empleando inmunosondas:AuNCs caracterizadas. Como línea celular y proteínas en estudio se seleccionaron la MT2A y APOE en células del epitelio pigmentario de la retina (línea celular HRPEsv) estudiadas en el Capítulo III.

Para llevar a cabo este objetivo general, se proponen las siguientes etapas experimentales:

- ✓ Estudio de la integridad celular en las etapas de cultivo, tratamiento y procesamiento de las células HRPEsv previo a su introducción al sistema de medida *single-cell*-ICP-MS.
 - Optimización del protocolo de fijación de las células
 - Optimización de las etapas de incubación del inmunoensayo para llevar a cabo para la detección secuencial de las dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en suspensión empleando las inmunosondas previamente caracterizadas en el Capítulo III Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs. Optimización del sistema de introducción de células en el ICP-MS.
- ✓ Búsqueda de un elemento intrínseco de las células HRPEsv para su monitorización y chequeo de número de eventos detectados con la marca metálica (inmunosonda:AuNCs) y evaluación de la integridad celular tras el inmunoensayo
- ✓ Estudio de los resultados obtenidos al monitorizar el elemento intrínseco (Fe) y la marca metálica (Au) y discusión del tratamiento de datos al emplear criterios de discriminación de diferentes $3\sigma + X$ y $5\sigma + X$ para Fe y Au.
- ✓ Evaluación de la estrategia de introducción de las células de las medidas realizadas por sc-ICP-MS:

- Ensayos de concentración celular y configuración del sistema (flujo de introducción)
- ✓ Cuantificación de MT2A y APOE en células HRPEsv tras realizar el inmunoensayo en suspensión empleando las inmunosondas metálicas: Anti-h-MT2A:AuNCs y Anti-h-APOE:AuNCs en células control y células sometidas a un tratamiento con citoquina inflamatoria (IL-1^a) durante 48h.
- ✓ Comparación de los resultados obtenidos con las cuantificaciones previas por LA-ICP-MS y ELISA (Capítulo III).

G.3. EXPERIMENTAL

Las etapas experimentales de preparación de la línea celular HRPEsv40 así como los reactivos empleados son los mismos o similares a los utilizados en el Capítulo III, por lo que se hará referencia a ellos en algunas Secciones.

G.3.1. Materiales y reactivos

G.3.1.1. Síntesis de las inmunosondas metálicas: Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs

Por una parte, los MNCs empleados como marcas son los AuNCs, con un diámetro de $1,90 \pm 0,04$ nm (Optimizados en el Capítulo III). Tanto los reactivos como el protocolo de síntesis están recogidos en el Experimental General (secciones **C.2.2.1** y **C.4.1**, respectivamente). Así mismo en la Sección **C.2.2.1**, se recogen también los reactivos usados para la síntesis de las inmunosondas mediante la reacción de la carbodiimida. Los anticuerpos primarios empleados para la síntesis de las inmunosondas son el Ab policlonal de cabra anti-Apolipoproteína E humana (Anti-h-APOE, concentración de partida $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) para la detección de APOE y Ab policlonal de conejo anti-Metalotioneína 2A humana (Anti-h-MT2A, concentración de partida $0,23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) para la detección de MT2A.

G.3.1.2. Expansión y tratamiento inflamatorio del cultivo celular e inmunoensayo de las células en suspensión

Para la expansión y crecimiento del cultivo celular usado en el Capítulo IV se sigue un protocolo similar al empleado en el Capítulo III (**Sección F.3.3.3F.3.1.2**). Las células son sometidas al tratamiento proinflamatorio con $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ de IL-1 α durante 48 h. Para realizar el inmunoensayo en suspensión celular, además de las inmunosondas marcadas con AuNCs, se emplearon los mismos reactivos generales que para la ICC en las cámaras portaobjetos (**Sección F.3.1.2**)

G.3.1.3. Reactivos para el análisis por *single-cell*-ICP-MS.

A diferencia del Capítulo III donde las células estaban fijadas en las cámaras portaobjetos, en el Capítulo IV las células se analizan en suspensión. Para ello, tras su crecimiento y tratamiento inflamatorio, fueron tripsinizadas de los *flask* T75 con Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma Aldrich) y posteriormente fueron suspendidas en un tampón compuesto por 50 mM de base Trizma (estándar primario y tampón >99,9% cristalino; Sigma Aldrich) y 17 mM de NaCl (Sigma Aldrich), mientras que el pH se ajustó a 7,4 con HCl diluido (VWR chemicals).

La eficiencia de transporte de la muestra en el sistema de introducción de muestras para análisis por sc-ICP-MS se calculó utilizando un estándar de AgNPs de 60 nm recubiertas de BPEI (NanoComposix). La curva de calibración para la cuantificación del Au se realizó utilizando estándares de Au en disolución (7% HCl, Supelco, 1000 g·mL⁻¹ estándar ICP, Merck-Millipore).

G.3.2. Instrumentación

Para llevar a cabo las medidas de por sc-ICP-MS se utilizó el ICP-MS NexION 350 X (PerkinElmer) para detectar las señales de intensidad de ¹⁹⁷Au⁺ y ⁵⁶Fe⁺ en células individuales HRPEsv40. El sistema de introducción de muestras consiste en un nebulizador de alta eficiencia (*high efficiency nebulizer*, HEN) de Meinhard, que se instaló en la cámara de nebulización AsperonR (PerkinElmer). La introducción de la muestra se llevó a cabo en modo de autoaspiración a la velocidad de introducción de muestra de 40 μL·min⁻¹. En el apartado de Instrumentación General se describe el sistema empleado (Sección [Error! No se encuentra el origen de la referencia.]). Las condiciones de medida optimizadas midiendo en modo de análisis en tiempo resultado se recogen en la **Tabla 17**

Tabla 17: Parámetros optimizados para los análisis de células HRPEs por sc-ICP-MS

Parámetro	Valores
ICP RF power (W)	1400
Flujo del gas de plasma (mL·min ⁻¹)	18
Flujo “make up” gas (mL·min ⁻¹)	0,6
Flujo de gas nebulizador (mL·min ⁻¹)	0,3
Isótopos (m/z)	¹⁹⁷ Au ⁺ , ⁵⁶ Fe ⁺ (celda de colisión, KED)
Flujo de He (KED) (mL·min ⁻¹)	4
Tiempo de adquisición(ms)	10

El procesamiento de los datos tras el análisis por sc-ICP-MS se realizó manualmente sobre la base de un algoritmo iterativo utilizando el software Microsoft Excel, lo que permitió discriminar los eventos celulares de la señal de fondo, que se atribuyó a las especies metálicas iónicas disueltas. La presentación de los datos (i.e., histogramas y perfiles de eventos celulares) también se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel.

G.3.3. Procedimientos experimentales

Los protocolos experimentales referidos a la siembra, expansión, y tratamiento inflamatorio (48 h, 100 ng·mL⁻¹ de IL-1 α) de la línea celular HRPEsv están recogidos en la **Sección C.4.7** del Experimental General. Se debe tener en cuenta que con el objetivo de obtener un número elevado de células por condición (~8-9·10⁶ células), estas fueron sembradas siempre en *flask* de cultivo celular de 75 cm² de área (*flask* T75) hasta su confluencia. A continuación, se recogen las etapas del diseño experimental para obtener las suspensiones celulares HRPEsv en condiciones control (CI) y tratadas (IL-1 α) para su análisis por sc-ICP-MS.

G.3.3.1. Preparación de las células HRPEsv40 en suspensión

En la **Figura 89** se recoge un diagrama de flujo de trabajo para una mejor comprensión del diseño experimental llevado a cabo en el Capítulo III.

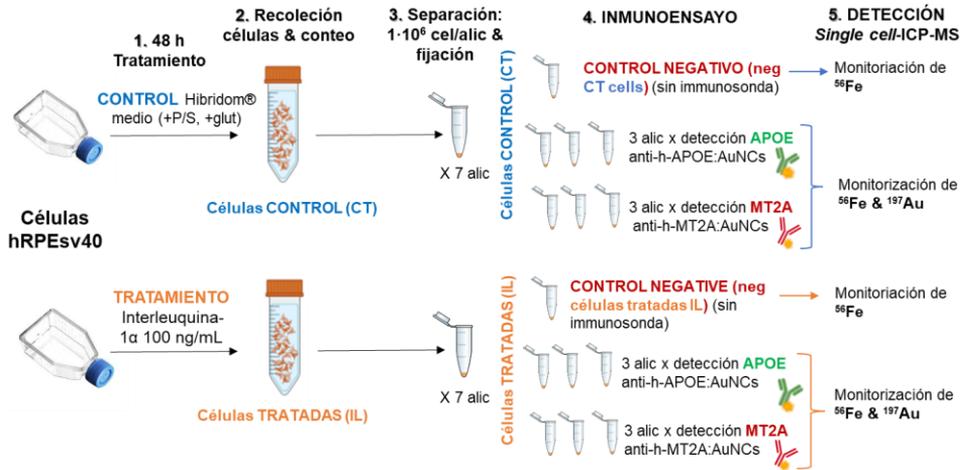


Figura 89: Diagrama de las etapas llevadas a cabo para el tratamiento de las células HRPEsv40 para la determinación de APOE y MT2A mediante análisis por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs.

A continuación, se describen las diferentes etapas llevadas a cabo:

(1) Tratamiento inflamatorio (detallado en la Sección C.4.7.3). Las células HRPEsv40, una vez confluentes en número, fueron sometidas al tratamiento de estrés inflamatorio añadiendo 10 mL por *flask* de 100 ng·mL⁻¹ IL-1α en medio Hibridoma (+5% l-glutamina, +1% P/S) para células tratadas (IL-1α) o medio Hibridoma para células CT y se incuban (37°C en 5% CO₂) durante 48 h. Transcurrido ese tiempo las células adheridas a la superficie del *flask* son lavadas tres veces con PBS1x.

(2) Recolección y conteo de la suspensión celular. Las células son tripsinizadas para su posterior recolección. Para ello, se incubaron durante 3 min (37°C en 5% CO₂) con 3 mL por *flask* de tripsina-EDTA al 0,5%. Seguidamente, se añadieron 10 mL de medio completo DMENF12 para detener la actividad de la tripsina (evitando así la lisis celular) y las células ya despegadas del *flask* fueron recogidas en tubos falcon de manera independiente (CT e IL-1α). Posteriormente se procedió a una centrifugación suave (3 min a 100 g) de las células para eliminar el medio, y tras un lavado con PBS1x para eliminar las células muertas se determinó el número de células en la suspensión bajo el microscopio utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

(3) Preparación de las muestras HRPEsv40. Una vez conocida la concentración celular para cada condición, se preparan cuidadosamente en diferentes tubos Eppendorf alícuotas de células a una concentración de $1,2-1,5 \cdot 10^6$ (concentración final después de la fijación $\sim 1 \cdot 10^6$ células·mL⁻¹) donde se lleva a cabo el procedimiento de fijación. Se evaluaron dos protocolos para la fijación de los cultivos celulares antes del inmunoensayo con las inmunosondas con los AuNCs, denominados como “condiciones tradicionales”¹² y condiciones de "fijación suave". Los pasos incluidos en ambos procedimientos se recogen en la **Tabla 18**. Una vez fijadas, las células fueron contadas otra vez con el hemocitómetro para conocer la concentración real de células por alícuota y finalmente fueron almacenadas a 4° en la nevera en un volumen de ~ 200 μ L de PBS 1x hasta su posterior uso. La morfología de las células fue evaluada durante todo el procesamiento de las muestras empleando un microscopio óptico para confirmar así la integridad las células.

(4) Inmunoensayo en suspensión. Cada una de las dos proteínas diana se analizó en tres réplicas biológicas de células CT y tres réplicas de células tratadas con IL-1 α . Además, se prepararon dos controles negativos (sin incubación de la inmunosonda); uno para las células control (neg-CT) y otro para las células tratadas con IL-1 α (neg-IL1 α).

(5) Detección por single-cell-ICP-MS. Tras el inmunoensayo se monitorizaron las señales de intensidad de ⁵⁶Fe⁺ y ¹⁹⁷Au⁺ mediante análisis por sc-ICP-MS para las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α , mientras que en los controles negativos sólo se monitorizó ⁵⁶Fe⁺ (neg-CT y neg-IL1 α).

¹² M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-Gonzalez, J. Bettmer, M. Montes-Bayon, Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection, *Anal. Chem.* 9, (2019), 15532–15538.

Tabla 18: Protocolos de fijación empleados con las células HRPEsv40 en suspensión: fijación tradicional vs fijación suave

	Fijación tradicional	Fijación suave
Etapas del protocolo de fijación celular	1. Pulso para retirar el PBS 1x (pellet celular “seco”)	1. Añadir 250 µL de PFA 4% a la suspensión celular (suspendida en 250 µL PBS 1x, no es un pellet celular seco)
	2. Añadir 500 µL de PFA al 4% directamente sobre el pellet celular	2. Incubación a temperatura ambiente (10 min)
	3. Incubación a temperatura ambiente (10 min)	3. Pulso y retirar el líquido (rpm suave)
	4. Pulso para retirar el PFA 4% (rpm suave)	4. Añadir otros 250 µL de PFA 4% al pellet celular
	5. Lavado con PBS 1x (1 vez)	5. Incubación a temperatura celular (10 min)
	6. Pulso para retirar el PBS 1x con las células dañadas/muertas	6. Pulso y retirar el PFA
	7. Añadir 1 mL de PBS 1x para almacenaje	7. Lavado con PBS 1x (1 vez)
		8. Pulso y eliminar el PBS y las células dañadas/muertas
		9. Añadir 1 mL de PBS 1x para almacenaje
Etapa final: Contar las células para comprobar el número de células por alícuota y almacenar las suspensiones celulares (en PBS 1x) en la nevera (4 °C) hasta su uso.		

G.3.3.2. Protocolo de inmunoensayo en células HRPEsv40 en suspensión empleando inmunosondas con AuNCs

El inmunoensayo para la detección de las proteínas citosólicas APOE y MT2A se realizó de forma independiente en las alícuotas ($1 \cdot 10^6$ células por alícuota) de células HRPEsv40 fijadas y en suspensión (células CT y tratadas con IL-1 α), tal y como se indica en el diagrama de la **Figura 89**. En la **Figura 90** se detallan los pasos llevados a cabo con cada una de las alícuotas, todos ellos a temperatura ambiente: 1) permeabilización de las membranas con un tensoactivo (500 µL de PBS 1x con 0,1% de Triton X-100) durante 15 min, 2) lavado con 500 µL de PBS 1x-0,05% de tween-20 y centrifugado a 100 g, 3) bloqueo con 500 µL de PBS 1x con 10% de suero de

burro y 1% de BSA durante 30 min de incubación, 4) incubación con las inmunosondas: 200 μL de Anti-h-MT2A: AuNCs o Anti-h-APOE: AuNCs en PBS 1x con 5% de suero de burro y 1% de BSA se añadieron en alícuotas independientes a las células en suspensión, 5) lavado con 500 μL de PBS 1x, y 6) finalmente se diluye la suspensión hasta obtener $1 \cdot 10^5$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ en tampón Trizma 50mM y 17mM de NaCl (pH 7,4) para su análisis por sc-ICP-MS.

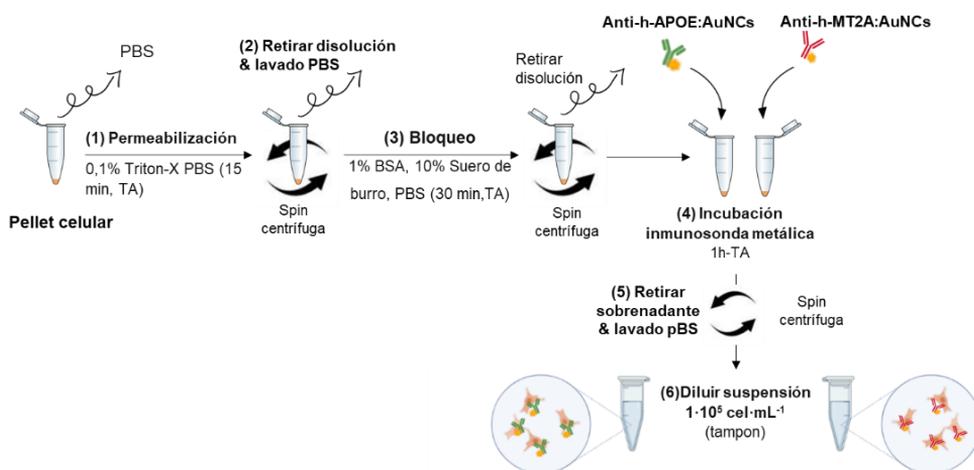


Figura 90: Esquema de las etapas experimentales para realizar el inmunoensayo en suspensión con las células HRPEsv40. Las incubaciones con las inmunosondas se realizan por separado y paralelamente para detectar MT2A o APOE (Anti-h-MT2A: AuNCs o Anti-h-APOE, respectivamente). TA: temperatura ambiente.

G.3.3.3. Análisis por sc-ICP-MS y procesamiento de los datos

Las suspensiones celulares HRPEsv40 (tras el inmunoensayo y posterior dilución en el tampón Trizma 50 mM, NaCl 17 mM pH 7,4) se introdujeron en el ICP-MS a través del nebulizador HEN (de alta eficiencia), que funcionó en modo de autoaspiración a una velocidad de introducción de muestras de $40 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Durante la adquisición, la suspensión celular se sometió a una agitación suave y continua con un vórtex.

El análisis por sc-ICP-MS de las muestras de células en suspensión se llevaron a cabo en modo de análisis de tiempo resuelto estableciendo los parámetros de medida recogidos en la **Tabla 17**. Posteriormente, para el tratamiento de los datos se

aplicó un procedimiento iterativo establecido para los análisis por sc-ICP-MS donde es posible discriminar los eventos celulares de las señales del fondo¹³. Dicha estrategia se basa en promediar todo el conjunto de datos y extraer los valores cuya desviación estándar esté tres o cinco veces (3σ ó 5σ , respectivamente) por encima de la media del conjunto de datos ($3\sigma + x$ ó $5\sigma + x$). Tras eliminar los eventos seleccionados, se repite el procedimiento hasta que no haya nuevos valores por encima del umbral ($3\sigma + x$ ó $5\sigma + x$). Una vez fijado el valor del umbral del conjunto de datos, todos aquellos valores por encima (conjunto de datos inicial) son considerados como eventos celulares, mientras que los eventos por debajo del umbral corresponden al fondo iónico (i.e., elemento disuelto). A lo largo de los ensayos se aplicaron dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos según se trate de la señal de un elemento intrínseco de las células o la señal del Au de las inmunosondas; se aplicó un umbral de $5\sigma + x$ para $^{197}\text{Au}^+$ y de $3\sigma + x$ para $^{56}\text{Fe}^+$ (el tratamiento de datos está detallado en la Sección de Resultados y Discusión).

Además, para determinar la cantidad de APOE y MT2A por célula individual a partir de los datos de sc-ICP-MS, tras descartar los eventos celulares del fondo iónico ($^{197}\text{Au}^+$ iónico de las inmunosondas con AuNCs) se deben realizar los siguientes cálculos: i) convertir la señal de intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ (cps) en masa de Au por célula; y ii) calcular la cantidad absoluta de proteína por célula teniendo en cuenta la estequiometría de cada inmunosonda (i.e., factor de amplificación de las inmunosondas). En la **Figura 91** se esquematiza el tratamiento de datos que se realiza tras el análisis de las células por sc-ICP-MS.

13 F. Laborda, J. Jimenez-Lamana, E. Bolea, J.R. Castillo, Selective identification, characterization and determination of dissolved silver(i) and silver nanoparticles on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 26, (2011), 1362–1371.

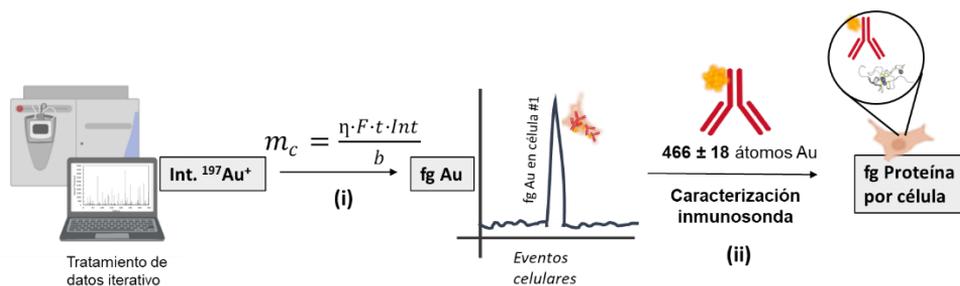


Figura 91: Esquema de los cálculos necesarios para transformar la señal de las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ en cps detectada en el ICP-MS (i.e., detección de los eventos celulares) en masa de proteína por célula (expresada como fg de proteínas por célula).

En primer lugar, la intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ (en cps) detectada en el ICP-MS por evento celular debe transformarse en masa absoluta de Au por evento celular. Para ello, se empleó una calibración externa utilizando estándares líquidos de Au ($0\text{-}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$) y se tuvo en cuenta la relación recogida en la Ecuación 3¹⁴⁻¹⁶:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot \text{Int}}{b} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde m_c es la masa de Au, F es el caudal de la muestra, t es el tiempo de adquisición, Int es la intensidad del evento neto, b es la pendiente de la curva de calibración, y η es la eficiencia de transporte. Para determinar la eficiencia de transporte, se midió una suspensión de una concentración conocida de NPs (60 nm de AgNPs, $50\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)¹⁷.

14 M. Corte-Rodríguez, R. Alvarez-Fernandez, P. García-Cancela, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using online sample introduction systems: Current developments and remaining challenges, Trends Anal. Chem. 132 (2020) 116042.

15 S. Theiner, K. Loehr, G. Koellensperger, L. Mueller, N. Jakubowski, Single-cell analysis by use of ICP-MS, J. Anal. At. Spectrom. 35 (2020) 35, 1784–1813.

16 S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle. Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite. Metallomics. 10 (2018) 73-76

17 H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Chem. 15, (2011), 9361–9369.

A continuación, para transformar la masa absoluta de Au por evento celular en masa de proteína (APOE o MT2A dependiendo de la alícuota) se siguió la estrategia descrita en los Capítulos II y III de la Tesis Doctoral: se debe tener en cuenta el factor de amplificación de la inmunosonda empleada. Como se describe en el Capítulo III, en el caso de las inmunosondas Anti-h-APOE y Anti-h-MT2A el factor de amplificación promedio es de 466 ± 18 átomos de Au.

G.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se incluyen las optimizaciones previas para un análisis reproducible y fiable por sc-ICP-MS de las células HRPEsv40, el cual engloba no sólo el estudio de la integridad celular durante la preparación e introducción de la suspensión de células en el plasma ICP-MS, sino también los estudios centrados en la adquisición de datos. En este último caso se han evaluado diferentes parámetros: el tiempo de integración, la configuración del sistema de introducción de muestra, la dilución de la muestra, o el tratamiento de datos. Finalmente, tras la elección de los parámetros adecuados, se discuten los resultados experimentales obtenidos para la cuantificación secuencial de dos proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en células individuales HRPEsv40 (CT y tratadas con IL-1 α) empleando AuNCs como marca elemental en las inmunosondas (i.e., Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs).

G.4.1. Preparación de la muestra para la detección de proteínas citosólicas en células HRPEsv40 intactas mediante sc-ICP-MS

Mantener la integridad de la célula al tiempo que se consigue la máxima eficiencia de transporte son dos de los puntos clave para una medida fiable y reproducible empleando sc-ICP-MS. El uso de un sistema de introducción de muestra que provoque la rotura de las células durante la nebulización y/o el transporte hacia el plasma ICP generaría no sólo bajas eficiencias de transporte, sino también altas señales de fondo (resultantes de la liberación y solubilización de los elementos presentes en el interior de las células). Por ello, llevar a cabo una correcta optimización de las condiciones de introducción de muestra es sumamente importante para el análisis de células intactas.

G.4.1.1. Monitorización de un elemento intrínseco de las células HRPEsv40.

Con el enfoque inicial de comprobar la integridad celular durante el análisis por sc-ICP-MS, resulta interesante la monitorización de un elemento constituyente de la célula junto con la detección de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ procedente de la inmunosonda

(Anti-h-APOE:AuNCs o Anti-h-MT2A:AuNCs). Además, medir un elemento intrínseco es también valioso para evaluar si las etapas experimentales a las que se someten las células (p.ej., tratamiento con IL-1 α , o el uso de inmunosondas con AuNCs) puede afectar al número de eventos celulares detectados en comparación con los observados para suspensiones de células HRPEsv40 que no están sometidas a dichos tratamientos (i.e., células control negativo).

Por lo tanto, con el objetivo de encontrar un elemento constituyente de las células HRPEsv40 que se pueda detectar con buena sensibilidad en el ICP-MS se realizó un primer cribado con diferentes elementos (Mg, Ca, Cu, P, S, Mn, Co, Zn, y Fe) utilizando para ello una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL-1 α). Como se puede observar en la **Tabla 19**, sólo los isótopos $^{44}\text{Ca}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$, y $^{56}\text{Fe}^+$ mostraron un número de eventos detectables comparables entre sí (471, 465, y 469, respectivamente) junto con una intensidad suficientemente alta (frente a la intensidad media del iónico disuelto). Sin embargo, la monitorización de $^{56}\text{Fe}^+$ proporcionó una mayor intensidad media por evento: 169,7 cuentas frente a 13,71 y 3,16 cuentas registradas para $^{44}\text{Ca}^+$ y $^{65}\text{Cu}^+$, respectivamente. Por lo tanto, la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ se monitorizó como elemento intrínseco de las células HRPEsv40 a lo largo de este estudio.

Tabla 19: Resultados experimentales obtenidos por sc-ICP-MS para el análisis de diferentes elementos constituyentes de las células HRPEsv 40 en una muestra de control negativo (neg-CT: células HRPEsv40 sin la inmunosonda con AuNCs y sin tratamiento con IL-1 α).

Analito	Número de eventos detectados	Int. media de los eventos (cuentas)	Int. media del iónico (cuentas)
$^{25}\text{Mg}^+$	1455	4,3	0,1
$^{44}\text{Ca}^+$	363	6,47	1,12
$^{63}\text{Cu}^+$	-	-	11,65
$^{65}\text{Cu}^+$	465	3,16	0,05
$^{24}\text{Mg}^+$	7	491,86	9,53
$^{47}\text{PO}^+$	9	1053,44	13,37
$^{48}\text{SO}^+$	36	121,11	3,93
$^{44}\text{Ca}^+$	471	13,71	4,32
$^{55}\text{Mn}^+$	2716	2,48	0,12
$^{59}\text{Co}^+$	241	4,35	0,07
$^{56}\text{Fe}^+$	469	169,7	7,76

Los resultados experimentales obtenidos también mostraron concordancia para el número de eventos celulares detectados en diferentes suspensiones celulares, como el neg-CT, neg-IL1 α , CT, e IL1 α , demostrando así que el tratamiento con IL-1 α o el inmunoensayo con las etiquetas de AuNCs no comprometían la integridad de las células HRPEsv40.

Se debe mencionar que la posibilidad de detección dual y simultánea de los isótopos $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ para cada célula individual no fue posible con el instrumento ICP-MS empleado. Por lo tanto, la detección de $^{197}\text{Au}^+$ (AuNCs) y $^{56}\text{Fe}^+$ (elemento intrínseco de las células) se realizó de forma secuencial para la misma suspensión de células, con una diferencia de 1 min entre medidas (i.e., el tiempo requerido por el ICP-MS para cambiar de la detección de $^{197}\text{Au}^+$ (modo estándar) a la detección de $^{56}\text{Fe}^+$ (modo KED donde se emplea He en la celda de colisión).

G.4.1.2. Protocolo para la fijación de las células HRPEsv40

La etapa de fijación de las células es requerida en los protocolos de inmunoensayo y además ha demostrado ser muy importante también para reforzar la estructura celular¹¹. El paraformaldehído (PFA) o el metanol¹⁸ son los reactivos empleados habitualmente como agentes fijadores. Sin embargo, el uso de concentraciones y/o condiciones no optimizadas (p.ej., altas concentraciones o largos tiempos de incubación) podría causar una rotura celular significativa y, por tanto, producirse una disminución en el número de células. En esta línea, en este Capítulo IV se investigó un nuevo protocolo de fijación, al que se denominó "fijación suave", para disminuir el efecto del PFA en comparación con los protocolos de fijación tradicionales (**Tabla 18**).

Para estudiar ambos protocolos de fijación con las células HRPEsv40, se contaron las células (íntactas y con forma bien definida) utilizando la cámara de Neubauer (y tinción con *Trypan blue*). Se empleó una muestra control. El recuento se repi-

¹⁸ M. Wang, L.-N. Zheng, B. Wang, H.-Q. Chen, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, H.J. Reid, B.L. Sharp, W.-Y. Feng, Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86, (2014), 10252–10256.

tió 3 veces para cada muestra, antes y después de la fijación, para obtener la desviación estándar asociada a la medida, la cual fue en todos los casos inferior al 20% de RSD (desviación estándar relativa). Para el recuento de células tras la fijación se emplearon cinco suspensiones celulares tratadas por separado con PFA al 4% (réplicas biológicas). Los resultados recogidos en la **Tabla 20** muestran que el porcentaje de pérdida de células se redujo de más del 40% empleando la fijación tradicional a un 14% utilizando el protocolo de "fijación suave" propuesto. De este modo, para trabajar con las células HRPEsv40 se emplearon las condiciones de fijación suave.

Tabla 20: Resultados obtenidos para la optimización del protocolo de fijación celular (fijación tradicional y fijación suave) en el que se realiza el recuento de células HRPEsv40 empleando la cámara de Neubauer.

Conteo celular	Fijación tradicional (célula·mL ⁻¹)	Fijación suave (célula·mL ⁻¹)
Antes de la fijación (n=3)	$1,12 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^5$	$1,73 \cdot 10^6 \pm 8,9 \cdot 10^4$
Después fijación & lavado (réplicas biológicas; n=5)	$5,93 \cdot 10^5 \pm 8,7 \cdot 10^4$	$1,50 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^5$
% pérdida celular	41,9%	13,6%

G.4.1.3. Optimización del inmunoensayo para la detección de proteínas empleando AuNCs como marca elemental

Además de la etapa de fijación, las etapas del inmunoensayo también pueden comprometer la integridad celular. Para evaluar la influencia de las etapas del inmunoensayo en el número de células, se seleccionaron tres alícuotas de células CT en las que se emplearon diferentes tiempos de incubación durante el inmunoensayo para la determinación de APOE. Tras el inmunoensayo, las suspensiones celulares fueron analizadas por sc-ICP-MS monitorizando la señal de ¹⁹⁷Au⁺ de la etiqueta elemental y la señal de ⁵⁶Fe⁺ como elemento naturalmente presente en las células (i.e., permite comprobar la integridad de las células tras el inmunoensayo). Se evaluaron dos tiempos para la etapa de bloqueo (30 min y 1 h) así como para la incubación de la inmunosonda (toda la noche a 4°C y 1 h a temperatura ambiente).

En cuanto al bloqueo, no se observaron diferencias significativas para los dos tiempos evaluados, mientras que sí se observó que el uso de tiempos de incubación

largas para la inmunosonda (toda la noche a 4°C) afectó a la integridad de las células HRPEsv40. En la **Figura 92** se muestran los perfiles de tiempo resuelto obtenidos para los isótopos $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ utilizando la incubación nocturna de la inmunosonda (Anti-h-APOE:AuNCs) para una muestra de células HRPEsv40 CT (sin tratamiento con IL-1 α). Tras el tratamiento de datos y la discriminación de los eventos celulares se contó un número significativamente menor de eventos tras la incubación nocturna (46 eventos de media; n=3) en comparación con la incubación de 1 h (406 eventos de media; n=3). Además, la señal de $^{197}\text{Au}^+$ procedente del Au iónico (i.e., Au en disolución) aumentó de 7 a 74 cuentas, tal y como se puede observar en el zoom de la **Figura 92**. Este hecho indica que un número significativo de células se rompieron, liberando el contenido metálico de la inmunosonda, lo que contribuye a aumentar el contenido de Au en la disolución (también se observa un ligero aumento para la señal media de $^{56}\text{Fe}^+$ desde 113 a 146 cts).

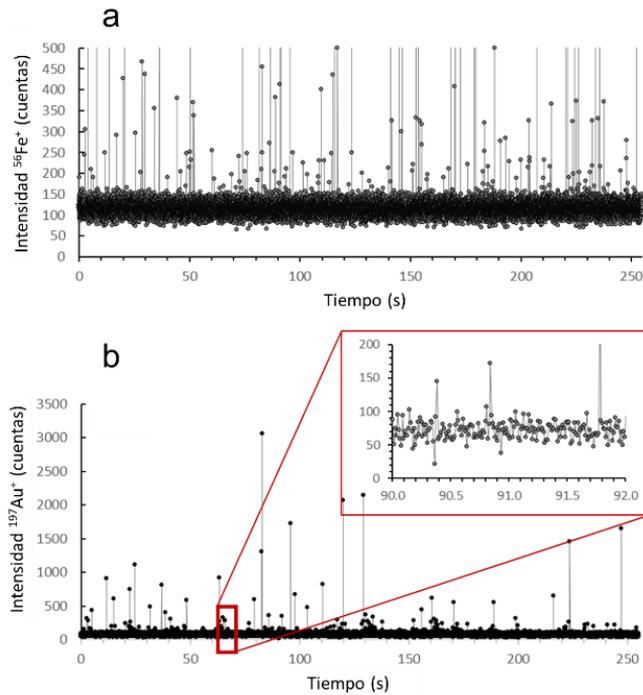


Figura 92: Perfiles de tiempo resuelto para $^{56}\text{Fe}^+$ y $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPEsv40 CT tras realizar el inmunoensayo para la determinación de APOE utilizando una incubación con la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs durante toda la noche. a) Perfil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

Por otro lado, se evaluó también la etapa de lavado que sigue a la incubación de las células con la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. Tras la incubación de la inmunosonda debe llevarse a cabo un lavado para eliminar el exceso de Ab marcado que no ha detectado proteína en la muestra. De este modo, se puede asegurar que la señal de $^{197}\text{Au}^+$ detectada durante los análisis por sc-ICP-MS es únicamente debida a la detección de la proteína en el citosol de las células HRPEsv40. Sin embargo, llevar a cabo un procedimiento de lavado exhaustivo puede llegar a afectar a la integridad celular, y por ello al número de células intactas que alcanzan el ICP. Por todo ello, se evaluó el empleo de una etapa de lavado simple o doble con el objetivo de eliminar eficazmente las inmunosondas no unidas específicamente a las células, pero asegurando al mismo tiempo que se minimiza la rotura y pérdida celular. Al realizar una

etapa doble de lavado con la suspensión celular se observó una reducción significativa en cuanto al número de eventos celulares detectados con la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ de 123 (un lavado) a 50 (dos lavados). Por lo tanto, se descartó aplicar un doble lavado a los pellets celulares tras el inmunoensayo. En su lugar se empleó un lavado suave y cuidadoso con PBS1x para evitar la rotura y debilitación de las membranas para la introducción de las células al sistema sc-ICP-MS. El procedimiento optimizado consiste en realizar la centrifugación del pellet a 100 g en la centrífuga y, posteriormente, se resuspende el pellet celular en el tampón (Trizma 50 mM, NaCl 17mM).

G.4.1.4. Configuración del sistema de introducción de muestra

Para su análisis por sc-ICP-MS, las muestras se introdujeron directamente desde los tubos Eppendorf donde se almacenaron y prepararon las alícuotas de células HRPEsv40. Para garantizar la carga de una suspensión celular homogénea en el ICP-MS, así mantener la integridad de las células y asegurar que no se produce sedimentación de las mismas, se aplicó una agitación suave y continua a los tubos empleando un vórtex. Además, se compararon dos configuraciones de introducción de muestra diferentes. En la **Figura 93** se muestra una fotografía de las dos configuraciones: a) una bomba peristáltica externa es empleada para suministrar la suspensión celular con un flujo de $20\text{-}25\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, y b) se emplea autoaspiración directamente desde el tubo Eppendorf con un flujo de $40\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

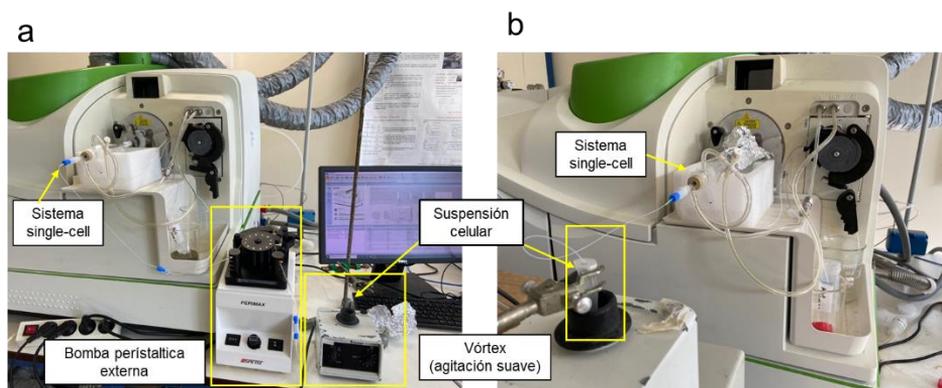


Figura 93: Fotografías de los montajes experimentales empleados para la introducción de muestra (suspensión celular) en el ICP-MS. a) flujo de introducción de muestra controlado por una bomba peristáltica externa (flujo de $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$), y b) sistema de autoaspiración (flujo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

En el caso de la utilización de la bomba peristáltica externa fue necesario el empleo de un tubo de aspiración de la muestra relativamente largo (como se puede observar en la fotografía), lo que provocó una importante adherencia de las células a las paredes del tubo. Por este motivo, fueron necesarios frecuentes y prolongadas etapas de limpieza entre muestras para evitar que se bloqueara el tubo de aspiración, alargando significativamente las medidas. Por el contrario, el uso de autoaspiración demostró ser una mejor opción para el análisis de células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS, aun siendo el flujo de introducción de muestra mayor. En cualquier caso, teniendo en cuenta la concentración de células introducidas en el ICP-MS ($1 \cdot 10^5$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$) y el tiempo fijado de *dwell time* del ICP-MS (10 ms), se puede asegurar que no se está detectando más de una célula por evento. Esto se puede entender llevando a cabo el siguiente cálculo teórico del número de células que se introducen en el plasma por *dwell time*. Si la eficiencia del transporte celular al ICP-MS fuese del 100%, se introducirían $1 \cdot 10^5$ células mL^{-1} . Al multiplica este valor por $0,04 \text{ mL min}^{-1}$ (flujo de introducción de la muestra) da como resultado 4000 células $\cdot \text{min}^{-1}$ o $66,7$ células s^{-1} . Así, en 10 ms (*dwell time*), deberían detectarse $0,667$ células cada 10 ms (menos de una célula por *dwell time*).

En ambos casos se calculó la eficiencia de transporte midiendo una suspensión de un material de referencia (AgNPs de 60 nm; $50 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$). Aunque los resultados

mostraron una eficiencia comparable con ambos sistemas (25,0% para el sistema con la bomba peristáltica frente a un 23,8% para el sistema por autoaspiración) se seleccionó como sistema óptimo la autoaspiración ya que se evitan los problemas de sedimentación y bloqueo de los tubos.

G.4.2. Selección del tiempo de adquisición en el ICP-MS

Como se ha descrito en la Introducción General, para los análisis por sc-ICP-MS la elección de un tiempo de adquisición que detecte una única célula por evento es crítica. En este contexto la elección del tiempo de adquisición juega un papel muy importante en los análisis y debe ajustarse teniendo en cuenta la dilución de las células introducidas en el sistema ICP, así como el flujo de entrada de las mismas. Teniendo en cuenta el ICP-MS empleado y las limitaciones del tratamiento de datos (Microsoft Excel), estos parámetros deben ser evaluados para asegurar que no existe una superposición de células por evento y que un evento celular no está definido por muchos *dwell time*.

Tal y como se establece en la **Ecuación 3**, la intensidad de los eventos celulares puede transformarse en masa, siendo uno de los parámetros de la ecuación el tiempo de integración utilizado para adquirir las señales transitorias procedentes de la detección de células individuales. En nuestro caso, al ajustar 10 ms como tiempo de integración (siendo la concentración celular de $1 \cdot 10^5$ células·mL⁻¹ y el flujo de entrada de la suspensión de 40 μL·min⁻¹), la intensidad de un único tiempo de integración proporciona la intensidad total de un evento correspondiente a una única célula. Es decir, un evento de detección celular tal y como se recoge en la **Figura 94** durar 0,02 ms, pero sólo un único tiempo de integración corresponde con la intensidad de una única célula detectada (p. ej. a 23,786 s). De este modo, la intensidad de la señal de ¹⁹⁷Au⁺ se puede transformar en masa directamente, sin la necesidad de tener en cuenta el área bajo el pico en el tiempo de duración del evento.

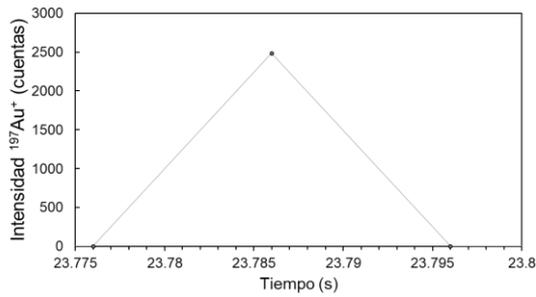


Figura 94: Ejemplo del perfil obtenido para un evento celular adquirido monitorizando la señal de $^{197}\text{Au}^+$ y empleando 10 ms como tiempo de integración ($1 \cdot 10^5$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ y un flujo de $40 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$).

G.4.3. Optimización de la dilución de la muestra para el análisis de células HRPEsc40 por sc-ICP-MS

La selección de una concentración adecuada de células HRPEsv40 en suspensión se llevó a cabo mediante una dilución en serie con células CT y tratadas con IL- 1α , adquiriendo en ambos casos tanto la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (AuNCs de la etiqueta de las inmunosondas) como de $^{56}\text{Fe}^+$. Siempre que las todas las condiciones seleccionadas para el análisis estén optimizadas correctamente se debería obtener un número comparable de eventos celulares para ambos isótopos mediante análisis por sc-ICP-MS. A modo de ejemplo, la **Figura 95** muestra los perfiles resueltos en el tiempo obtenidos para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs). Como se puede observar, el número de eventos celulares aumentó (**Figura 95b-Figura 95f**) a medida que aumenta la concentración de las células en la suspensión ($1 \cdot 10^4$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$ y $1 \cdot 10^6$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$), respectivamente).

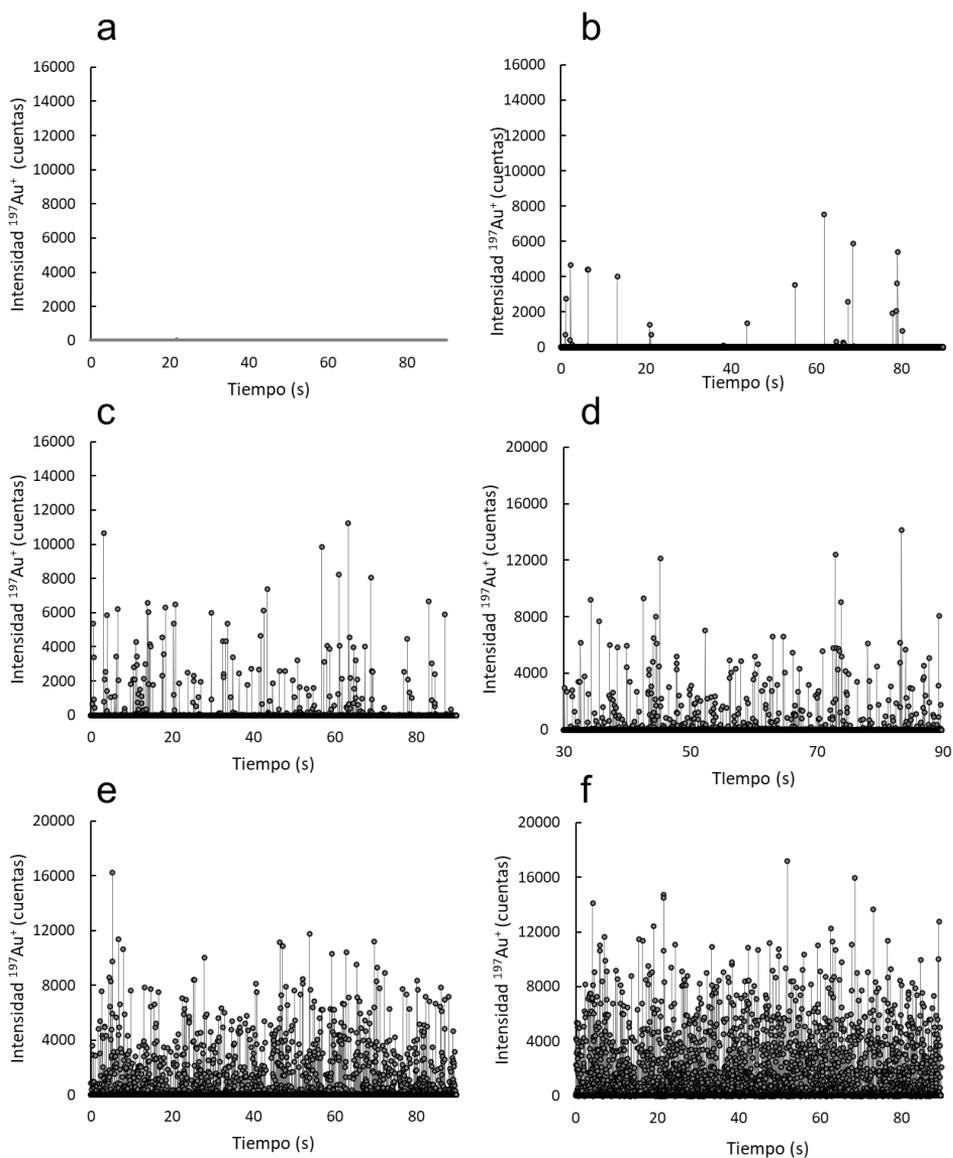


Figura 95: Ensayo de dilución para células HRPEsv 40 CT donde se muestran los perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos por sc-ICP-MS para diferentes diluciones seriadas de las células (inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs). Se aplicaron diluciones en serie empleando el tampón TRIZMA 0,1% NaCl (pH 7,4). a) 0 células mL^{-1} , b) $1 \cdot 10^4$ células mL^{-1} , c) $1 \cdot 10^5$ células mL^{-1} , d) $2,5 \cdot 10^5$ células mL^{-1} , e) $5 \cdot 10^5$ células mL^{-1} y f) $1 \cdot 10^6$ células mL^{-1} .

Tras el análisis de los datos para determinar el número de eventos celulares, una vez aplicado el umbral donde se resta la señal del fondo (i.e., Au iónico), se observó un aumento lineal para el número de células detectadas con la concentración de la muestra, de $1 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^5$ células \cdot mL $^{-1}$ (representadas en la **Figura 96** como círculos negros). Sin embargo, la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ fue constante con la dilución (representada como un gráfico de barras en la **Figura 96**), indicando detección de eventos celulares únicos por *dwell time* (10 ms) y por ello baja probabilidad de solapamiento de células por evento que aumentarían la señal promedio. Además, la señal procedente del Au disuelto fue siempre inferior a 10 cuentas, lo que demuestra que la inmunosonda de AuNCs marcó de manera altamente eficaz y eficiente la proteína específica (APOE en este caso concreto) dentro de la célula.

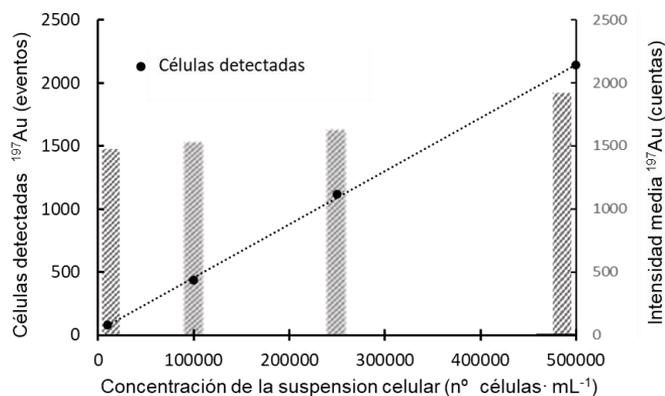


Figura 96: Resultados obtenidos para el ensayo de dilución de la suspensión de células HRPEsv40 CT (inmunosonda Anti-b-APOE:AuNCs). En el gráfico se representa en forma de barras la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ para la población celular medida por sc-ICP-MS, así como el número de células detectadas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

El comportamiento lineal observado para el número de eventos celulares en las suspensiones

de células HRPEsv40 con una concentración entre $1 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^5$ células \cdot mL $^{-1}$ no se cumple para la concentración más alta ($1 \cdot 10^6$ células mL $^{-1}$) y además la señal de la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ aumenta hasta casi dos veces su valor. La **Figura 97**

recoge el perfil resuelto en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenido por sc-ICP-MS para la suspensión de células con una concentración de $1 \cdot 10^6$ células mL^{-1} . Como se puede observar en el perfil ampliado a la derecha de la imagen, para dicha muestra algunos eventos están definidos por varios *dwell times* (cuadrados rojos en el perfil), hecho que no ocurre para las concentraciones más bajas de células. De este modo se puede afirmar que para la muestra de células con una mayor concentración existe una alta probabilidad de superposición de dos células en el mismo evento, utilizando las condiciones de análisis establecidas (*dwell time* de 10 ms y velocidad de flujo de $40 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). Por lo tanto, la concentración de células seleccionada para los análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS fue de $1 \cdot 10^5$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$. En este caso las señales del perfil resuelto en el tiempo están bien definidas y la posibilidad de solapamiento de múltiples células se minimiza.

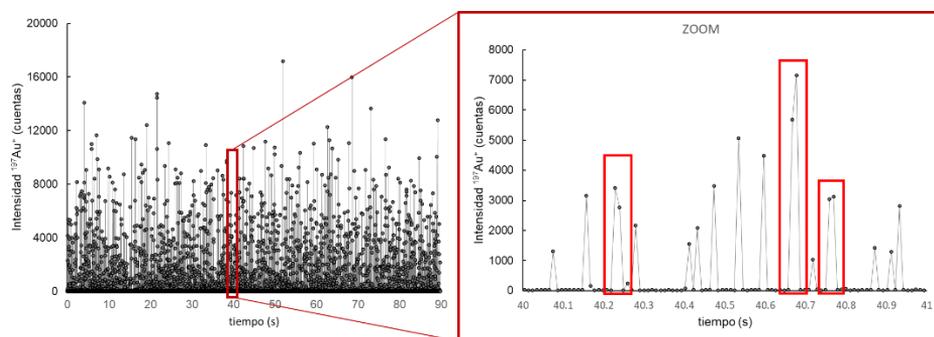


Figura 97: Perfil resuelto en el tiempo para el análisis de células individuales empleando sc-ICP-MS donde se monitoriza la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs) para una muestra con una concentración de células HRPEsv40 CT de $1 \cdot 10^6$ célula $\cdot \text{mL}^{-1}$.

G.4.4. Tratamiento de los datos: criterios para la discriminación de eventos celulares siguiendo las señales de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$

Con respecto a las señales de intensidad obtenidas para $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ en las suspensiones de células HRPEsv40 analizadas por sc-ICP-MS, los resultados experimentales mostraron que debe aplicarse un criterio de discriminación diferente (3σ ó 5σ) a los dos isótopos seleccionados para la correcta determinación de los eventos celulares. Al aplicar el mismo criterio de discriminación 5σ para las señales de intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ resultantes del análisis de células HRPEsv40 CT y tratadas

con IL-1 α , el número de eventos celulares detectados con la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ fue menor que empleando la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (ver **Tabla 21**).

Tabla 21: Resultados obtenidos para el análisis por sc-ICP-MS de células HRPE_{sv40} (CT e IL-1 α) tratadas con la inmunosonda Anti-b-APOE: AuNCs empleando dos criterios diferentes para el tratamiento de los datos: 5 σ para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ y 3 σ y 5 σ para la señal de $^{56}\text{Fe}^+$. Eventos detectados durante una adquisición de 90 s ($n=3$ réplicas instrumentales para $^{197}\text{Au}^+$ y $n=2$ para $^{56}\text{Fe}^+$).

Monitorización $^{197}\text{Au}^+$			Monitorización de $^{56}\text{Fe}^+$					
	n° células	Promedio n° células - 5 σ	n° de células - 5 σ	Promedio n° células - 5 σ	% subestimación (5 σ)	n° de células - 3 σ	Promedio n° células - 3 σ	% subestimación (3 σ)
CT1	237	260	175	188	28%	254	273	5%
	250		200			292		
	292		-			-		
CT2	256	254	173	150	41%	223	247	3%
	222		127			270		
	286		-			-		
CT3	341	379	126	153	60%	382	401	6%
	373		179			420		
	424		-			-		
IL2	213	192	130	132	32%	218	226	17%
	180		133			233		
	184		-			-		
IL3	313	336	200	197	41%	319	328	2%
	349		193			336		
	345		-			-		

Además, tal y como se muestra en la **Figura 98a** al representar el número de eventos detectados (aplicando el criterio 5 σ) frente a la concentración de células introducidas en el sistema, la pendiente que se obtiene para el $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ son muy diferentes. Esta observación puede atribuirse a una subestimación de los eventos celulares utilizando el criterio de 5 σ para el $^{56}\text{Fe}^+$. Como puede verse en el zoom del perfil para la adquisición de $^{56}\text{Fe}^+$ (**Figura 98b**), se observan claramente varios eventos celulares con intensidades inferiores al umbral aplicado para la discriminación 5 σ . Estos eventos que han sido descartados en el tratamiento de datos (marcados en la imagen con flechas) deberían ser incluidos en el número de eventos puesto que representan señales de detección de células individuales (los blancos del procedimiento no presentan eventos debido $^{56}\text{Fe}^+$). Sin embargo, como se ilustra en la **Figura 98b** con una línea roja, al aplicar el criterio 3 σ a las intensidades de $^{56}\text{Fe}^+$ se detectó un

mayor número de eventos celulares con el $^{56}\text{Fe}^+$, los cuales coinciden en el mismo rango con el número de eventos celulares determinado para la adquisición de $^{197}\text{Au}^+$ con un criterio 5σ (Tabla 21). Esta concordancia en el número de eventos celulares detectados aplicando los diferentes criterios para cada elemento monitorizado se comprobó para diferentes suspensiones de células HRPEsv40 CT.

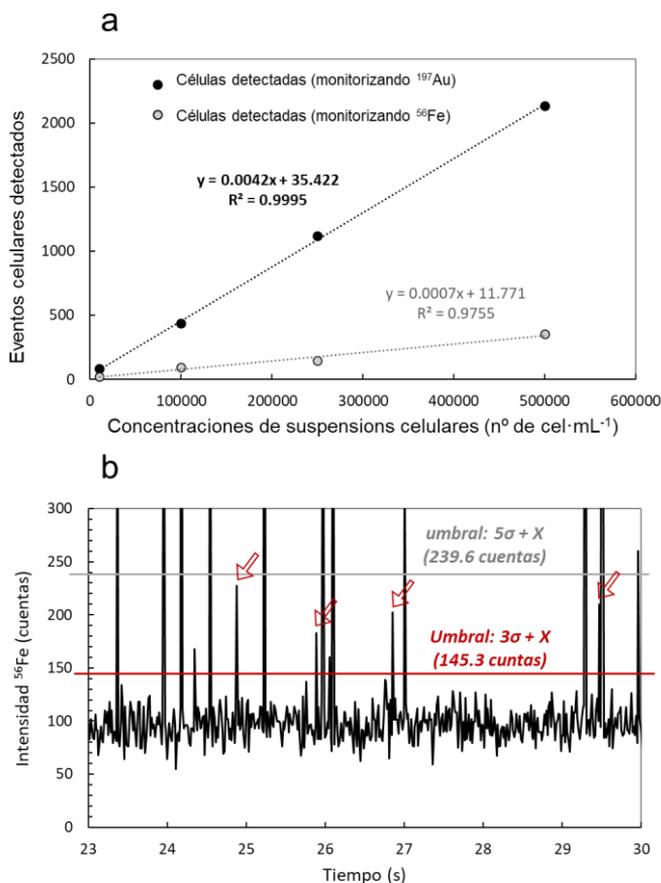


Figura 98: Estudio que ilustra cómo afecta el tratamiento de los datos con los criterios 5σ y 3σ a la señal de $^{197}\text{Au}^+$ y $^{56}\text{Fe}^+$ para el análisis de células HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando AuNCs como etiqueta metálica en la detección de proteínas. a) Gráfico donde se observa una relación lineal entre el número de eventos celulares detectados frente a la concentración celular aplicando el mismo criterio de discriminación para el tratamiento de los datos: $5\sigma + X$ para el $^{197}\text{Au}^+$ y el $^{56}\text{Fe}^+$, y b) Perfil resuelto en el tiempo para la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ ($1 \cdot 10^5$ células· mL^{-1}) obtenido para el análisis de células HRPEsv40 CT por sc-ICP-MS donde se marcan con una línea los umbrales calculados aplicando los criterios 3σ y 5σ (línea roja y gris, respectivamente). Las flechas rojas marcan los eventos celulares que no se tienen en cuenta en caso de aplicar el criterio $5\sigma + X$.

Además, esta concordancia observada para el número de eventos celulares aplicando el criterio 5σ para el Au y 3σ para el Fe, se refleja también en la pendiente obtenida para la relación entre el número de células detectadas y la concentración de células en la suspensión: 0,0042 para el $^{197}\text{Au}^+$ y 0,0041 para el $^{56}\text{Fe}^+$ (la pendiente para la señal de Fe con el criterio 3σ era de 0,0007; **Figura 98**). Se debe resaltar que al aplicar el criterio 5σ para determinar los eventos celulares con la señal de $^{197}\text{Au}^+$ permite discriminar los eventos que corresponden a la detección de las células HRPEsv40 de los posibles eventos debidos a las inmunosondas libres marcadas con AuNCs, las cuales no estaban unidas a las proteínas citosólicas en las células y que puedan no haberse eliminado completamente en las etapas de lavado.

G.4.5. Determinación de APOE y MT2A en células individuales HRPEsv40 por sc-ICP-MS empleando inmunosondas con AuNCs: células CT y tratadas con IL-1 α

La determinación de APOE y MT2A en las células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS se realizó de forma independiente en las suspensiones celulares sometidas al inmunoensayo con las inmunosondas Anti-h-APOE:AuNCs y Anti-h-MT2A:AuNCs, respectivamente. Además, cada proteína se cuantificó en las células cultivadas CT y aquellas sometidas a un tratamiento proinflamatorio con IL-1 α .

G.4.5.1. Determinación de MT2A en células HRPEsv40

Para evaluar la posible variación en los niveles de expresión de MT2A bajo condiciones de estrés inflamatorio, las células HRPEsv40 CT y sometidas al tratamiento con IL-1 α (tras la incubación con la inmunosonda Anti-h-MT2A:AuNCs) fueron analizadas por sc-ICP-MS bajo las condiciones de trabajo optimizadas. A modo de ejemplo, en la **Figura 99a y b** se muestran los perfiles de tiempo resultado obtenidos para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ por sc-ICP-MS en las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α , respectivamente. Se puede observar que la intensidad de los eventos de Au (correspondientes a los AuNCs de la inmunosonda y, por tanto, que detectan la proteína citosólica MT2A) aumentan con el tratamiento con IL-1 α (**Figura 99a** y **99b**).

Figura 99b). Como se muestra en las Tablas incluidas en la **Figura 99**, tras el tratamiento de datos iterativo aplicando el umbral 5σ , se obtienen en ambos casos un número de eventos celulares comparables durante los 90 s de adquisición (547 células CT y 562 células tratadas con IL-1 α). Para la intensidad media de $^{197}\text{Au}^+$ por evento, esta se ve incrementa de ~ 1500 cuentas en las células CT a ~ 3400 cuentas en las células tratadas con IL-1 α (la señal es más del doble al comparar estas dos muestras biológicas). Estos valores observados para las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ sugieren una sobreexpresión de MT2A tras el tratamiento proinflamatorio.

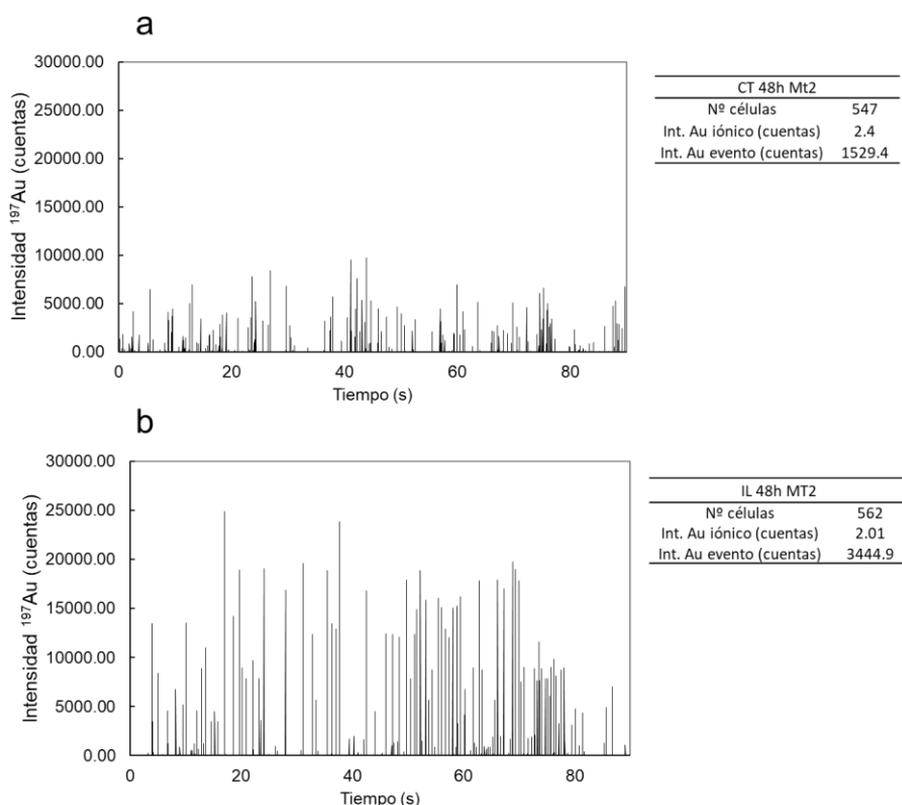


Figura 99: Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis de células HRPE_{si40} CT y tratadas con IL-1 α por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL-1 α . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio $5\sigma +x$.

Una vez analizadas las muestras, las señales obtenidas para la intensidad de $^{197}\text{Au}^+$ pueden ser transformadas en concentración de MT2A (expresada como fg de proteína por célula), teniendo en cuenta la calibración con estándares de Au en disolución, así como el factor de amplificación de la inmunosonda. La **Tabla 22** contiene los resultados obtenidos del análisis por sc-ICP-MS para la MT2A en células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α (tres réplicas biológicas por condición y cada una de ellas con tres réplicas analíticas). A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que el tratamiento de las células HRPEsv40 con 100 ng·mL $^{-1}$ de IL-1 α durante 48 h produce un aumento significativo de los niveles intracelulares de MT2A (se observó un cambio de 1,8 veces para la concentración de MT2A entre ambos grupos de células). Cabe mencionar que la incertidumbre asociada a la concentración de MT2A obtenida por sc-ICP-MS es elevada, pero puede atribuirse principalmente a la gran variabilidad biológica de las suspensiones celulares. La desviación estándar asociada a la concentración de MT2A en las células CT fue particularmente grande, especialmente para la réplica CT2 que mostró una concentración significativamente menor que las otras réplicas. Indicar que este valor se incluyó también para determinar la concentración media de la proteína en las células, aunque incluso descartando este valor se observó una sobreexpresión de MT2A en las células HRPEsv40 tratadas con IL-1 α . Como también se incluye en la **Tabla 22**, el $^{56}\text{Fe}^+$ se monitorizó para todas las muestras, mostrando valores para el número de eventos celulares comparables a los detectados monitorizando la señal de $^{197}\text{Au}^+$. Hay que tener en cuenta que las variaciones en el número de eventos detectados son asumibles teniendo en cuenta que no se están midiendo simultáneamente los dos isótopos; aunque se trata de la misma suspensión celular (misma réplica biológica) la adquisición de $^{56}\text{Fe}^+$ y $^{197}\text{Au}^+$ no se está realizando al mismo tiempo para una misma célula.

Tabla 22: Resultados experimentales obtenidos para la determinación de MT2A en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-MT2A: AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (Rep. Bio.) para cada condición (CT e IL-1 α) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3).

		N° eventos ⁵⁶ Fe+	N° eventos ¹⁹⁷ Au+	Int. ¹⁹⁷ Au+/cel	fg Au/cel	fg MT2A/cel	Rango fg MT2A/cel	fg MT2 A/cel	fg rep. bio. MT2A/cel
CT1	R1	459	473	375.6	17.2	1.16	0.032-38.4	1.05	0.66±0.45
	R2	654	716	231.1	10.97	1.06	0.092-18.1		
	R3	*	713	210.1	9.94	0.94	0.1-18.87		
CT2	R1	199	206	43.92	2.07	0.17	0.023-2.7	0.16	
	R2	204	229	44.11	2.08	0.15	0.02-4.8		
	R3	-	-	-	-	-	-		
CT3	R1	309	368	265.6	12.57	0.83	0.026-28.5	0.77	
	R2	427	396	283.1	13.39	0.76	0.026-27.2		
	R3	*	467	230.6	10.91	0.72	0.023-31.0		
IL1	R1	487	469	326.0	15.43	1.04	0.026-23.4	1.04	
	R2	481	500	165.9	7.87	0.52	0.026-37.2		
	R3	*	563	140.3	6.64	0.44	0.029-38.72		
IL2	R1	189	209	86.2	4.08	0.26	0.023-17.5	1.2	1.19±0.14
	R2	243	215	47.02	2.22	0.15	0.023-6.48		
	R3	*	483	384.8	18.21	1.2	0.03-48.37		
IL3	R1	478	422	444.7	21.04	1.38	0.026-30.72	1.34	
	R2	407	455	408.2	19.31	1.27	0.026-33.21		
	R3	*	481	414.3	19.6	1.36	0.026-39.11		

Por otro lado, y para explicar mejor la gran incertidumbre obtenida para los valores de concentración de MT2A en las réplicas biológicas, resulta interesante estudiar el histograma de frecuencia de masa para cada muestra. Además, los histogramas proporcionan información muy valiosa a la hora de evaluar el posible efecto del tratamiento proinflamatorio en cada célula individual para una población de células HRPEsv40. En la **Figura 100** se muestran los histogramas obtenidos para el análisis de una suspensión de células HRPEsv40 CT y otra de células tratadas con IL-1 α , donde se representa el porcentaje de células que contienen una determinada cantidad de MT2A (expresada en fg). En ambos casos se encontró un elevado número de células con cantidades muy bajas de MT2A (0,5-1,0 fg de MT2A). Además, se observó que alrededor del 20% de las células de la población total se vieron significativamente afectadas por el tratamiento con IL-1 α , y la masa de MT2A en dichas células

estaba en el rango de 1,0-3,5 fg de MT2A. Este porcentaje de células aumentó significativamente los niveles de expresión de la proteína, mientras que el resto de la población celular mostró valores similares para las células CT y tratadas con IL-1 α , lo que indica una respuesta biológica diferente para las células individuales dentro de una población frente a un mismo estímulo proinflamatorio en condiciones *in vitro*.

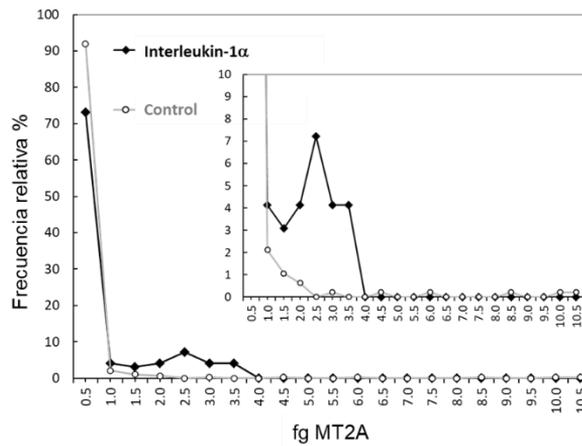


Figura 100: Histograma de frecuencia de masa para la MT2A en células HRPEsv40 CT (CT2-R2; línea gris) y células tratadas con IL-1 α (IL3-R2; línea negra) tras su análisis por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-MT2A:AuNCs).

G.4.5.2. Determinación de APOE en células HRPEsv40

Al igual que en el caso de la MT2A, el contenido de APOE en las células HRPEsv40 se determinó mediante sc-ICP-MS, utilizando en este caso la inmunosonda Anti-h-APOE:AuNCs, para evaluar la influencia del tratamiento proinflamatorio con IL-1 α . A modo de ejemplo, en la **Figura 101** se muestran los perfiles de tiempo resuelto obtenidos para células HRPEsv CT y tratadas con IL-1 α . A diferencia de lo que ocurría para la MT2A, no se observa un cambio significativo con respecto a las intensidades de $^{197}\text{Au}^+$ para los eventos celulares detectados en las células CT y tratadas con IL-1 α . Tal y como se describe en el Capítulo III para los análisis tanto de expresión génica por qPCR, como en los ELISA cuantitativos la APOE

muestra una disminución de su expresión (nivel gen o nivel proteína respectivamente) del ~40% bajo los efectos del tratamiento proinflamatorio con IL-1 α .

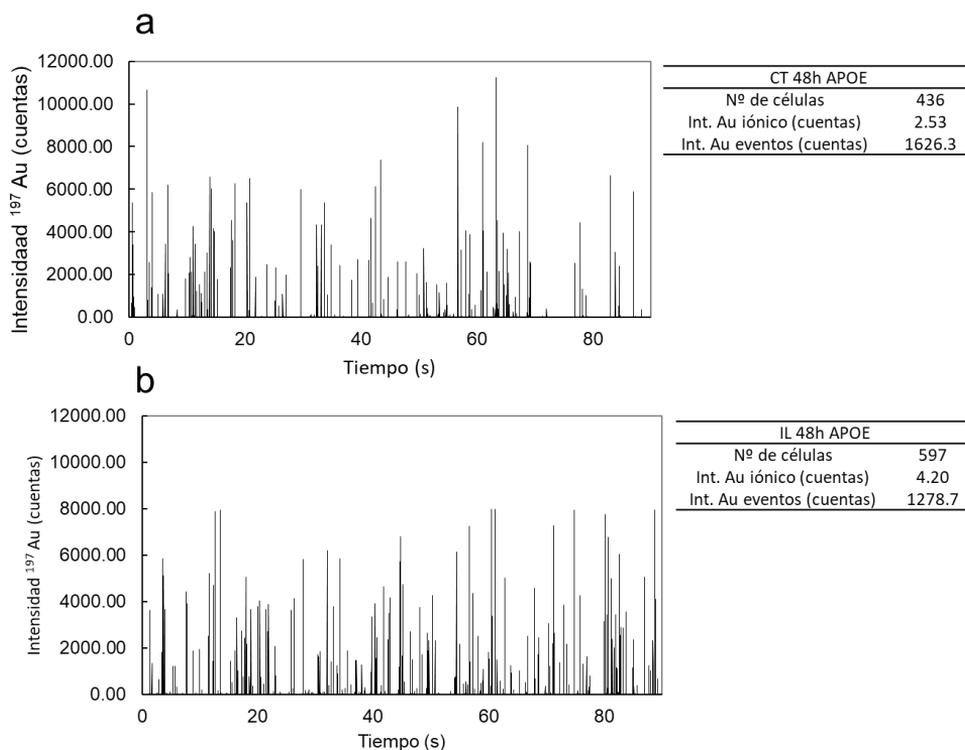


Figura 101: Perfiles resueltos en el tiempo para la señal de $^{197}\text{Au}^+$ obtenidos para el análisis de células HRPE $_{sv40}$ CT y tratadas con IL-1 α por sc-ICP-MS (inmunosonda: Anti-h-APOE: AuNCs). a) Células CT, y b) Células tratadas con IL-1 α . En ambas muestras se incluye una tabla con los resultados obtenidos para los eventos celulares tras el tratamiento de los datos aplicando el criterio $5\sigma +x$.

Tras el tratamiento de todos los datos obtenidos por sc-ICP-MS para las réplicas biológicas (recogidos en la **Tabla 23**), se puede observar que los rangos y los valores medios de concentración obtenidos para APOE mostraban una disminución significativa del contenido de dicha proteína, lo que sugiere que los niveles de APOE disminuyen tras el tratamiento proinflamatorio. Se ha obtenido una masa de APOE promedio para las réplicas biológicas de $18,1 \pm 2,1$ fg para las células CT y $13,3 \pm 0,4$ fg para las células sometidas al tratamiento proinflamatorio.

Tabla 23: Resultados experimentales obtenidos para la determinación de APOE en células HRPEsv40 mediante sc-ICP-MS utilizando la inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs. Se analizaron tres réplicas biológicas (Rep. Bio.) para cada condición (CT e IL-1 α) y cada una de ellas se analizó tres veces (réplicas analíticas: R1, R2 y R3).

		N° de eventos ⁵⁶ Fe ⁺	Int. eventos ¹⁹⁷ Au ⁺	fg Au/cel	fg APOE/cél	Range de fg APOE/Cél	Int. promedio de APOE/cel	Promedio rep. bio. fg APOE/cell
CT1	R1	237	1470.7	69.58	24.99	0.28-230	20.7	18.1±2.1
	R2	250	1354.88	64.1	23.02	0.25-215		
	R3	292	829.57	39.248	14.09	0.23-199		
CT2	R1	-	-	-	-	-	16.6	
	R2	222	1091	51.65	18.55	0.24-498		
	R3	286	857	40.54	14.56	0.26-284		
CT3	R1	341	901.81	42.67	15.31	0.31-238	17.0	
	R2	373	1249	59.13	21.09	0.30-211		
	R3	424	864.34	40.89	14.68	0.30-186		
IL1	R1	307	637	34.74	13.10	0.10-111	12.8	
	R2	345	752	35.60	12.78	0.09-124		
	R3	320	689	35.07	12.59	0.52-169		
IL2	R1	213	786	37.17	13.35	0.23-151	13.5	
	R2	180	879	41.58	14.93	0.23-164		
	R3	184	728	33.96	12.2	0.26-230		
IL3	R1	313	1011	47.84	17.18	0.29-206	13.7	
	R2	349	739	34.53	12.4	0.28-173		
	R3	345	678	32.06	11.39	0.27-191		

Al igual que se mostró para la MT2A, en la **Figura 102** se representa el histograma de frecuencia de masas por célula obtenido para la APOE por sc-ICP-MS para una de las réplicas biológicas medidas de la suspensión de células HRPEsv40 CT y otra para células tratadas con IL-1 α . Como puede observarse, sólo el ~11% de las células mostraron una disminución de la expresión de la proteína tras el tratamiento con IL-1 α . Además, el porcentaje de células que mostraban una menor concentración de APOE tras el tratamiento con IL-1 α estaba en el rango de concentración de proteína entre 40-140 fg APOE (i.e., a niveles relativamente bajos de concentración si se compara con los máximos de concentración a los que llegan algunos rangos de masa de APOE de algunas poblaciones celulares, **Tabla 23**).

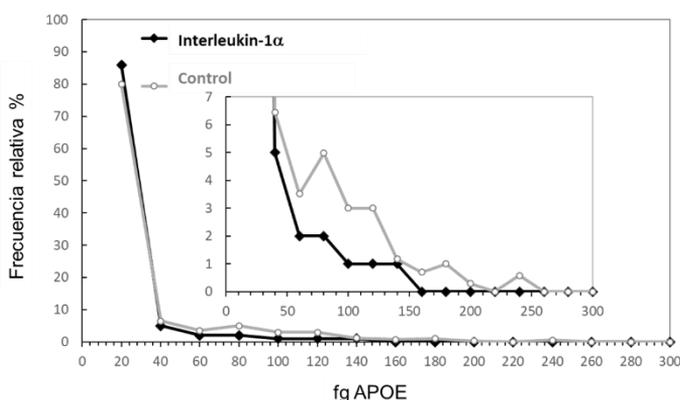


Figura 102: Histograma de frecuencias de masa para la APOE en células HRPEsv40 CT (CT2-R1; línea gris) y células tratadas con IL-1 α (IL3-R3; línea negra) tras su análisis sc-ICP-MS (inmunosonda Anti-h-APOE: AuNCs).

Finalmente, los resultados obtenidos para ambas proteínas con el análisis por sc-ICP-MS fueron comparados con la masa de MT2A y APOE encontradas para la cuantificación de las células HRPEsv40 empleando kits ELISA comerciales, así como con la metodología desarrollada por LA-ICP-MS (Capítulo III de la Tesis Doctoral).

Por un lado, los valores medios determinados por sc-ICP-MS para la MT2A (fg MT2A/célula) en células HRPEsv40 se pueden comparar con los obtenidos por un kit comercial ELISA cuantitativo empleando la fracción citosólica de células HRPEsv40 lisadas. La concentración de MT2A determinada por el kit ELISA resultó ser de $1,74 \pm 0,18$ fg MT2A/célula para las células HRPEsv CT y de $3,36 \pm 0,50$ fg MT2A/célula para las células tratadas con IL-1 α . Los resultados experimentales muestran un aumento de 1,9 veces la expresión de la proteína tras el tratamiento con IL-1 α , lo que confirma la sobreexpresión de MT2A observada tras el tratamiento proinflamatorio. Aunque las concentraciones medias obtenidas por sc-ICP-MS y ELISA estaban en el mismo rango, se observan algunas diferencias. Esto puede ser atribuible al hecho de que se emplearon cultivos celulares diferentes (*batch* diferentes de células) para llevar a cabo la cuantificación por ELISA y los análisis por sc-ICP-MS. Para el caso de la APOE, la concentración media de APOE determinada por ELISA fue de $17,9 \pm 1,3$ fg APOE/célula para las células CT y de $10,2 \pm 0,53$ fg

APOE/célula para las células tratadas con IL-1 α , lo que concuerda de nuevo con el contenido proteico medio determinado por sc-ICP-MS. En contraste con la sobre-expresión de MT2A observada tras el tratamiento proinflamatorio, se observaron cambios de 0,7 y 0,6 veces respectivamente para APOE por sc-ICP-MS y ELISA entre las células HRPEsv40 CT y tratadas con IL-1 α .

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en este capítulo con los obtenidos mediante la estrategia de cuantificación por LA-ICP-MS desarrollada en el Capítulo III; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se obtuvieron las mismas tendencias de expresión, un aumento de 1,98 para MT2A al medir por sc-ICP-MS frente al aumento de 2,1 encontrado mediante LA-ICP-MS y para el caso de APOE, una disminución de la expresión siendo 0,73 la encontrada mediante sc-ICP-MS y 0,58 la encontrada por LA-ICP-MS. Sin embargo, queda clara la tendencia de la expresión de ambas proteínas observada por las tres estrategias, así como los valores absolutos en el mismo rango de concentración.

G.5. CONCLUSIONES

Las conclusiones específicas de este capítulo IV se centran en la cuantificación de dos proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células individuales de HRPEsv CT y tratadas con IL-1 α (48h) mediante medidas de células en suspensión sc-ICP-MS empleando las inmunosondas marcadas con los AuNCs sintetizados en el Capítulo III. Las conclusiones son:

- ✓ Por una parte, se estudiaron los parámetros de introducción de muestra y preparación de las células HRPEsv para asegurar su integridad celular durante el tratamiento, procesamiento e inmunoensayo en suspensión.
 - Se optimizaron las etapas del inmunoensayo en suspensión con el objetivo con el objetivo de disminuir el tiempo de las incubaciones (incubación 1h frente toda la noche de la inmunosonda)
 - Aplicación de un protocolo nuevo de fijación “fijación suave” frente a la tradicional con la que se pierden más del 40% de las células.
- ✓ Se monitorizó el $^{56}\text{Fe}^+$ como elemento intrínseco de las células para corroborar los eventos celulares detectados por la inmunosonda y la integridad celular de las mismas.
 - Se evaluaron los criterios de discriminación $3\alpha + X$ y $5\alpha + X$ para el tratamiento de los datos obtenidos por sc-ICP-MS al monitorizar $^{197}\text{Au}^+$ o $^{56}\text{Fe}^+$, encontrando que, aplicando el criterio $5\alpha + X$ permitía discriminar los eventos celulares de los eventos debidos a las inmunosondas en disolución al monitorizar $^{197}\text{Au}^+$ mientras que $3\alpha + X$ permitió para el caso del hierro no descartar eventos de menor intensidad que eran debidos a células. Así mismo la monitorización de hierro en todas las muestras medias se empeló como manera de comprobación de la integridad celular y de chequeo al comparar el número de eventos detectados.
- ✓ Los resultados obtenidos mediante sc-ICP-MS para la concentración de MT2A y APOE por célula se compararon con los obtenidos previamente en

el capítulo III, dando valores adecuados y en el rango. Además, observándose la misma tendencia de sobreexpresión para la proteína MT2A (de 1.9 veces mayor tras el tratamiento) y subexpresión de la proteína APOE (0.6 veces menor tras el tratamiento).

- ✓ Por lo tanto, este trabajo allana el camino para el análisis posterior de las proteínas citosólicas, así como para el uso de estas inmunosondas marcadas con AuNCs caracterizadas para la determinación de otro tipo de proteínas u otros cultivos celulares por sc-ICP-MS. Además, la aplicación de etiquetas constituidas por otros NCs metálicos (por ejemplo, Pt, Au, Ir) permitiría la determinación sensible simultánea (los NCs contienen un alto número del isótopo detectado por tamaño de la etiqueta) de diferentes proteínas en células individuales cuando se utiliza TOFMS para la detección.

H. CONCLUSIONES GENERALES

La conclusión general que se puede extraer de los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral es el gran potencial analítico que han demostrado las estrategias de marcaje elemental empleando los PtNCs y en combinación con las técnicas de detección por ICP-MS. Estas estrategias permiten el desarrollo de metodologías para el estudio cuantitativo de proteínas en diferentes muestras biológicas, desde tejidos (nivel supracelular) a células individuales (nivel celular). Esta conclusión se fundamenta en los siguientes puntos:

- ✓ **Inicialmente, a lo largo del Capítulo I, se logró una síntesis óptima de PtNCs para su aplicación como nuevos nanomarcadores en el desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de IgE en suero humano.**

Tras su síntesis, los PtNCs se caracterizaron en cuanto a sus propiedades ópticas, estructurales, estabilidad, y concentración, demostrando su elevada calidad para uso como nanoestructuras multimodales (p. ej. fluorescencia y detección elemental). Se logró optimizar la relación molar anticuerpo:PtNCs (1:20) para generar inmunosondas que mantenga tanto la funcionalidad de anticuerpo como las propiedades luminiscentes de los PtNCs. Posteriormente se evaluó su uso para la cuantificación de biomoléculas y como prueba de concepto se aplicó a la cuantificación del biomarcador de la enfermedad alérgica, IgE. Para ello se desarrolló un inmunoensayo competitivo directo empleando las inmunosondas Anti-h-IgE:PtNCs como marcaje para la detección directa y bimodal (fluorescente y elemental), logrando mejorar los límites de detección de las metodologías habitualmente usadas y disponibles comercialmente. Dicho inmunoensayo se ha utilizado para la determinación de IgE en 4 sueros humano mediante medidas por ICP-MS por nebulización convencional y los resultados obtenidos fueron confirmados mediante el método de referencia: inmunoensayo ELISA comercial. La elevada amplificación de la señal, ~ 1300 átomos de Pt por Ab, demuestra el prometedor uso de los PtNCs como marcas elementales en este tipo de aproximaciones donde las concentraciones de las proteínas (biomarcadores) se presentan en muy bajas concentraciones.

- ✓ **Por otra parte, en el Capítulo II se consiguió desarrollar una metodología de *bioimaging* múltiple de 3 proteínas (MT1/2, CFH y APP) en tejidos oculares combinando la detección por LA-ICP-MS y una estrategia de marcaje inmunohistoquímico simultáneo al emplear 3 inmunosondas metálicas específicas sintetizadas con 3 MNCs diferentes: AuNCs, AgNCs y PtNCs.**

Se logró sintetizar y caracterizar las 3 inmunosondas: Anti-h-MT1/2:AuNCs (N = 310), Anti-h-CFH:AgNCs (N = 730) y Anti-h-APP (N = 1194) para su uso en estrategia de marcaje múltiple. Así, posteriormente a la adición de las tres inmunosondas durante un proceso inmunohistoquímico (IHC), se pudo obtener por LA-ICP-MS el *imaging* cualitativo (i. e., distribución) de cada proteína siguiendo las señales de los tres elementos de los NCs: $^{197}\text{Au}^+$ para MT1/2, $^{107}\text{Ag}^+$ para CFH y $^{195}\text{Pt}^+$ para APP. Se consiguió optimizar las condiciones de análisis por LA-ICP-MS para conseguir la mejor resolución lateral para el análisis de las tres proteínas (i.e., detección de $^{197}\text{Au}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$ y $^{107}\text{Ag}^+$) en la misma sección de tejido empleando un ICP-MS con un analizador de masas de doble enfoque. Adicionalmente, se obtuvieron imágenes 2D de distribución cuantitativa empleando una estrategia de calibración con patrones de gelatina dopados con los elementos (Au, Ag y Pt). Las señales de $^{197}\text{Au}^+$, $^{195}\text{Pt}^+$ y $^{107}\text{Ag}^+$ detectadas por LA-ICP-MS se transformaron así en concentración. Finalmente, se obtuvo el *imaging* cuantitativo para las tres proteínas en las estructuras micrométricas de la retina, donde se observó la acumulación de depósitos extracelulares relacionados con la DMAE. Las distribuciones proteicas fueron corroboradas mediante IHC convencional siguiendo la fluorescencia de fluoróforos empleados como marcas de los anticuerpos secundarios (p. e., Fluor Alexa® 488). Con esta metodología se consiguieron obtener distribuciones cuantitativas de proteínas en regiones oculares (EPR o CB) que mediante las técnicas convencionales de IHC e IF no se puede distinguir por la autofluorescencia del tejido.

- ✓ **En el Capítulo III se consiguió desarrollar una novedosa estrategia de cuantificación de dos proteínas citosólicas (APOE y MT2A) en células**

individuales humanas del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv) empleando LA-ICP-MS.

Primeramente, para llevar a cabo los análisis en células, la síntesis de los AuNCs fue optimizada con el objetivo de disminuir la desviación asociada a la dispersión de sus diámetros y así lograr valores de cuantificación más exactos. Posteriormente, para llevar a cabo los análisis cuantitativos por LA-ICP-MS, se generaron patrones de laboratorio cuya matriz es igual a la compleja matriz celular de las muestras. Para ello se suplementaron las células de HRPEsv40 con suspensiones de concentraciones crecientes de AuNCs (patrones unicelulares: HRPEsv@AuNCs). Para la detección por ICP-MS de las proteínas en las células individuales se desarrolló una estrategia de marcaje elemental y de manera secuencial empleando inmunosondas específicas marcadas con AuNCs. Con esta metodología fue posible estudiar cuantitativamente las alteraciones en los niveles de expresión de las dos proteínas relacionadas con la DMAE en células individuales bajo condiciones de inflamación con la citoquina interleuquina-1 α (IL-1 α). Además, los resultados de fg/célula de APOE y MT2A en las células HRPEsv control y tratadas con IL-1 α obtenidos por LA-ICP-MS empleando la metodología de análisis desarrollada en este capítulo se corroboraron con éxito mediante el empleo de kits de cuantificación ELISA comerciales y mediante análisis de la expresión genética, qPCR.

- ✓ **Finalmente, en el Capítulo IV, se logró estudiar cuantitativamente las proteínas citosólicas (MT2A y APOE) en células intactas e individuales de poblaciones celulares del epitelio pigmentario de la retina (HRPEsv40) tras el inmunoensayo empleando las inmunosondas específicas marcadas con AuNCs y la técnica de análisis elemental *single-cell-ICP-MS*.**

Se optimizaron las condiciones de introducción de las muestras celulares en suspensión líquida en el sistema sc-ICP-MS para evitar el solapamiento de células por evento del ICP-MS (p.ej. concentración celular o flujo de introducción) al ajustar un tiempo de *dwell time* de 10 ms. Además, se midió la señal de $^{56}\text{Fe}^+$ como elemento

constitutivo de las células HRPEsv para comprobar su integridad tras el inmunoensayo en suspensión y confirmar el número de eventos celulares detectados debido a las marcas ($^{197}\text{Au}^+$). Se logró cuantificar las proteínas citosólicas (MT2A y APOE) secuencialmente en células HRPEsv (control y tratadas con IL-1 α) al transformar la señal de $^{197}\text{Au}^+$ de cada evento celular medido por sc-ICP-MS en concentración de oro por célula, teniendo en cuenta la eficiencia de transporte (empleando un patrón certificado de AgNPs con tamaño 60 nm), el flujo, el tiempo de adquisición y la pendiente de un calibrado de disoluciones patrón de Au. Posteriormente, conociendo la estequiometría de las inmunosondas (i. e., relación NCs:Ab disponible) fue posible determinar los fg de cada proteína por célula individual. Los resultados cuantitativos obtenidos por célula para APOE y MT2A mediante el procedimiento sc-ICP-MS se corroboraron con los kits comerciales de ELISA. De esta manera, con la nueva metodología se logra con éxito estudiar el comportamiento y las variabilidades biológicas cuantitativas de cada proteína célula a célula en condiciones control y bajo un tratamiento de inflamación en muestras celulares con un mayor número de células medidas por análisis.

I. ANEXO 1

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas, todas ellas en revistas internacionales indexadas en el JCR (Journal Citation Report):

1. **Lores-Padín, A.**; Cruz-Alonso, M.; González-Iglesias, H.; Fernández, B.; Pereiro, R. Bimodal determination of immunoglobulin E by fluorometry and ICP-MS by using platinum nanoclusters as a label in an immunoassay. *Microchimica Acta*, 186, 2019, 705. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3868-9>
2. Cruz-Alonso, M., **Lores-Padín, A.**, Valencia, E., González-Iglesias, H.; Fernández, B.; Pereiro, R. Quantitative mapping of specific proteins in biological tissues by laser ablation-ICP-MS using exogenous labels: aspects to be considered. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 2019, 549–558. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1411-1>
3. **Lores-Padín, A.**; Menero-Valdés, P.; Fernández, B.; Pereiro, R. Nanoparticles as labels of specific-recognition reactions for the analysis of biomolecules by inductively coupled plasma-mass spectrometry-A Review. *Analytica Chimica Acta*. 1128, 2020, 251-268 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.008>
4. **Lores-Padín, A.**; Fernández, B.; Álvarez L.; González-Iglesias, H.; Lengyel, I.; Pereiro, R. Multiplex bioimaging of proteins-related to neurodegenerative diseases in eye sections by laser ablation-Inductively coupled plasma-Mass spectrometry using metal nanoclusters as labels. *Talanta*, 221, 2021, 121489. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121489>
5. **Lores-Padín, A.**; Mavrikakis, E.; Fernández, B.; García, M.; González-Iglesias, H.; Pereiro, R.; Pergantis, S.A. Gold nanoclusters as elemental label for the sequential quantification of apolipoprotein E and metallothionein 2A in individual human cells of the retinal pigment epithelium using single cell-ICP-MS. *Analytica Chimica Acta*, 1203, 2022, 339701. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339701>

6. **Lores-Padín, A.**; Fernández, B.; García, M.; González-Iglesias, H.; Pereiro, R.; Real matrix-matched standards for quantitative bioimaging of cytosolic proteins in individual cells using metal nanoclusters as immunoprobes-label: a case study using laser ablation ICP-MS detection. *Analytica Chimica Acta*, **2022**. *En revision*.

Otras Publicaciones (Proceedings):

7. **Lores-Padín, A.**; Menero-Valdés, P.; Rodríguez-Penedo, A.; González-Iglesias, H.; Fernández, B.; Pereiro, R. Synthesis of size monodisperse water-soluble metal nanoclusters for protein quantification by elemental mass spectrometry, *Mater. Proc.* 4 (2021) 43. <https://doi.org/10.3390/IOCN2020-07812>