

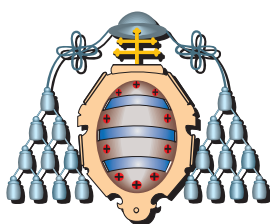
UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de Química Física y Analítica

**EMPLEO DE
MEDIDAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS
COMO INDICADORAS DE LA
LIBERACIÓN DE METALES TRAZA
PROCEDENTES DE IMPLANTES
ORTOPÉDICOS Y ODONTOLÓGICOS**

TESIS DOCTORAL

Yoana Nuevo Ordóñez

Oviedo 2011



UNIVERSIDAD DE OVEDO
Departamento de Química Física y Analítica

**EMPLEO DE
MEDIDAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS
COMO INDICADORAS DE LA
LIBERACIÓN DE METALES TRAZA
PROCEDENTES DE IMPLANTES
ORTOPÉDICOS Y ODONTOLÓGICOS**

TESIS DOCTORAL

Yoana Nuevo Ordóñez

Oviedo 2011

"Se alcanza el éxito convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso"

Carlos C. Cortéz

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN	1
A.1 PRÓTESIS E IMPLANTES.....	3
A.1.1 Prótesis articular de cadera	5
A.1.2 Implantes para osteosíntesis	8
A.1.3 Implantes dentales oseointegrados	11
A.1.4 Materiales para la fabricación de implantes ortopédicos y dentales.....	12
A.1.5 Degradación de los implantes ortopédicos y dentales	20
A.1.6 Respuesta biológica a los residuos metálicos liberados de los implantes ortopédicos y dentales	26
A.1.7 Metodologías analíticas para la determinación de los metales procedentes de implantes ortopédicos y dentales en los fluidos biológicos.....	33
A.1.7.1 Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica.....	35
A.1.7.2 Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.....	38
A.2 ESPECIACIÓN DE METALES TRAZA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	43
A.2.1 Importancia y necesidad de la especiación metálica	43
A.2.2 Técnicas analíticas para la especiación metálica en fluidos biológicos.....	45
A.2.3 Estudios de especiación de los metales liberados por los implantes ortopédicos y dentales en fluidos biológicos.....	50
A.3 ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN A METALES... 57	57
A.3.1 Formación y toxicidad de las especies reactivas de oxígeno.....	57
A.3.2 Mecanismos celulares de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno	61
A.3.3. Causas de inducción de estrés oxidativo y sus consecuencias sobre la salud	63

ÍNDICE

A.3.4 La enzima superóxido dismutasa como biomarcador del estrés oxidativo	66
A.3.4.1 Características generales de las superóxido dismutasas	67
A.3.4.2 Métodos de determinación de la Cu,Zn-superóxido dismutasa.....	70
A.4 REFERENCIAS	75
B. OBJETIVOS/ OBJECTIVES	95
C. EXPERIMENTAL.....	101
C.1 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA	103
C.1.1 Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)	103
C.1.2 Espectrómetros de masas moleculares	109
C.1.3 Instrumentación utilizada en las separaciones cromatográficas ..	110
C.1.4 Instrumentación utilizada en el tratamiento de muestras biológicas.....	111
C.1.5 Otra instrumentación utilizada.....	113
C.2 MATERIALES, REACTIVOS Y DISOLUCIONES	114
C.3 MATERIALES DE REFERENCIA Y MUESTRAS.....	117
C.3.1 Materiales de referencia.....	117
C.3.2 Muestras.....	117
C.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	118
C.4.1 Protocolos de limpieza	118
C.4.2 Obtención y tratamiento de las muestras biológicas (orina, sangre y suero).....	118
C.4.3 Tratamiento de las muestras de sangre para la extracción de la enzima Cu, Zn-superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD)	121
C.4.4 Medida de la actividad de la enzima Cu,Zn-SOD mediante el ensayo del pirogalol.....	122
C.4.5 Evaluación de la recuperación del Cu y Zn asociados al enzima Cu,Zn-SOD de la columna cromatográfica de intercambio aniónico.....	125

C.4.6 Obtención de la enzima Cu,Zn-superóxido dismutasa isotópicamente enriquecida.....	126
C.4.7 Tratamiento de las muestras para su análisis mediante MALDI-TOF-MS	127
C.4.8 Saturación de la transferrina con hierro	129
C.4.9 Tratamiento enzimático de la transferrina con neuraminidasa	130
C.4.10 Estudio de la posible hipersensibilidad asociada a los metales liberados por los implantes metálicos mediante el test MELISA.....	130
C.5 METODOLOGÍAS DE CÁLCULO.....	133
C.5.1 Medida de las relaciones isotópicas: cálculo del factor de discriminación de masas y tiempo muerto del detector en el ICP-MS..	133
C.5.2 Determinación de la concentración total de Cr, Co, Mo, Mn y Ti en muestras de sangre y orina mediante calibración externa utilizando el HR-ICP-MS.....	135
C.5.3 Determinación de la concentración total de Ti en suero humano mediante dilución isotópica	136
C.5.4 Especiación elemental cuantitativa mediante estrategias de dilución isotópica.....	138
C.5.5 Tratamiento de datos estadísticos.....	147
C.6. REFERENCIAS.....	148
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	151
D.1 CAPÍTULO I: <i>Determinación total y especiación de los principales metales liberados por las prótesis de cadera metal sobre metal</i>	153
D.1.1 Introducción.....	154
D.1.2 Objetivo general y objetivos parciales	157
D.1.3 Optimización de la celda de colisión/reacción: tipo de gas y flujo de gas	158
D.1.4 Artículo científico I: <i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i> 24 (2009) 1037-1043	160
D.1.5 Referencias bibliográficas	168

D.2 CAPÍTULO II: <i>Evaluación de la liberación de titanio y su transporte en el suero de pacientes portadores de implantes de osteosíntesis intramedulares y extramedulares</i>	171
D.2.1 Introducción.....	172
D.2.2 Objetivo general y objetivos parciales.....	176
D.2.3 Artículo científico II: <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> DOI 10.1007/s00216-011-5232-8	177
D.2.4 Artículo científico III: <i>Metallomics</i> . In press	186
D.2.5 Referencias	207
D.3 CAPÍTULO III: <i>Efectos de los metales liberados por los implantes en el organismo: cambios en los niveles de Cu,Zn-SOD como respuesta al estrés oxidativo</i>	209
D.3.1 Introducción.....	210
D.3.2 Objetivo general y objetivos parciales.....	213
D.3.3 Artículo científico IV: <i>Analytical Chemistry</i> . 82 (2010) 2387-2394.....	214
D.3.4 Artículo científico V: <i>Journal of Analytical Atomic Spectrometry</i> 26 (2011) 150-155	223
D.3.5 Referencias.....	229
E. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	231
F. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS/ SUGGESTIONS FOR FUTURE WORKS.....	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A.1. Representación de algunos de los dispositivos que pueden ser implantados en el cuerpo humano..... 4

Figura A.2: Comparación entre una cadera: A) sana y B) con artrosis 6

Figura A.3: Componentes de una prótesis total de cadera..... 7

Figura A.4: Radiografías de implantes intramedulares colocados en: a) fémur, b) tibia y c) húmero..... 9

Figura A.5: Radiografías de implantes extramedulares colocados en: a) fémur, b) tibia y c) húmero 10

Figura A.6: Implante dental 11

Figura A.7: Fotografía de una prótesis de cadera M/M modelo McKee-Farrar 18

Figura A.8: Fotografía de una prótesis de cadera M/P..... 19

Figura A.9. Fotografía de una prótesis de cadera M/M de nueva generación.. 20

Figura A.10: Corrosión de un metal en condiciones fisiológicas..... 22

Figura A.11: Esquema de los procesos de disolución parcial y reprecipitación de la capa de pasivado de un material metálico (tanto en disolución acuosa como *in vivo*) 24

Figura A.12: Paciente con alergia dermatológica causada por los metales liberados de una prótesis articular M/M..... 29

Figura A.13: Recopilación de los estudios que muestran el porcentaje (valor medio) de incidencia de la hipersensibilidad a Ni, Co y Cr en: población general, pacientes con artroplastias M/M y pacientes con artroplastias M/M con fracaso de las mismas por osteólisis 30

Figura A.14: Representación esquemática de las biomoléculas que contienen heteroátomos endógenos 44

Figura A.15: Técnicas híbridas utilizadas para la especiación de metales traza en los fluidos biológicos 46

ÍNDICE

Figura A.16. Niveles de concentración de las principales proteínas séricas y Hb	52
Figura A.17: Acción conjunta de los sistemas antioxidantes enzimáticos	63
Figura A.18: Estructura cristalina de la enzima Cu,Zn-SOD humana	69
Figura A.19. Estructura del centro activo de la enzima Cu,Zn-SOD	69
Figura A.20. Ensayo ELISA para la determinación de la concentración de Cu,Zn-SOD	72
Figura C.1. Plasma e interfase de extracción en un ICP-MS	104
Figura C.2. Esquema del ICP-MS de alta resolución o doble enfoque con geometría de Nier-Johnson inversa	105
Figura C.3. Esquema del equipo de ICP-MS Thermo Fisher X series II	108
Figura C.4. Esquema del equipo de ICP-MS Agilent 7500ce	108
Figura C.5. Representación de la Absorbancia frente al tiempo (A) para una serie de estándares de actividad creciente (B), obtenidos mediante el ensayo del Pirogalol	123
Figura C.6. Representación de la Abs min^{-1} frente a la actividad teórica (U mL^{-1}) para varias diluciones de un estándar de Cu, Zn-SOD	124
Figura C.7. Representación del rango lineal de la Abs min^{-1} frente a la actividad teórica (U mL^{-1}) para varias diluciones de un estándar de Cu, Zn-SOD	124
Figura C.8. Representación del % de Inhibición del pyrogallol frente a la actividad teórica (U mL^{-1}) para varias diluciones de un estándar de Cu, Zn-SOD	125
Figura C.9. Montaje instrumental empleado para llevar a cabo la cuantificación de Cu mediante dilución isotópica post-columna	140
Figura C.10. Cromatograma obtenido de la separación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos mediante dilución isotópica post-columna, utilizando una disolución enriquecida en el isótopo ^{65}Cu como trazador	143

Figura C.11. Cromatograma de flujo másico obtenido de la separación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos mediante dilución isotópica post-columna	144
Figura C.12. Cromatograma obtenido mediante HPLC-ORS-ICP-MS de la mezcla de ⁶⁵ Cu, ⁶⁸ Zn-SOD isotópicamente enriquecido con la Cu,Zn-SOD extraída de los glóbulos rojos de sangre de vaca	146
Figura D.1.1 Curvas resultantes de la optimización del flujo de He en la celda para el isótopo ⁵² Cr ([Cr] = 1 µg L ⁻¹). Traza negra (analito), traza gris (fondo) y traza roja (LDE).....	159
Figura D.2.1 Estructura de la transferrina diférrica (saturada) mostrándose los dos dominios correspondientes al C- y al N- terminales respectivamente. .	174
Figura D.2.2. Sialoformas más comunes de la transferrina	175

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla A.I. Metales y aleaciones metálicas implantables 15

Tabla A.II. Niveles de Co, Cr y Ti en muestras de sangre de personas portadoras de prótesis articulares de cadera M/M mediante ETAAS..... 37

Tabla A.III. Niveles de Co, Cr y Ti en muestras de sangre de personas portadoras de prótesis articulares de cadera M/M mediante ICP-MS 41

Tabla A.IV. Principales características de las SODs 68

Tabla C.I. Principales interferencias espectrales que afectan al Co, Cr, Mn y Ti así como la resolución necesaria para poder separarlas 106

Tabla C.II. Parámetros instrumentales empleados en el análisis por MALDI-TOF-MS de Cu,Zn-SOD intacta (A), de las principales proteínas transportadores de Cr, Co, Mn y Ti en suero (B) y para el mapeo peptídico (C) 110

Tabla C.III. Programa de microondas utilizado para la digestión de las muestras de sangre..... 120

Tabla C.IV. Abundancias isotópicas y concentraciones del Ti enriquecido isotópicamente, obtenido mediante dilución isotópica inversa 138

Tabla C.V. Abundancias isotópicas y concentraciones del Cu y Zn enriquecidos isotópicamente obtenido mediante dilución isotópica inversa ... 142

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAOS	<i>American Academy of Orthopaedic Surgeons</i>
ACN	<i>Acetonitrilo/ Acetonitrile</i>
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ASTM	<i>American Society of Testing and Materials</i>
AE	<i>Intercambio aniónico/ Anion Exchange</i>
AEDT	<i>Ácido etilendiaminotetracético/ Ethilenediaminetetraacetic acid</i>
BSA	<i>Albúmina de suero bovino/ Bovine serum albumin</i>
CAT	<i>Catalasa/ Catalase</i>
CDT	<i>Transferrina deficiente de carbohidratos/ Carbohydrate deficient transferrin</i>
CE	<i>Electroforesis capilar/ Capilar Electrophoresis</i>
CG	<i>Cromatografía de gases/ Gas Chromatography</i>
CHCA	<i>Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico/ α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
CitC	<i>Citocromo c/ Cytochrome c</i>
Cps	<i>Cuentas por Segundo/ Counts per Second</i>
Cu,Zn-SOD	<i>Cobre, zinc-superóxido dismutasa / Copper, zinc-superoxide dimutase</i>
CZE	<i>Electroforesis capilar en zona/ Capillary Zone Electrophoresis</i>
Da	<i>Dalton/ Dalton</i>
DHB	<i>Ácido 2,5-dihidroxibenzoico/ 2,5-dihydroxybenzoic acid</i>
DTPA	<i>Ácido dietilen triamino pentaacético/ dyethylene triamine pentaacetic acid</i>
DTT	<i>Ditiotreitól/ Dithiothreitol</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ETAAS	<i>Espectrometría de absorción atómica con vaporización electrotérmica/ Electrothermal atomic absorption spectrometry</i>
ESI-MS	<i>Espectrometría de masas mediante ionización por electrospray/ Electrospray ionization mass spectrometry</i>

ÍNDICE

GD	Descarga luminiscente / <i>Glow discharge</i>
GE	Electroforesis en gel/ <i>Gel electrophoresis</i>
GPx	Glutation peroxidasa/ <i>Glutathione peroxidase</i>
GR	Glutation reductasa/ <i>Glutathione reductase</i>
GSH	Glutation oxidado/ <i>Oxidized glutathione</i>
GSS	Glutation disulfuro/ <i>Glutathione disulfide</i>
HSA	Albúmina de suero bovino/ <i>Bovine serum albumin</i>
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución/ <i>High resolution liquid chromatography</i>
ICP-MS	Espectrometría de masas elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo/ <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-DRC-MS	ICP-MS con celda de colisión-reacción / <i>Dynamic reaction cell ICP-MS</i>
ICP-ORS-MS	ICP-MS con sistema octapolo de reacción/ <i>ICP-MS provided by an octapole reaction system</i>
HR-ICP-MS/ ICP-DF-MS	ICP-MS de alta resolución o doble enfoque/ <i>High resolution ICP-MS or double-focusing ICP-MS</i>
IARC	<i>International Agency for Research into Cáncer</i>
i.d.	Diámetro interno/ <i>inner diameter</i>
ID	Dilución isotópica/ <i>Isotope Dilution</i>
IDA	Análisis de dilución isotópica/ <i>Isotope Dilution Analysis</i>
L	Bajo contenido en carbono/ <i>Low content carbon</i>
LD	Límite de detección/ <i>Detection limit</i>
LC	Cromatografía líquida/ <i>Liquid Chromatography</i>
M/M	Metal sobre Metal/ <i>Metal-on-metal</i>
MALDI	Desorción/Ionización con Láser asistida por matriz/ <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MC	Multicolector/ <i>Multicollector</i>

MEKC	Cromatografía electrocinética capilar micelar / <i>Micellar electrokinetic capillary chromatography</i>
MELISA	<i>Memory Lymphocyte-Immuno-Stimulation Assay</i>
MIP	Plasma inducido por microondas/ <i>Microwave induced plasma</i>
M/P	Metal sobre polietileno/ <i>Metal-on-polyethylene</i>
MS	Espectrometría de masas/ <i>Mass spectrometry</i>
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido Fosfato/ <i>Nicatinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrogeno fosfato/ <i>Nicatinamide adenine dinucleotide hydrogen phosphate</i>
Neu	Neuraminidasa/ <i>Neuraminidase</i>
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
o.d.	Diámetro Externo/ <i>Outer Diameter</i>
ORS	Sistema de Octapolo de Reacción/ <i>Octapole Reaction System</i>
pI	Punto isoeléctrico/ <i>Isoelectric point</i>
ppb	Partes por billón / <i>Parts per billion</i>
ppm	Partes por millón/ <i>Parts per million</i>
Q	Cuadrupo/ <i>Quadrupole</i>
RPLC	Cromatografía líquida de fase reversa/ <i>Reverse phase liquid chromatography</i>
RSD	Desviación estándar relativa/ <i>Relative Standard Deviation</i>
SA	Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico o ácido sinapínico/ <i>3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid or sinapinic acid</i>
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños/ <i>Size eExclusion cChromatography</i>
SEM	Multiplicador de electrones secundarios/ <i>Secondary electron multiplier</i>
UV	Ultravioleta/ <i>Ultraviolet</i>
TOF	Tiempo de vuelo/ <i>Time of flight</i>
Tf	Transferrina/ <i>Transferrin</i>

ÍNDICE

TFA	Ácido trifluoroacético/ <i>Trifluoroacetic acid</i>
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano/ <i>Tris hydroximethyl aminomethane</i>
u	Unidades de masa/ <i>Mass units</i>
1-D	Electroforesis en gel en una dimensión/ <i>one-dimensional gel electrophoresis</i>
2-D	Electroforesis en gel en dos dimensiones/ <i>two-dimensional gel electrophoresis</i>

A. INTRODUCCIÓN

A.1 PRÓTESIS O IMPLANTES

Las prótesis o implantes son dispositivos artificiales utilizados para mejorar o sustituir (total o parcialmente), una estructura (tejido, órgano, etc.) o una función fisiológica del cuerpo humano. Por tanto, el término es muy amplio ya que abarca desde dientes postizos hasta dispositivos que reemplazan una articulación (codo, rodilla, cadera, hombro) o un miembro completo (mano, pie, brazo, pierna) del cuerpo, pasando por bandas gástricas, válvulas de corazón, etc.

Ya han pasado muchos años desde la primera prótesis conocida de la historia, un pie artificial hecho de madera y cuero (actualmente se exhibe en el museo del Cairo, Egipto) que se estima fue fabricado entre los años 1000 y 600 a.C. Desde entonces, se han realizado muchas investigaciones, tanto en el campo de la medicina, como en el de la ingeniería, la química y otras muchas disciplinas científicas, con el fin de desarrollar prótesis de materiales adecuados y para muy diversos fines [1]. Estas investigaciones, han sido particularmente importantes en las últimas dos décadas, entre otras razones, debido a que las prótesis son cada vez más necesarias como consecuencia del aumento de las expectativas de vida. Hoy en día, una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco y que el número de los que tienen unos 80 años se multiplicará por cinco. Esta longevidad masiva tiene implicaciones sociales relacionadas con mantener la calidad de vida, que ha potenciado la investigación en este campo. Si a este hecho se le añade la mejora de las técnicas quirúrgicas, se puede entender el crecimiento acelerado en el desarrollo y la utilización de prótesis. Así, en la actualidad, se estima que más de cincuenta millones de personas en todo el mundo utilizan algún tipo de prótesis, y, como se muestra en la Figura A.1, existen dispositivos para implantar en prácticamente todos los sistemas del cuerpo humano:

A. INTRODUCCIÓN

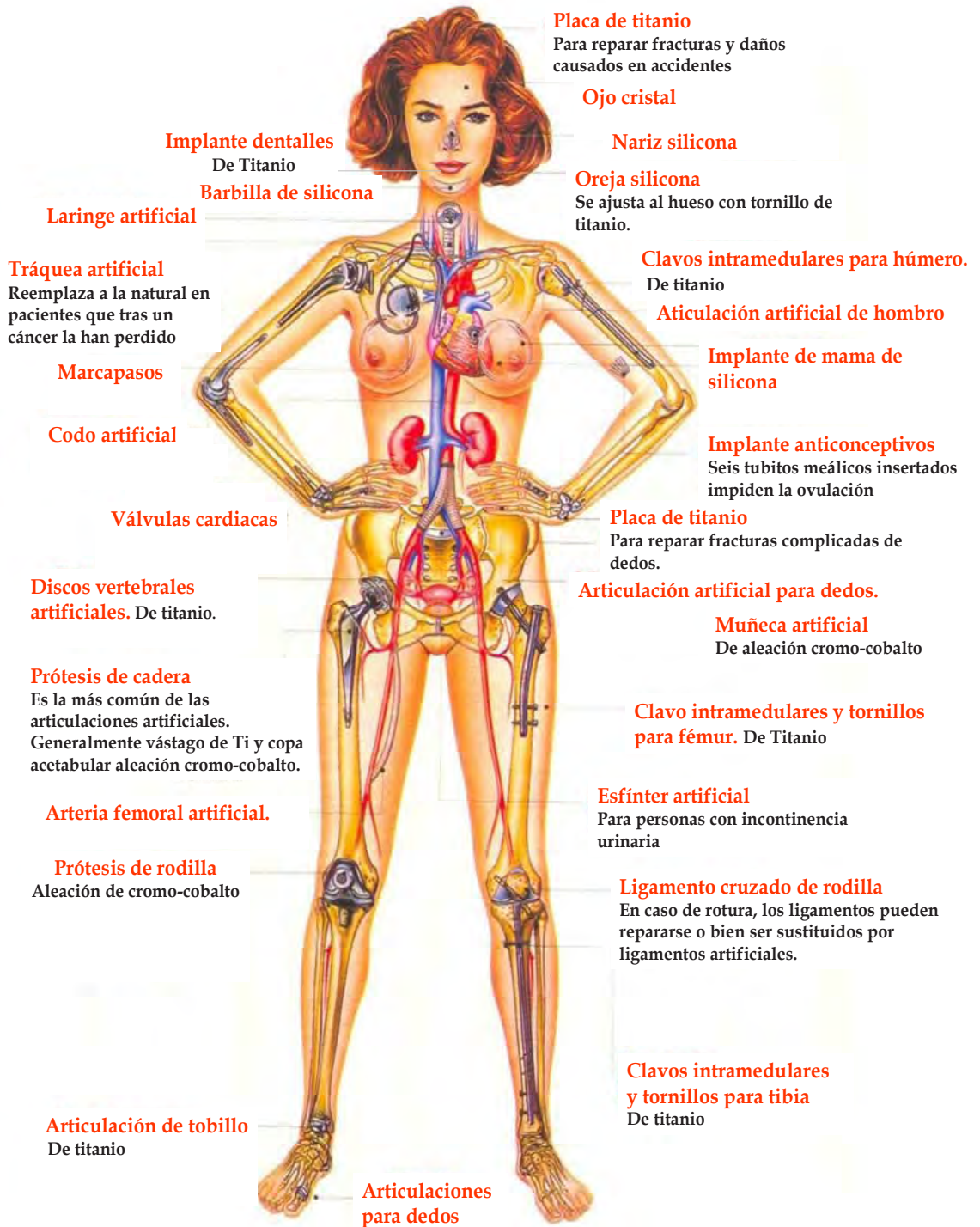


Figura A.1. Representación de algunos de los dispositivos que pueden ser implantados en el cuerpo humano

- En el sistema esquelético muscular: para articulaciones en las extremidades superiores e inferiores (hombros, dedos, rodillas, caderas, etc.) o como miembros artificiales permanentes.
- En el sistema cardiovascular: corazón (válvula, pared, marcapasos, corazón entero), arterias y venas.
- En el sistema respiratorio: laringe, tráquea, bronquios, diafragma, pulmones y caja torácica.
- En el sistema digestivo: esófago, conductos biliares e hígado.
- En el sistema genitourinario: riñones, uréter, uretra y vejiga.
- En el sistema nervioso.
- En los sentidos: oídos y ojos (lentes y prótesis de córneas).
- Implantes cosméticos: maxilofaciales (nariz, oreja, mandíbula, dientes), de pechos, de testículos, de pene, etc.

Entre los implantes más utilizados se encuentran: los ortopédicos (prótesis articulares e implantes para osteosíntesis) y los dentales, de los cuales hablaremos a continuación.

A.1.1 Prótesis articular de cadera

Las prótesis articulares son dispositivos artificiales utilizados para reemplazar una articulación dañada y cumplir su función. Por tanto, están indicadas para el tratamiento de enfermedades que afectan a dichas articulaciones (haciendo que pierdan su capacidad de movimiento), como son: la osteoartritis (*artrosis*), enfermedad degenerativa que puede causar la desintegración del cartílago de la articulación y del hueso adyacente (Figura A.2); la *artritis reumatoide*, enfermedad reumática que produce inflamación de la membrana sinovial causando dolor y rigidez; y la *artritis traumática*, que produce daños en el cartílago articular por una lesión. Estas enfermedades, afectan a todas las poblaciones y aunque se estima que las $\frac{3}{4}$ partes de la

A. INTRODUCCIÓN

población que la padece son mujeres, no parece estar afectada por factores geográficos. Además, especialmente la artrosis, aumentan con la edad, así se considera que afecta al 85% de la población anciana e invalida al 10% de mayores de 60 años [2].

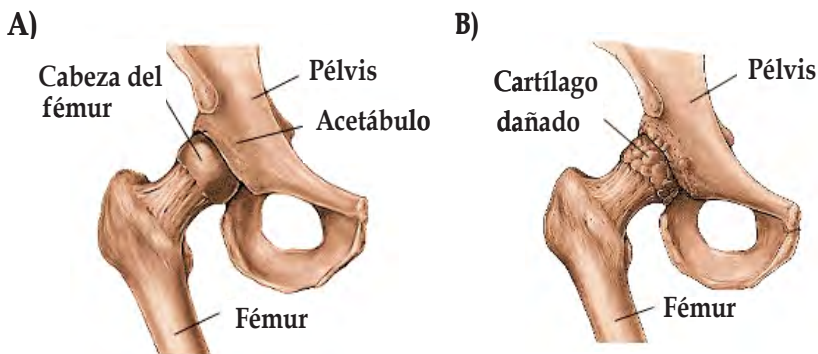


Figura A.2. Comparación entre una cadera: A) sana y B) con artrosis

La operación quirúrgica de implantación de una prótesis articular se denomina *artroplastia* y, en la actualidad, dado el envejecimiento general de la población, forma parte del grupo de intervenciones que más frecuentemente se realizan en los servicios de cirugía ortopédica de los hospitales [3]. De manera que cada año, se efectúan alrededor de 550.000 artroplastias de cadera sólo en Europa [4]. En España todos los años 35.000 pacientes se someten a una intervención para implantarles una artroplastia de cadera y 20.000 de rodilla [5].

La introducción de la artroplastia como una técnica quirúrgica habitual tuvo lugar en el último tercio del siglo XX gracias a los trabajos de Sir John Charnley (cirujano ortopédico inglés), que con la colaboración de un equipo de ingenieros, diseñó en los años setenta una prótesis articular de cadera que presentó excelentes resultados, por lo que todavía hoy se utiliza como patrón de referencia para la elaboración de los nuevos modelos de prótesis (que han ido surgiendo en estos 40 años). Más tarde, aparecieron las prótesis de rodilla, seguidas de las de hombro, codo y dedos de las manos, todas ellas menos frecuentes que las de cadera.

La articulación de la cadera está formada por la parte superior del fémur (cabeza femoral) que se articula en una cavidad situada en la pelvis denominada acetábulo (ver Figura A.2). La artroplastia de cadera implica la sustitución de todos los huesos de la misma por componentes artificiales. Por tanto, la prótesis total de cadera consta de: una *copa acetabular* que se fija a la pelvis y sirve de asiento a una esfera (*cabeza femoral*), cuyo vástago (*tallo femoral*) es incrustado en el fémur (Figura A.3).

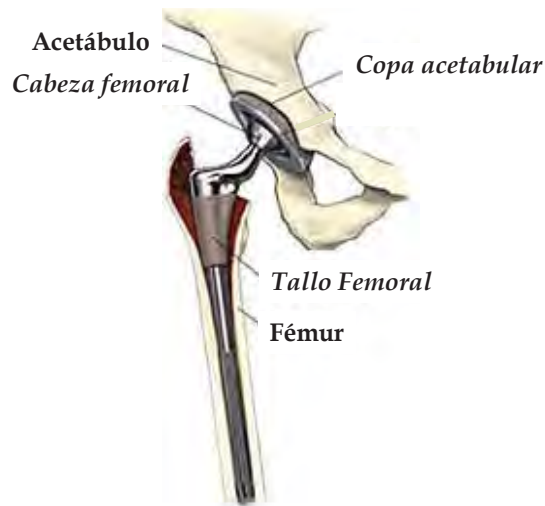


Figura A.3. Componentes de una prótesis total de cadera

Aunque hoy en día los resultados de las artroplastias de cadera son excelentes (90-95% de los pacientes pueden hacer vida normal y sin dolor durante 10 años después de la operación), existen dos problemas importante aún sin resolver y que pueden hacer fracasar la artroplastia con el paso de los años. Por una parte, la dificultad de fijación de los componentes de la prótesis al hueso y, por otra parte, los problemas causados por los productos liberados como consecuencia de la degradación de los materiales con los que están fabricados dichos componentes (como se comentará más adelante).

A.1.2. Implantes para osteosíntesis

La osteosíntesis es un tratamiento quirúrgico de fracturas, consistente en la unión de los fragmentos de hueso roto mediante dispositivos mecánicos de fijación interna (tornillos, placas, clavos, etc.), temporales o permanentes.

La técnica se desarrolló para reducir y fijar de forma estable fracturas de huesos largos (húmero, cubito/radio, fémur y tibia/peroné). Estas fracturas se estabilizan, normalmente, mediante el tratamiento conservador o externo con yeso. Sin embargo, si tras la fractura los huesos no están correctamente alineados, se pueden alterar las condiciones de carga de las articulaciones adyacentes lo que podría acelerar el desarrollo de artrosis postraumática, siendo entonces necesario recurrir a la osteosíntesis para tratar la fractura.

Las fracturas de huesos largos son muy comunes; tanto en gente joven, debido a accidentes de tráfico o a lesiones deportivas; como en gente mayor, asociadas con problemas de osteoporosis, enfermedad que afecta a más de 200 millones de personas en todo el planeta [6,7]. En España esta enfermedad afecta a un 35% de mujeres mayores de 50 años y cada año se producen más de 100.000 fracturas osteoporóticas. De ahí, que en la actualidad, la osteosíntesis sea un procedimiento quirúrgico muy utilizado.

Existen, fundamentalmente, dos tipos de implantes para osteosíntesis: *implantes intramedulares* e *implantes extramedulares*.

- *Los implantes intramedulares* son clavos que se introducen a lo largo de la cavidad interna (médula) del hueso desde un extremo y son fijados al mismo mediante tornillos [8] (ver Figura A.4).

Los principios biomecánicos del enclavado intramedular fueron establecidos de manera independiente por los hermanos Rush en Rochester (Minnesota, USA) [9] y Gerhard Küntscher en Hamburgo (Alemania) [10], a principios de los años treinta; sin embargo, la técnica se hizo popular gracias a los trabajos de Kempf y Grosse en los años sesenta [11], que aumentaron la

estabilidad mecánica del clavo intramedular, hasta llegar a los que se utilizan actualmente.

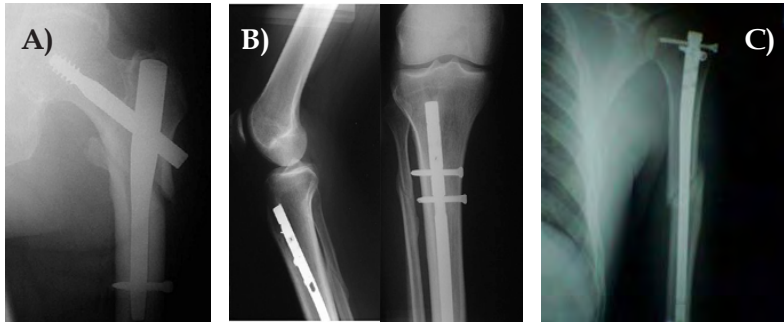


Figura A.4. Radiografías de implantes intramedulares colocados en: A) fémur, B) tibia y C) húmero

La osteosíntesis mediante clavos intramedulares es flexible, ya que durante la curación de la fractura los fragmentos óseos sufren pequeños movimientos de compresión y distracción que pueden ser beneficiosos para la consolidación (proceso biológico de creación de nuevo tejido óseo) de la fractura [12]. Además, la colocación de los clavos intramedulares requiere una operación poco invasiva [13,14]. Sin embargo, también posee algunas desventajas como son: su inestabilidad mecánica (que puede conllevar inestabilidad rotacional), excesiva deformación de la fractura y reducción de la longitud del hueso [15]. Además, al estar insertados en la médula del hueso, los implantes están continuamente en contacto con el torrente sanguíneo, lo que hace que pueda producirse una mayor degradación del material metálico del que están fabricados (debido a fenómenos de corrosión que se detallarán más adelante) que pueden dar lugar a reacciones adversas [16].

- *Los implantes extramedulares* son placas que se fijan a la parte externa del hueso mediante varios tornillos de anclaje (ver Figura A.5). Las placas no deben comprometer más de la tercera parte del diámetro del hueso.

A. INTRODUCCIÓN

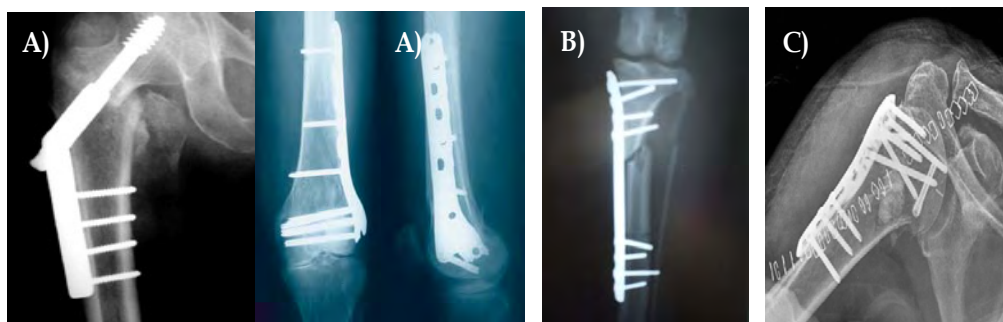


Figura A.5. Radiografías de implantes extramedulares colocados en: A) fémur, B) tibia y C) húmero

Arbuthnot Lane y Albin Lambotte (1905) [17,18] son considerados como los pioneros de esta técnica, que fue desarrollada por Sherman y Pauwels (1935) [19,20] y popularizada en los años cincuenta gracias a los trabajos de un grupo de cirujanos suizos que creó la “Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen” (Asociación para la Osteosíntesis). Esta asociación estableció los conceptos básicos de la osteosíntesis con placas y la difundió mundialmente [21].

Las placas de osteosíntesis, a diferencia de los clavos intramedulares, ofrecen una fijación interna rígida y, por lo tanto, muy estable de las fracturas; ya que se ponen en contacto los extremos óseos (sin espacios intrafragmentarios), lo que permite la formación directa del hueso [22]. Sin embargo, esta cicatrización ósea directa no es muy fuerte y existe un riesgo de fractura del hueso después de la extracción del implante [23]. Otra desventaja, es que la colocación de la placa requiere realizar una incisión en la piel muy grande que puede dar lugar a daños en el periostio y los músculos alrededor de la fractura. Además, la aplicación de la placa sobre el hueso interfiere con la vascularización local, lo que puede causar osteonecrosis debajo del implante, retraso en la cicatrización e incluso pseudoartrosis [24]. Sin olvidar que no pueden ser utilizadas en pacientes jóvenes durante la fase de crecimiento ya que impide el crecimiento normal del hueso.

A.1.3. Implantes dentales oseointegrados

Un implante dental es un dispositivo en forma de cono o cilindro de titanio, con rosca externa o liso, que se introduce en el hueso maxilar con el fin de sustituir la raíz de una pieza dental perdida (ver Figura A.6). Tras su colocación, el implante se une al hueso por un proceso biológico denominado oseointegración, y sirve de soporte a una corona dental con características similares a la de los dientes naturales (ver Figura A.6).

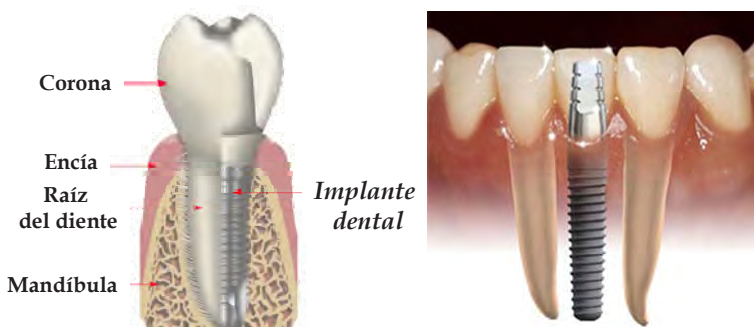


Figura A.6. Implante dental

La historia de los implantes odontológicos comenzó a mediados del siglo XX, cuando el científico sueco Per-Ingvar Branemark [25], descubrió la capacidad del titanio para adherirse firmemente al tejido óseo. Se estableció así, el término de oseointegración [26], el cual se ha incorporado de forma sólida y permanente al lenguaje médico. Este descubrimiento llevó al profesor Branemark al desarrollo en 1965 de un sistema para sujetar prótesis dentales sobre mandíbulas de personas que habían perdido todos sus dientes. Después del descubrimiento de la oseointegración y el sistema de implantes de Branemark, muchos otros laboratorios comenzaron a fabricar sus propias versiones de implantes de titanio. Todo esto contribuyó al desarrollo de la implantología oral, de manera que, hoy en día, el uso de implantes oseointegrados es la mejor manera de reemplazar dientes perdidos, cualquiera que sea su causa.

A. INTRODUCCIÓN

A pesar de que, actualmente, el índice de éxito es aproximadamente del 98%, los principales problemas que surgen tras realizar un implante dental están relacionados con la falta de oseointegración entre el implante y el hueso. Esta falta de oseointegración puede ser debida; a una insuficiente masa ósea, una infección durante la cirugía, una mala higiene bucal tras la cirugía o que el paciente sea fumador, lo que produce una disminución del flujo sanguíneo en el tejido adyacente al implante [27]. Además, la presencia de partículas metálicas en los tejidos circundantes (liberadas por parte de los implantes), puede incrementar de manera importante la respuesta inflamatoria en el tejido gingival, aunada a la respuesta dada por la presencia de placa dentobacteriana, que dará lugar al aflojamiento del implante [28,29].

A.1.4 Materiales para la fabricación de implantes ortopédicos y dentales

Los implantes o prótesis deben ser diseñados y fabricados de manera que no produzcan ningún daño en el organismo y aporten las prestaciones específicas que requiera la aplicación a la que vayan destinados, p.ej. en el caso de las prótesis articulares tienen que permitir una movilidad similar a la previa de la articulación.

El cuerpo humano está constituido por una estructura ósea rígida (el esqueleto), siendo éste el soporte mecánico de los tejidos blandos: músculos, piel, mucosas; y, por supuesto, los órganos: corazón, hígado, páncreas, pulmones, etc. Entre todos estos elementos, así como en el interior de ellos, se encuentran o circulan numerosos fluidos corporales (sangre, jugos gástricos, saliva, orina, etc.). Por tanto, en el cuerpo humano los implantes ortopédicos y dentales están en contacto con los diferentes tejidos vivos y fluidos corporales que los rodean. Estos fluidos biológicos son altamente agresivos; el fluido extracelular (entre los que se incluye el plasma sanguíneo), localizado entre los diferentes tejidos, es una solución acuosa salina, con conductividad eléctrica, pH 7,4 y temperatura de 37 °C, que contiene 1% de cloruro de sodio y

cantidades menores de otras sales y compuestos orgánicos; y la saliva, es una solución acuosa compuesta por varias sales orgánicas e inorgánicas, ácidos orgánicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, con una concentración total de 5 g L⁻¹ y un pH de 7,0. De manera, que la interacción de los implantes con estos fluidos puede dar lugar a efectos adversos de diferentes tipos dependiendo de la naturaleza del material implantado. Por ello, estos implantes deben ser fabricados con materiales que cumplan unas características muy estrictas y específicas denominados **biomateriales**.

El término biomaterial designa a aquel material, natural o sintético, utilizado para la fabricación de dispositivos diseñados para interactuar con los sistemas biológicos durante un cierto tiempo [30]. El proceso de manufactura y las propiedades químicas, física y mecánicas de un biomaterial varían de acuerdo a la aplicación a la que vayan destinados, la única condición indispensable que debe cumplir es la de ser **biocompatible**.

La biocompatibilidad de un biomaterial puede ser definida como su capacidad para ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del huésped [31], es decir, la capacidad de existir en armonía con el ambiente biológico circundante. Por tanto, no es una característica intrínseca de un material, ya que depende no sólo de su naturaleza, sino también de la naturaleza, grado, frecuencia y duración de la exposición del material al sistema biológico. Además, no se debe confundir material biocompatible con inerte, ya que ningún material puede ser verdaderamente inerte en un medio tan agresivo como el cuerpo humano (incluso el oro ha demostrado ser reactivo *in vivo*). En general, la biocompatibilidad de un material se determina basándose en la citotoxicidad localizada, la respuesta sistémica, la alergenicidad y la carcinogenicidad [32] y debe cumplir con los siguientes criterios: no ser dañino para los tejidos con los que está en contacto; no contener sustancias tóxicas que se puedan difundir, liberar y absorber en el sistema circulatorio para causar respuesta tóxica sistémica; debe estar libre de agentes

A. INTRODUCCIÓN

sensibilizantes que puedan llegar a causar respuestas alérgicas; y no tener potencial carcinogénico.

Los biomateriales para la fabricación de implantes ortopédicos y dentales además de ser biocompatibles, tienen que tener unas propiedades químicas adecuadas para no degradarse fácilmente en el medio biológico agresivo con el que están en contacto (los fluidos extracelulares del cuerpo humano) que, como ya se comentó, son un medio electrolítico que contiene iones cloruro y oxígeno disuelto que facilita que se puedan producir fenómenos de corrosión. También, deben poseer unas propiedades físicas y mecánicas (resistencia, dureza, ductibilidad, etc.) compatibles con su función en el cuerpo humano; ya que estas prótesis además de estar en un medio biológico agresivo están en un medio dinámico (el sistema músculo-esqueleto), que junto con el movimiento hace que las prótesis estén sujetas a esfuerzos y tensiones considerables. Por ello, los biomateriales deberán poseer, entre otras propiedades: una buena resistencia mecánica, un tiempo de fatiga (rotura de un material bajo la acción de fuerzas cíclicas) largo, un bajo coeficiente de fricción y una densidad y un peso adecuados. Finalmente, el biomaterial deberá ser relativamente barato y fácil de fabricar, para su producción a gran escala.

Existen diferentes tipos de biomateriales que se pueden clasificar, según su composición química, en:

- a) Biomateriales inorgánicos metálicos (metales y aleaciones metálicas).
- b) Biomateriales inorgánicos no metálicos (cerámicos).
- c) Biomateriales orgánicos (plásticos o polímeros).

De todos ellos, los que presentan propiedades químicas, físicas y mecánicas más adecuadas para su utilización en la fabricación de implantes son los materiales metálicos, que se recogen en la Tabla A.I.

Tabla A.I. Metales y aleaciones metálicas implantables

MATERIAL	COMPOSICIÓN	PROCESO DE MANUFACTURA
Acero Inoxidable Austenítico : AISI 316 AISI 316L	Fe-18Cr-14Ni-2Mn-2,5Mo	Forjado
	Fe-18Cr-14Ni-2Mn-2,5Mo	Forjado
Aleaciones de Cobalto-Cromo: ASTM F75 ASTM F90 ASTM F799 ASTM F562	Co-28Cr-6Mo-0,5Ni-1Mn	Colado
	Co-20Cr-15W-10Ni	Pulvimetalurgia
	Co-28Cr-6Mo-0,5Ni	Forjado
	Co-35Ni-20Cr-6Mo	Trabajado en frío
Titanio comercialmente puro (cpTi): ASTM F67	Ti >99,9%	Forjado
Aleaciones de Titanio: ASTM F136 ASTM F1295 ASTM F1813 ASTM F1713	Ti-6Al-4V	Forjado
	Ti-6Al-7Nb	Forjado
	Ti-12Mo-6Zr-2Fe	Forjado
	Ti-13Nb-13Zr	Forjado

ASTM: American Society of Testing and Materials; **AISI:** American Iron and Steel Institute; **L:** Bajo contenido en carbono (disminuye la susceptibilidad ante los mecanismos de corrosión)

Como se puede observar en la Tabla A.I, los materiales más utilizados son el acero inoxidable, las aleaciones de cobalto-cromo, el titanio puro y las aleaciones de titanio. Las composiciones químicas, las microestructuras y las propiedades mecánicas de estas aleaciones están descritas en normas nacionales e internacionales, p.ej. de la American Society of Testing and Materials (ASTM) o de la American Iron and Steel Institute (AISI), para asegurar unas especificaciones mínimas y, de esta manera, garantizar un buen comportamiento a largo plazo. Así, la designación p.ej. de acero inoxidable “AISI 316” indica que dicho acero cumple la normativa 316 de la AISI.

Los aceros inoxidables son una gama de aleaciones de hierro y carbono (menos del 2%) que contienen un mínimo de 11% de cromo para hacerlos resistentes a la corrosión. Los más utilizados para la fabricación de implantes

A. INTRODUCCIÓN

son los aceros inoxidable austeníticos, los cuales se obtienen agregando níquel a la aleación, con lo que su estructura cristalina se transforma en austenita (de ahí el nombre), aumentando la tenacidad del material. Los tipos más comunes son el AISI 316 (16-18% Cr, 10-14% Ni y 2-3% Mo) que contiene molibdeno para aumentar la resistencia a la corrosión, especialmente en entornos que contienen cloruros, y el AISI 316L que es el resultado de reducir el contenido en carbono del acero inoxidable 316 del 0,08% al 0,03%, para obtener mejor resistencia a la corrosión. Estos aceros inoxidable, se han utilizado durante mucho tiempo para la fabricación de los diferentes componentes de las prótesis de cadera y para implantes de osteosíntesis (placas, tornillos, clavos), debido a su bajo coste y a su maleabilidad y ductilidad, lo que facilita su mecanización. Sin embargo, su uso ha decrecido enormemente en los últimos años, debido, principalmente, a que presentan menor resistencia a la corrosión que las aleaciones de cobalto-cromo y de titanio.

El titanio comercialmente puro (cp) se presenta en 4 tipos o grados normalizados para implantes quirúrgicos, dependiendo del contenido de elementos intersticiales (nitrógeno, carbono, oxígeno, hidrógeno y hierro). Dicho contenido de elementos intersticiales controla las propiedades mecánicas del material. A mayor cantidad de elementos intersticiales el grado aumenta, es decir, el grado 1 es el más puro (más de 99,5% Ti) y el grado 4 es el que contiene mayor cantidad de impurezas (98,9% Ti) y el que presenta, por tanto, mejor resistencia mecánica. El titanio cp grado 1 (designado como F67 de acuerdo con la normativa ASTM), es el material más utilizado para implantes dentales, ya que presenta una excelente biocompatibilidad, gran resistencia a la corrosión y capacidad de oseointegración (haciendo posible el crecimiento del hueso en el interior de los poros del material), lo cual no ocurre con el acero inoxidable o con las aleaciones de cobalto-cromo. Otra de las ventajas del titanio en aplicaciones biomédicas, es que su módulo de elasticidad es la mitad que el del acero inoxidable o el de las aleaciones de cobalto-cromo, aproximándose más al

del hueso, por lo que el titanio es más compatible elásticamente con el tejido natural que las otras dos aleaciones.

Además del titanio cp, también se utilizan diferentes *aleaciones de titanio* para la fabricación de implantes. La primera aleación utilizada fue la aleación ASTM F136 (90% Ti, 6% Al y 4% V), en la que la presencia de aluminio y vanadio mejora las propiedades mecánicas y aumenta su resistencia a la fatiga con respecto al titanio cp, manteniendo una gran resistencia a la corrosión y un módulo elástico bajo. Estas propiedades hacen que sea muy utilizada en implantes ortopédicos, fundamentalmente para osteosíntesis [33]. Sin embargo, no presenta una buena resistencia al desgaste por fricción, pudiendo presentar desgaste incluso con el rozamiento contra los tejidos blandos. Por este motivo, en general, cuando se utiliza en prótesis articulares como las de cadera se suele combinar con otros materiales (como se verá más adelante), otro de los inconvenientes es su elevado coste. Por otro lado, se han observado efectos adversos producidos por la presencia de Al y V en el organismo procedentes de los implantes de la aleación ASTM F136, como toxicidad generada en los tejidos circundantes al implante por parte del V [34] y deficiencias en la mineralización del hueso, así como desórdenes neuronales causados por parte del Al [35,36], lo que ha llevado a los científicos a estudiar nuevas aleaciones de titanio en las que se sustituye el Al y/o el V por otros elementos como Nb, Mo, Zr y Fe [37] (ver Tabla A.I).

Las aleaciones de cobalto-cromo utilizadas como materiales implantables se pueden dividir en dos tipos: aleaciones Co-Cr-Mo, manufacturadas por colada (ASTM F75) o por forjado (ASTM F799) (el forjado mejora las propiedades mecánicas de la aleación) y las aleaciones Co-Ni-Cr-Mo manufacturadas mediante trabajo en frío (ASTM F562) [38]. En ambos casos, los dos elementos básicos de la aleación son el cobalto (65%) y el cromo (20-28%), el cual se añade para aumentar la resistencia a la corrosión. Además, la presencia de molibdeno, permite obtener un material con mayor resistencia mecánica después de moldear o forjar mientras que la presencia de níquel y el manufacturado en frío,

A. INTRODUCCIÓN

aumentan la resistencia a la fatiga y la tenacidad de la aleación. Asimismo, su uso clínico prolongado ha probado que estas aleaciones son excepcionales por su biocompatibilidad y tienen una mayor resistencia al desgaste que las aleaciones de titanio. Todas estas propiedades junto con su facilidad de fabricación y el amplio rango de aleaciones de Co-Cr disponibles, las hacen muy adecuadas para un gran número de aplicaciones ortopédicas, incluyendo todos los componentes metálicos de todos los reemplazos articulares.

De esta manera, en las primeras prótesis de cadera todos sus componentes (copa acetabular, cabeza femoral y tallo femoral) (Figura A.7) estaban fabricados con aleaciones de Co-Cr. Estas prótesis denominadas metal sobre metal (M/M) con diferentes diseños (el McKee-Farrar y el Ring en el Reino Unido, el Mueller-Huggler en Suiza y el Sivash en la Unión Soviética) fueron utilizadas ampliamente durante los años 60 [39,40].



Figura A.7. Fotografía de una prótesis de cadera M/M modelo McKee-Farrar

Sin embargo, en 1975, las prótesis M/M dejaron de utilizarse debido a la elevada frecuencia de aflojamiento temprano de las mismas [41] y fueron reemplazadas por prótesis de metal sobre polietileno (M/P) (Figura A.8) en las cuales el tallo femoral con cabeza femoral, ambos metálicos (de acero inoxidable o de aleación de titanio), se articula sobre una copa acetabular de polietileno de ultra-elevado peso molecular (UHMWPE) [42].



Figura A.8. Fotografía de una prótesis de cadera M/P

A pesar de los excelentes resultados proporcionados por este tipo de prótesis, a finales de los 80 se dieron numerosos casos de pacientes portadores de prótesis M/P con problemas de aflojamiento de las mismas debido a fenómenos de osteólisis (disolución del tejido óseo), producido por la elevada tasa de partículas de polietileno liberadas por el desgaste de la copa acetabular de dicho material [42]. Esto dio lugar a la re-introducción de las prótesis M/M en los quirófanos, denominadas en esta ocasión “*prótesis de nueva generación*” (Figura A.9) [43].

Estas prótesis M/M de nueva generación, están fabricadas al igual que en los años 60, con aleaciones de Co-Cr, pero con mejoras en cuanto al diseño. En estas prótesis (Figura A.9) la cabeza femoral es mucho más grande y la copa acetabular más delgada, lo que permite el autopulido del metal, haciendo que la fricción sea más suave. Otra ventaja, es que estas prótesis atraen más el agua lo que da lugar a que también se autolubriquen [44,45]. Así, se ha demostrado que esta nueva generación de prótesis M/M presentan una resistencia al desgaste 50 veces mayor que las prótesis M/P [46,47]. Por este motivo, estas prótesis M/M de nueva generación son más duraderas, por lo que son las más indicadas para pacientes jóvenes y más activos. Otra de las ventajas, es que con este tipo de prótesis existe la posibilidad de conservar más cantidad de hueso, ya que no es necesario extraer la cabeza y el cuello del fémur para fijar la prótesis, sino que la cabeza femoral de la prótesis se engasta directamente sobre

A. INTRODUCCIÓN

la cabeza del fémur, permitiendo que el propio hueso del paciente crezca y se adhiera a la prótesis dando lugar a una fijación más duradera. Además, la nueva tecnología permite que en caso de desgaste de la prótesis se puedan reemplazar los elementos desgastados, no teniendo que extraer la prótesis íntegramente.



Figura A.9. Fotografía de una prótesis de cadera M/M de nueva generación

A.1.5 Degradación de los implantes ortopédicos y dentales

Aunque los materiales metálicos que se utilizan en la fabricación de implantes ortopédicos y dentales (ver apartado anterior) se consideran altamente biocompatibles, esto no quiere decir que sean inertes; ya que una vez implantados en el cuerpo humano todos ellos se degradan con el tiempo en mayor o menor extensión. Esta degradación es indeseable por dos razones: porque disminuye la integridad estructural de los implantes, pudiendo llegar a perder su función; y porque da lugar a la liberación de residuos metálicos, que pueden provocar reacciones biológicas adversas en el paciente, tanto a nivel local como sistémico [16].

Los mecanismos por los cuales se puede producir el deterioro de un material metálico implantado se reducen básicamente a dos: *desgaste* mecánico y disolución electroquímica (*corrosión*); así como una combinación sinérgica de ambos procesos [48-50].

El *desgaste* mecánico se puede definir como la pérdida de material de una superficie sólida cuando se mueve con respecto a otra superficie sólida, con

la cual está en contacto [51]. Existen diferentes tipos de desgaste, entre los más importantes se encuentran:

- *Desgaste por adhesión o fricción*: se produce como resultado del rozamiento entre superficies en contacto.
- *Desgaste por abrasión*: es el resultado de la acción de corte o rayado de las superficies de fricción, debido a asperezas en dichas superficies o la presencia entre ellas de partículas de alta dureza (abrasivas).
- *Desgaste por fatiga*: consecuencia de la deformación de las superficies de contacto por acción de tensiones (esfuerzos) variables y repetidas.

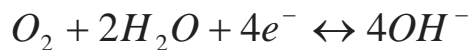
En el tipo y la magnitud del desgaste inciden una serie de factores como son: las condiciones de operación de las prótesis (carga aplicada, velocidad, tipos de movimiento, tipo de fricción, recorrido de fricción, tiempo de trabajo, etc.), las características de las superficies en contacto (material, composición química, dureza, dimensiones, forma, microgeometría superficial, microestructura, etc.) y las características del medio donde se encuentra la prótesis (carácter corrosivo, presencia de partículas abrasivas, propiedades de los lubricantes, etc.). Por tanto, es evidente que el desgaste es mucho más importante en las prótesis articulares y en los dispositivos tornillo-placa que en los implantes intramedulares de osteosíntesis o dentales.

El resultado del desgaste mecánico es la liberación de partículas metálicas al organismo. Así, se ha descrito que las prótesis M/M producen aproximadamente de $6,7 \times 10^{12}$ a $2,5 \times 10^{14}$ partículas por año [44], las cuales tienen un tamaño del orden de los nanómetros (20-90nm), con un tamaño medio de 50nm [52-54]. Estas partículas están presentes en el líquido sinovial y en los tejidos peri-protésicos (alrededor de la prótesis) y, además, en estudios *post-mortem*, también se han identificado, en los ganglios linfáticos, en el hígado y en el bazo de pacientes con artroplastias [55]. Dado el tamaño nanométrico de las partículas, todavía no se conoce el verdadero alcance de su difusión por

A. INTRODUCCIÓN

el organismo a través del sistema linfático y/o vascular (torrente sanguíneo) [56].

El otro mecanismo de degradación de los implantes ortopédicos y dentales es la *corrosión*, que se puede definir como la disolución de un metal por reacción electroquímica con su entorno [57]. Como ya se ha comentado, los fluidos corporales son disoluciones acuosas electrolíticas que contienen iones cloruro y oxígeno disuelto, por lo tanto, en este medio se produce en la superficie del material metálico implantado la siguiente reacción redox:



Con la consiguiente liberación de iones metálicos al organismo (Figura A.10).

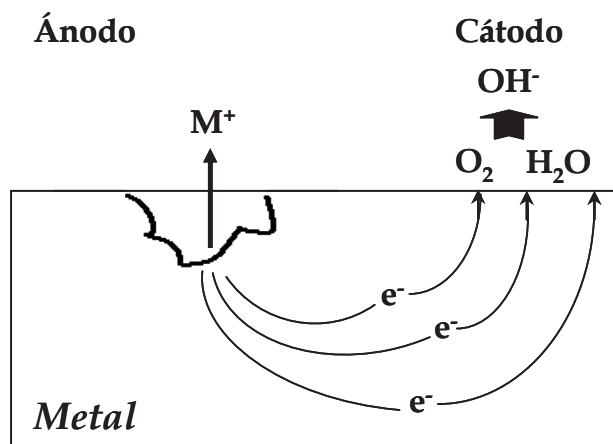


Figura A.10. Corrosión de un metal en condiciones fisiológicas

Este proceso de corrosión puede afectar uniformemente a toda la superficie del implante: *corrosión generalizada* y/o puede producirse solamente en áreas discretas o localizadas dando lugar a: la *corrosión por fisura*, cuando afecta a regiones del implante donde existen grietas o fisuras en las cuales los fluidos biológicos quedan estancados favoreciendo la corrosión; y la *corrosión por picadura*, cuando afecta a sitios puntuales, orificios de la

superficie del implante (aparentemente al azar), por los mismos motivos que la corrosión por fisura.

Existen dos características fundamentales que determinan cómo y por qué se corroe un determinado material metálico. La primera es la fuerza termodinámica (variación en la energía libre de Gibbs) que impulsa al proceso de corrosión (reacción redox) a producirse; la segunda, implica las barreras cinéticas que limitan la velocidad de dicha reacción. Así, los materiales metálicos utilizados en la fabricación de implantes ortopédicos y dentales deben su resistencia a la corrosión a la formación espontánea de una película superficial de óxido (pasivación del metal) que actúa como barrera cinética contra la corrosión [50].

En el caso concreto de las aleaciones de Co-Cr, la capa de pasivado está compuesta, fundamentalmente, por óxido de cromo (Cr_2O_3) [58,59] y, en el caso del Ti y sus aleaciones, por óxido de titanio (TiO_2) [60,61]. Esta capa de pasivado aísla la superficie del material metálico del contacto con el medio biológico corrosivo, disminuyendo la velocidad del proceso de corrosión. Para ello, debe de poseer ciertas características, como son: ser de naturaleza no porosa y cubrir toda la superficie del material metálico, tener una estructura atómica que limite la migración de los iones y electrones a través de la interfase que forma con la disolución y ser capaz de mantenerse estable en la superficie del material incluso bajo condiciones de tensión mecánica y/o de desgaste.

De acuerdo con la teoría del pasivado, en disolución acuosa existe un equilibrio de disolución/precipitación de la capa de óxido protectora de la superficie del material metálico pasivado (Figura A.11) [50,62].

Sin embargo, en el cuerpo humano (*in vivo*) existen varios factores que pueden alterar dicho equilibrio, originando un aumento de la velocidad de la disolución de la capa de pasivado respecto a la precipitación y produciendo, como consecuencia, la liberación de iones metálicos al medio [50,63-65]. En primer lugar, el material metálico una vez implantado se encuentra inmerso en

A. INTRODUCCIÓN

un medio altamente corrosivo (los fluidos extracelulares) en el que, además de oxígeno y cloruros, existen numerosos iones orgánicos e inorgánicos (fosfatos, citratos, óxidos, hidróxidos, etc.) y biomoléculas (proteínas y aminoácidos) que pueden reaccionar con los iones metálicos liberados formando productos solubles o insolubles. Todas estas especies químicas a su vez, también pueden modificar la capa de pasivado al depositarse sobre ella [48]. Esta alteración de la capa de pasivado *in vivo* da lugar, mediante mecanismos todavía desconocidos [66,67] a un aumento de la velocidad del proceso de disolución de la misma [48,68], que hace que la superficie metálica del implante quede expuesta al medio biológico corrosivo con la consiguiente liberación de iones metálicos (Figura A.11).

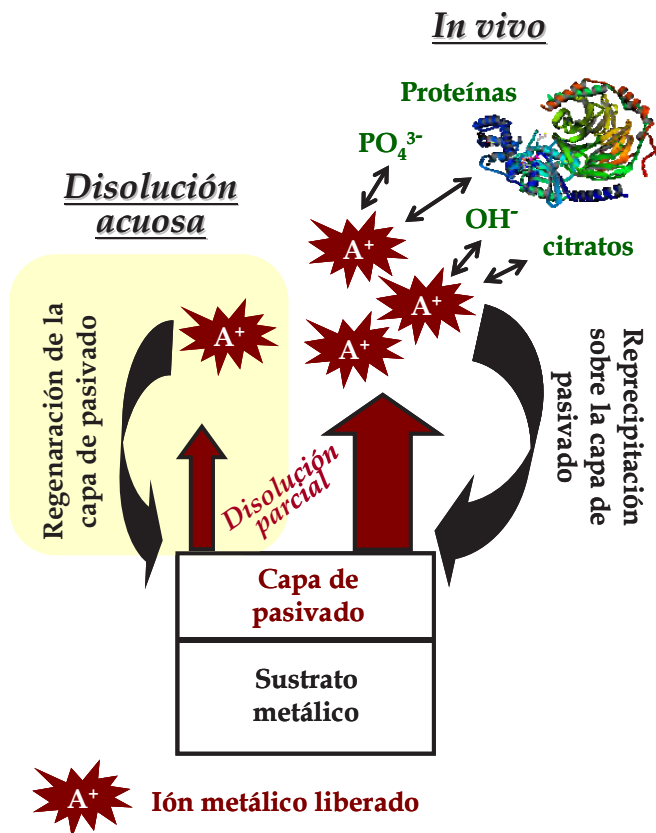
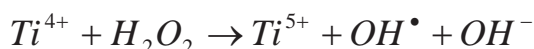


Figura A.11. Esquema de los procesos de disolución parcial y reprecipitación de la capa de pasivado de un material metálico (tanto en disolución acuosa como *in vivo*)

Estos iones metálicos unidos a las biomoléculas también podrán migrar a través del torrente sanguíneo desde el punto donde hubiesen sido liberados hacia otros tejidos del organismo, donde se podrán acumular o excretar, p.ej. por la orina [65].

En segundo lugar, otro proceso que favorece la corrosión de los materiales metálicos de las prótesis es consecuencia de que cualquier material introducido en el cuerpo humano es reconocido como un cuerpo extraño por los procesos inmunológicos, propiciando que los macrófagos (células del sistema inmunes responsables de fagocitar los cuerpos extraños que se introducen en el organismo) se unan a la superficie del material. La presencia de macrófagos puede llevar a la formación enzimática de H_2O_2 , que interacciona con la capa de pasivado oxidando aún más a los metales que la forman y favoreciendo así su disolución [69]. Por ejemplo, puede reaccionar con el titanio de la capa de óxido de acuerdo con la siguiente reacción [70]:



Finalmente, es necesario tener en cuenta que la capa de pasivado se altera físicamente (se rompe) incrementándose la corrosión, cuando los materiales implantados en el medio corrosivo se ven sometidos a tensiones (esfuerzos) mecánicas externas de tipo estático (*corrosión por estrés*) o cíclico (*corrosión por fatiga*); así como al desgaste mecánico (*corrosión por desgaste*), como ocurre en el caso de las prótesis ortopédicas y dentales [71]. Además, las partículas metálicas liberadas en el proceso de desgaste también se corroen y dado su pequeño tamaño (20-90 nm) [52] tienen un gran área superficial que hace que se corroan a gran velocidad [72].

Por tanto, está claro, que la corrosión de los implantes, al igual que el desgaste, es un proceso complejo que está influenciado por una gran variedad de factores, como son: el material del implante (composición química, microestructura, estado de la superficie, etc.), el ambiente biológico en la que

A. INTRODUCCIÓN

está inmerso (pH, temperatura, concentración de iones, contenido de oxígeno, presencia de proteínas, etc.), la química de los iones metálicos liberados; así como el diseño, manufactura (presencia de grietas, irregularidades, etc.) y función del implante. Los cambios en estas variables pueden tener una gran influencia sobre el modo y la tasa de iones metálicos liberados por corrosión.

De esta manera, se han detectado niveles elevados de metales procedentes de implantes en sangre, suero y orina [73-75] de personas portadoras de implantes metálicos, principalmente artroplastias.

A.1.6 Respuesta biológica a los residuos metálicos liberados de los implantes ortopédicos y dentales

Como se vio en el apartado anterior, el desgaste y/o la corrosión de los implantes ortopédicos y dentales da lugar a la liberación de residuos metálicos al organismo (partículas e iones) [76,77].

Sin embargo, la naturaleza exacta y el destino de estos productos metálicos así como los efectos locales o sistémicos que, a corto o largo plazo, produce la exposición a los mismos son aspectos todavía muy poco conocidos [78]. Estos efectos incluyen reacciones inflamatorias, pérdida de masa ósea (osteólisis), reacciones de hipersensibilidad, riesgo de mutagénesis, carcinogénesis y toxicidad [79-81]. Estos efectos dependen de factores como la cantidad de residuos producidos, su naturaleza, así como del tamaño y la forma de los residuos particulados [82]. Teniendo en cuenta que dichos residuos metálicos liberados, pueden ser una de las causas del fallo de los implantes a largo plazo, es de vital importancia ahondar en su estudio si se pretende hacer una evaluación de los riesgos asociados con los implantes ortopédicos y dentales, sobre todo cuando existen cada vez más pacientes jóvenes portadores de los mismos [83].

- **Osteólisis peri-protésica**

Es bien sabido, que la presencia de las partículas metálicas en los tejidos alrededor del implante provoca una alteración de la homeostasis del hueso (el tejido óseo está remodelándose constantemente a lo largo de la vida adulta, un proceso iniciado por la resorción de hueso por los osteoclastos, seguida de la formación de hueso nuevo por los osteoblastos), a través de una serie de respuestas proinflamatorias del organismo como mecanismo de defensa frente a un material extraño. Así, se produce una activación de los macrófagos presentes en la interfase entre el hueso y el implante, que intentan fagocitar las partículas producidas, liberando citoquinas proinflamatorias (interleuquinas, IL-1 y IL-6, factor de necrosis tumoral, TNF- α , etc.) y otros mediadores intercelulares de la inflamación como la prostaglandina E2 (PG-E2). Éstos, a su vez, estimulan el desarrollo de los osteoclastos incrementando el proceso de reabsorción del hueso peri-protésico [84,85]. Además, las partículas metálicas producen la inhibición de los osteoblastos [86]. Por tanto, con el tiempo se produce una pérdida de masa ósea alrededor del implante (osteólisis) que puede llevar al aflojamiento del mismo, al verse privado de los apoyos óseos en los que inicialmente había sido encajado.

Este fenómeno de osteólisis es la causa más común de fallo aséptico de las artroplastias y los implantes dentales [41,78,87]. Sin embargo, la respuesta inflamatoria y, por lo tanto, la osteólisis es más acusada para las partículas de polietileno liberadas de las prótesis articulares M/P, que para las partículas metálicas procedentes de las prótesis articulares M/M [46,88,89] ya que estas últimas al poseer menor tamaño, tienen una capacidad más limitada de activar a los macrófagos [90]. De manera que, en muchos casos, el fracaso de las prótesis M/M se atribuye a una osteólisis provocada por una reacción de hipersensibilidad de tipo IV al metal [91].

- **Hipersensibilidad retardada o de tipo IV**

Los productos metálicos procedentes de los implante ortopédicos y dentales pueden actuar como alérgenos, provocando en el organismo una reacción del sistema inmune inusual y excesiva (reacción alérgica) que puede ocasionar diversos tipos de daño tisular. Esta situación patológica se conoce como hipersensibilidad retardada o de tipo IV (alergia a metales) y se manifiesta solamente en personas inmunológicamente predispuestas (en la mayoría de los casos debidos a condiciones de tipo genético), las cuales habían estado en contacto previamente con el alérgeno (metal), aunque la cantidad del mismo hubiese sido muy baja [92-94].

En la hipersensibilidad retardada los productos metálicos (iones o partículas), asociados a proteínas, son reconocidos por el organismo como antígenos (invasor) desencadenando, por tanto, la reacción de su sistema inmunológico para defenderse de los mismos. Esta reacción del sistema inmunológico conlleva varias etapas; en una primera etapa de sensibilización, el antígeno activa a los linfocitos T vírgenes presentes en sangre y linfa, que empiezan a multiplicarse para combatir al supuesto invasor. De esta manera, se generan linfocitos T sensibilizados (“linfocitos T memoria”) específicos que son capaces de reconocer a su antígeno al entrar de nuevo en contacto con él. Durante esta primera etapa de sensibilización no se producen síntomas en el paciente. En una segunda etapa, los “linfocitos T memoria” al contacto secundario con el antígeno liberan determinadas citoquinas que activan y atraen a los macrófagos, que a su vez liberan mediadores inflamatorios, produciéndose una cascada de eventos que dan lugar a una respuesta inflamatoria típica de la sensibilidad tardía; la cual puede manifestarse como dermatitis [95-97], urticaria [98,99], vasculitis (inflamación y necrosis de la pared de los vasos sanguíneos) [100,101] y/o osteólisis aséptica [102-104].

La dermatitis (inflamación de la piel) causada por un implante ortopédico fue descrita por primera vez en 1966 por Fousseureau and Laugier

[105]. Sin embargo, desde entonces, no se han descrito demasiados casos en la literatura [106,107]. En la Figura A.12 [108], se puede ver la dermatitis alérgica desarrollada por un un hombre de 62 años al cual tras diagnosticarle artritis reumatoide se le colocó una prótesis articular de Co-Cr-Mo en Marzo de 2002 y 6 meses después le aparecieron los eczemas cerca de la cicatriz de la operación. Durante los 3 meses siguientes el eczema se dispersó y en un año llegó a ser crónico. La dermatitis como se puede ver en las fotografías de la Figura A.12 se extendió por el cuello, muñecas, manos, tobillos y nalgas.



Figura A.12. Paciente con alergia dermatológica causada por los metales liberados de una prótesis articular M/M

Los estudios de D. Granchi y col. [109] y N.Hallab y col. [110] fueron los primeros en sugerir que la hipersensibilidad a los metales podría jugar un papel importante en el desprendimiento aséptico de las prótesis. Un estudio más reciente [111], llevado a cabo con 16 pacientes portadores de prótesis de cadera, los cuales se iban a someter a una revisión quirúrgica debido a dolores (osteólisis o dislocación) y que poseían una histopatología del tejido periférico al implante que indicaba una reacción de hipersensibilidad de Tipo IV, puso de

A. INTRODUCCIÓN

manifiesto que el 60% de dichos pacientes (13/16) presentaba resultados positivos en los tests de hipersensibilidad a metales.

Durante los últimos 30 años varios estudios epidemiológicos han indicado que existe una correlación entre los pacientes portadores de implantes metálicos y el desarrollo de la alergia a metales [112]. Esto se debe a que además del Ni, ampliamente reconocido como alergénico (alrededor de un 14-15% de la población general es alérgica a este metal) [113], también el Cr y el Co han demostrado ser alergénicos [114] e incluso el Ti, aunque el número de casos descritos es menor [96,115]. En la Figura A. 13 se puede ver una representación de los resultados obtenidos de dichos estudios (16 estudios epidemiológicos, 1700 pacientes), en la que se realiza una comparación de la hipersensibilidad desarrollada (debido a la presencia de metales) en pacientes con prótesis articulares M/M (en buen estado y con fracaso por osteólisis) y en la población general [112].

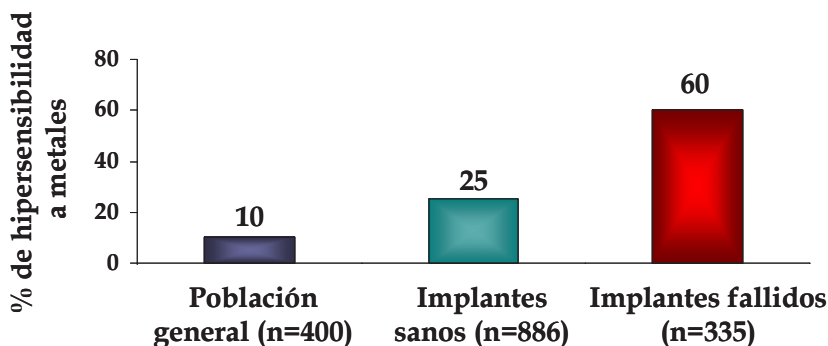


Figura A.13. Recopilación de los estudios que muestran el porcentaje (valor medio) de incidencia de la hipersensibilidad a Ni, Co y Cr en: población general, pacientes con artroplastias M/M y pacientes con artroplastias M/M con fracaso de las mismas por osteólisis

Como se puede ver en dicha figura la sensibilización a la presencia de metales entre pacientes con un implante es, aproximadamente, de 2 a 3 veces mayor que la de la población general y, aproximadamente, 6 veces mayor en el caso de pacientes con fallo de los implantes por osteólisis.

- **Mutagenia, teratogenia y cáncer**

Se ha investigado, tanto *in vitro* como *in vivo*, la posibilidad de que las partículas metálicas liberadas de los implantes metálicos produzcan mutaciones o aberraciones cromosómicas (alteraciones en el número o en la estructura de los cromosomas). En los estudios *in vitro* [116] se observó que al añadir los residuos metálicos, obtenidos artificialmente (haciendo uso de un simulador), de implantes de cadera a un cultivo de fibroplastos se producían aneuploidías (alteraciones en el número normal de cromosomas de un organismo) y translocaciones (intercambios de genes entre cromosomas). Los estudios *in vivo* [117] pusieron de manifiesto que los residuos metálicos liberados de las prótesis de cadera M/M, producían aberraciones cromosómicas en los linfocitos de la sangre periférica de los pacientes portadores de dichas prótesis. Además, se demostró que la frecuencia de aneuploidías y translocaciones cromosómicas era alrededor de tres veces mayor en los pacientes portadores de las prótesis con respecto al grupo control (personas que no llevaban ningún tipo de implantes) [118].

Las implicaciones clínicas que pueden producir estas anomalías cromosómicas en el organismo a largo plazo no se conocen todavía [78]. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la presencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos se considera un biomarcador de predicción para potenciales problemas de salud como cáncer y abortos, en poblaciones expuestas a sustancias mutágenicas, teratógenicas y/o cancerígenas [119,120]. En este sentido, aunque los iones metálicos (procedentes de las prótesis articulares metálicas) han demostrado poder atravesar la placenta, esta barrera placentaria parece ser parcialmente eficaz, ya que la concentración de iones encontrados en la sangre del cordón umbilical es nula o mucho menor que la concentración de dichos iones encontrados en la sangre de las madres [121]. De manera que, hasta la fecha, no se han publicado casos de teratogenia (anomalía congénita que refleja los efectos tóxicos por parte de metales, medicamentos,

A. INTRODUCCIÓN

etc. sobre el feto en desarrollo) causada por los metales liberados de los implantes metálicos [122].

Por otro lado, estudios llevado a cabo con animales [16] parecen indicar que los implantes ortopédicos son potenciales cancerígenos. Sin embargo, aunque se han descrito algunos casos de tumores malignos localizados en los tejidos adyacentes al implante [123,124], no existe evidencia de que dichos tumores hayan sido causados por los implantes. De hecho, en los estudios epidemiológicos y de otro tipo realizados, hasta la fecha, [125-127] no se ha encontrado un aumento en el riesgo de padecer cáncer en los pacientes portadores de implantes ortopédicos con respecto a la población general. No obstante, todas las investigaciones hacen hincapié en la necesidad de hacer seguimientos más prolongados a los pacientes portadores de prótesis para poder llegar a resultados más concluyentes [128]. Por ello, en la clasificación establecida por la IARC ("The International Agency for Research into Cancer", de la Organización Mundial de la Salud) [129] los implantes ortopédicos se encuentran en el Grupo 3 (materiales o sustancias no clasificables como carcinogénicas para los humanos) mientras que el Cr (VI) se encuentra en el Grupo 1 (sustancias carcinogénicas) [130] y el Co y sus compuestos; así como el dióxido de titanio, en el grupo 2B (posibles carcinogénicos) [131,132].

- **Toxicidad**

Los pacientes portadores de prótesis metálicas presentan niveles elevados (con respecto a la población general) de Co, Cr y Ti en sus fluidos biológicos (suero, sangre y orina), como se detallará más adelante y por ello, existe un riesgo de que estos metales circulantes puedan causar una toxicidad sistémica a largo plazo.

El titanio es un elemento del que apenas existe información sobre su posible toxicidad y, en general, sobre su comportamiento en el organismo y los resultados, aún a día de hoy, resultan controvertidos [133-135]. En cuanto al Co y el Cr ambos son elementos traza esenciales [136], es decir, elementos cuya

deficiencia en el organismo provoca alteraciones en el funcionamiento del mismo. Sin embargo, a elevadas concentraciones pueden ser tóxicos, así, el Co puede producir cardiomiopatía, hipotiroidismo, neuropatía periférica y discapacidad auditiva y visual [137-139] y el Cr puede dar lugar a daños en el hígado y el riñón [140-143]. De ahí que, organismos reguladores (en diferentes países), que se ocupan de gestionar los riesgos para la salud humana asociados a la exposición ambiental u ocupacional a determinados agentes químicos y físicos, hayan establecido niveles máximos de exposición (valores límites permisibles) para el Co y el Cr [144,145]. Por ejemplo, el actual umbral de toxicidad establecido por la Comisión Alemana del Senado para la investigación de riesgos para la salud de los compuestos químicos, en el área de trabajo son: niveles de Co en sangre de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y de Cr en sangre de $17 \mu\text{g L}^{-1}$ [144], con el consiguiente protocolo de actuación en el caso de que se exceda dicho umbral. Aunque en ocasiones se ha visto que las concentraciones de estos elementos en sangre y suero de pacientes portadores de prótesis metálicas supera los valores límites permisibles establecidos [146], aún no se han establecido niveles máximos de exposición para estos metales liberados de las prótesis.

En este sentido, en Abril del 2010 la “United Kingdom’s Medical Products and Healthcare Devices Regulatory Agency” del Reino Unido publicó un dispositivo de alerta médica que recomienda realizar un seguimiento al menos una vez al año durante los 5 años posteriores a la artroplastia, en aquellos pacientes que presenten niveles de Cr y Co en suero superiores a $7 \mu\text{g L}^{-1}$ [147].

A.1.7 Metodologías analíticas para la determinación de los metales procedentes de implantes ortopédicos y dentales en fluidos biológicos

Como se comentó previamente, las aleaciones metálicas de Co-Cr y de Ti, con las que se fabrican los implantes ortopédicos y dentales se degradan en el organismo con la consiguiente liberación de productos metálicos (solubles o

A. INTRODUCCIÓN

particulados), principalmente, de Co, Cr y Ti, cuyo impacto biológico, a corto o largo plazo, todavía se desconoce [148]. Estos productos de degradación son susceptibles, dependiendo de su naturaleza, de ser transportados a través del torrente sanguíneo a los distintos órganos y tejidos del cuerpo humano donde se depositan y/o son excretados p.ej. por la orina. Por tanto, un primer paso para avanzar en el conocimiento de las implicaciones clínicas que se pueden producir como consecuencia de la presencia en el organismo de los productos de degradación de los implantes metálicos, es la determinación, exacta y precisa, del nivel de concentración de los metales procedentes de dichos implantes en fluidos biológicos (sangre, suero y orina), tanto de personas normales (sin implantes) como de personas con implantes.

Las concentraciones de Cr, Co y Ti, en los fluidos biológicos de sujetos normales (personas no expuestas laboralmente a estos metales ni portadores de implantes metálicos) son muy bajas. Así, se han determinado niveles basales de estos elementos *en suero* de 0,31-1,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Cr [149] 0,30-1,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Co [149] y 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Ti [150]; mientras que *en orina*, los niveles se encuentran en el rango de 0,04-4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Cr [149,151,153]; 0,16-1,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Co [149,152,153] y 0,5-1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el Ti [151,153,]. Aunque estos niveles se incrementan en los sujetos portadores de prótesis metálicas, siguen estando en el orden de unas pocas ppb. Por tanto, para su determinación se necesitan técnicas analíticas muy sensibles y, además, muy selectivas dada la complejidad de la matriz de los fluidos biológicos a analizar (sangre, suero y orina). De ahí que, de las distintas técnicas de espectrometría atómica existentes, sólo las técnicas de espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) poseen, en principio, la sensibilidad y selectividad adecuadas para determinar los niveles de concentración de los metales de interés en fluidos biológicos.

A.1.7.1 Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica

La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) es, en la actualidad, una técnica de rutina ampliamente utilizada en los laboratorios de análisis, la cual se comenzó a utilizar en los años setenta con el fin de mejorar la sensibilidad obtenida por absorción atómica de llama (AAS). En la técnica de ETAAS la muestra a analizar, sólida o líquida (0,5-10 μL), se coloca en un tubo cilíndrico de grafito (3-5 cm de longitud y 3-8 mm de diámetro) abierto por ambos extremos que se calienta por efecto Joule al paso de corriente eléctrica. El calentamiento se lleva a cabo mediante rampas de temperatura creciente, de manera que en una primera etapa (110-150 $^{\circ}\text{C}$) la muestra se seca y vaporiza; a continuación, a una temperatura más alta (1000 $^{\circ}\text{C}$), la muestra se calcina y; por último, se atomiza (2000-3000 $^{\circ}\text{C}$) de forma muy rápida. El tubo de grafito (atomizador) está colocado en el paso óptico del espectrofotómetro de absorción atómica de forma que la radiación de la lámpara (de longitud de onda específica para cada elemento a analizar) pasa por el centro del tubo y es absorbida por los átomos del analito.

La técnica de ETAAS ofrece una serie de ventajas, como son: elevada sensibilidad para pequeños volúmenes de muestra (0,5-10 μL), los límites de detección se encuentran, en general, en el intervalo de 0,01-5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (concretamente para el Cr, Co y Ti son de 0,06; 0,08 y 2,91 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) [154]; con aceptable precisión (5-10%); reducido pretratamiento de muestra y buena selectividad. Estas características analíticas, han hecho que esta técnica haya sido la más utilizada durante muchos años para la determinación de los metales procedentes de los implantes metálicos en fluidos biológicos [146,155,156] y, en la actualidad, es todavía la técnica elegida por muchos investigadores para dicha determinación [157-161].

Evidentemente, la técnica de ETAAS no está exenta de ciertas limitaciones; en primer lugar, se trata de una técnica unielemental; en segundo

A. INTRODUCCIÓN

lugar, no es posible su acoplamiento en línea con los sistemas de separación cromatográficos, para llevar a cabo estudios de especiación metálica; y, por último, esta técnica presenta importantes *interferencias de matriz*, que es necesario corregir, por ejemplo, mediante el empleo de determinados modificadores de matriz. Así en el caso concreto de la determinación de Cr y Co en suero, se han utilizado Pd al 0,8% y Mg al 0,3% como modificadores de matriz [162]. Las interferencias de matriz también se pueden minimizar mediante un procedimiento de preparación de muestra adecuado; por ejemplo, el tratamiento de las muestras de sangre para su análisis mediante ETAAS consiste, generalmente, en un proceso de mineralización usando ácido nítrico seguido de ácido fluorhídrico y, finalmente, dilución con agua hasta el volumen requerido [156]. Para el análisis de las muestras de orina por la técnica de ETAAS, éstas se diluyen en un medio que contiene peróxido de hidrógeno, ácido nítrico y Tritón X-100 [155,163,165]. En cuanto a las muestras de suero, se pueden analizar directamente [166,167] o tras una simple dilución acuosa [158,168,170].

En las Tabla A.II se recogen algunas de las aplicaciones de la técnica de ETAAS a la determinación de los metales procedentes de las prótesis articulares de cadera M/M en sangre, suero y orina.

Como se puede observar en dicha tabla, sólo existe un trabajo en el que se determina Ti en suero utilizando la técnica de ETAAS y en dicho estudio, no consiguieron obtener los niveles de Ti en los sueros control (personas sin implantes metálicos). Esto es debido a que esta técnica carece de la sensibilidad necesaria para determinar los niveles extremadamente bajos de Ti en este tipo de muestras. En un artículo publicado bastante recientemente, J.J. Jacobs y col. [113] resumen su dilatada experiencia en la medida de Ti por ETAAS en muestras de suero de más de 750 pacientes, concluyendo que muchos de sus estudios han estado limitados por la sensibilidad de la técnica de análisis. Así, en sus primeros trabajos de principios de los años 90 afirmaba que los niveles basales de Ti debían ser inferiores a las 4,1 ppb del límite de detección (LD) de

su técnica analítica (ETAAS). Sin embargo, a finales de esa misma década y gracias a los avances instrumentales, fijaron los niveles basales del Ti en suero humano por debajo de 2,1 ppb (LD de su “nuevo” equipo de ETAAS).

Todavía no se ha descrito la aplicación de la técnica de ETAAS al estudio de los metales liberados de los implantes para osteosíntesis o de los implantes dentales.

Tabla A.II. Niveles de Co, Cr y Ti en muestras de suero, sangre y orina de personas sin implantes (controles) y de personas portadoras de prótesis articulares de cadera M/M (pacientes) mediante ETAAS

Autor/ Ref.	Nº de Pacientes	Nº de Controles	Fluido biológico	Metal	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
					Pacientes	Controles
W.Brodner y col. 2003/ [163]	27	—	Suero	Co	0,5-1,6	—
A. Grül y col. 2004/ [170]	22	—	Suero	Co	0,3-5,4	—
A. Grül y col. 2007/ [158]	13	—	Suero	Co	0,5-10,5	—
W.C. Witzleb y col.2006/ [162]	60	130	Suero	Co Cr	2,1-4,2 0,8-1,6	< 0,25 < 0,25
I. Milosev y col. 2005/ [159]	43	6	Suero	Co Cr	0,2-0,9 0,2-6,5	0,1-0,2 0,2-0,3
V.J. Rasquinha y col.2006/ [160]	10	—	Suero	Co Cr Ti	0,5-7,9 0,8-9,1 1,1-5,9	— — —
K.Maezawa y col.2002/ [161]	44	—	Suero	Co Cr	< L.D 0,9-5,1	— —
C. Lothka y col. 2003/ [157]	131	31	Suero	Co Cr	1,2-5,2 4,9-10,7	0,2-0,4 0,1-0,3
G. Adami y col.2003/ [156]	30	10	Sangre	Co Cr	2,6-5,6 1,6-7,4	< L.D < L.D
K.Maezawa y col.2002/ [161]	32	—	Orina	Co Cr	< L.D 2,2-4,1	— —

A.1.7.2 Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

La aparición de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en 1980 supuso una revolución dentro del análisis elemental inorgánico. Su desarrollo, se produjo por el deseo de combinar la capacidad multielemental y el amplio rango lineal de la espectrometría de emisión óptica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), con los límites de detección excepcionalmente bajos de la técnica de ETAAS.

En la técnica de ICP-MS la muestra líquida, introducida generalmente mediante nebulización neumática, se transforma en un aerosol en un sistema de nebulización. Este aerosol es transportado por un flujo de gas (argon) al interior de un *plasma de argon*, generado en una antorcha de cuarzo mediante la aplicación de radiofrecuencias. Dicho plasma alcanza una temperatura entre 8000 y 10000 K, que permite que la muestra sea desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada, formándose, principalmente, iones monoatómicos y monopositivos. A continuación, los iones formados pasan a través de una *interfase de extracción*, formada por dos conos metálicos (Ni o Pt), que se encuentra a vacío moderado ($\sim 1-2$ torr), hasta un *sistema de lentes electrostáticas* (zona de alto vacío), que enfoca el haz de iones hacia un analizador de masas, el cual separará los iones en función de su relación m/z , seguido de un *sistema de detección*.

El ICP-MS, se ha convertido en la actualidad, en una poderosa herramienta para el análisis elemental por sus excelentes características analíticas, como son: rapidez; especificidad elemental e isotópica; versatilidad (se pueden analizar el 90% de los elementos de la Tabla Periódica); buena sensibilidad, con límites de detección en el rango de $0,001-10 \mu\text{g L}^{-1}$ (concretamente para el Cr, Co y Ti los límites de detección son de 0,07, 0,05 y $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, utilizando un ICP-MS de alta resolución o doble

enfoque [153]); buena precisión (2-4%); amplios rangos de linealidad (6-8 órdenes de magnitud); capacidad multi-elemental y capacidad multi-isotópica, lo cual permite la medida de relaciones isotópicas y, con ello, la aplicación de técnicas de dilución isotópica para el análisis. De ahí, que en los últimos cinco años, se haya extendido el uso del ICP-MS para la determinación de los metales traza liberados, principalmente, por las prótesis articulares en los fluidos biológicos [171-176].

No obstante, se debe prestar especial atención a las interferencias que pueden afectar a las medidas mediante ICP-MS. Estas interferencias pueden ser tanto *interferencias de matriz* como *interferencias espectrales* y podrían considerarse como los principales inconvenientes de esta técnica.

Las interferencias de matriz pueden reducirse, en muchos casos, mediante la dilución de la muestra y/o la adición de uno o varios patrones internos. Así, en el análisis de suero y orina mediante ICP-MS las muestras se diluyen simplemente con agua de calidad Milli-Q [151,153,177]. Sin embargo, en el caso de las muestras de sangre como la matriz es mas compleja es necesario diluirlas con 0,1% de Triton X-100 [151], o proceder a su digestión en horno de microondas con ácido nítrico y H₂O₂ [153]. Además, en ICP-MS es común el empleo de patrones internos, elementos con un comportamiento similar al del analito, es decir, con una masa y un potencial de ionización próximos a éste y que ayudan a compensar, en algunos casos, los efectos de matriz. Se han utilizado Indio [151], Rodio [159], Galio e Ytrio [153], entre otros, para la determinación de Co, Cr y Ti en suero, sangre y orina. Para el análisis de un elemento con varios isótopos se podrá elegir como “patrón interno ideal” un isótopo de dicho elemento con el fin de llevar a cabo su determinación mediante la técnica de análisis de dilución isotópica (IDA). Sin embargo, esta técnica aún no ha sido aplicada para la determinación de los metales liberados de los implantes metálicos en fluidos biológicos.

A. INTRODUCCIÓN

Las interferencias espectrales se dividen en dos grandes grupos: interferencias isobáricas e interferencias poliatómicas. Las *interferencias isobáricas* son debidas a isótopos de otros elementos que presenten la misma m/z que nuestro analito, son predecibles y se pueden evitar de varias formas, bien seleccionando los isótopos que estén libres de ellas, mediante ecuaciones matemáticas de corrección de interferencias o separaciones químicas del analito de la matriz. Las *interferencias poliatómicas* (mucho más frecuentes), son debidas a la presencia de iones poliatómicos con la misma m/z que el elemento a analizar, formados por la combinación de especies derivadas del gas del plasma, o de los gases atmosféricos (Ar, N₂, O₂, etc.), de los reactivos empleados en el tratamiento de la muestra y/o de la matriz de la misma. Hoy en día, estas interferencias poliatómicas se pueden eliminar o al menos minimizar gracias a la existencia de equipos de ICP-MS con analizadores de masas de alta resolución o doble enfoque (HR-ICP-MS) y los ICP-MS de tipo cuadrupolo equipados con una celda de reacción dinámica (ICP-DRC-MS). Estos últimos equipos son más sencillos de utilizar y más baratos que los equipos de HR-ICP-MS; sin embargo, determinadas interferencias poliatómicas sólo pueden ser eliminadas con el empleo de un ICP-MS de alta resolución. Así, en la determinación de Ti en fluidos biológicos es imprescindible el uso de un equipo del HR-ICP-MS, ya que las interferencias poliatómicas $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ y $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, que afectan a los isótopos ^{48}Ti y ^{47}Ti , respectivamente, no pueden ser completamente eliminadas mediante el uso de equipos de ICP-DRC-MS. Hay que destacar que, la mayoría de los resultados publicados sobre los niveles de Ti en suero, sangre y orina, tanto en los controles (individuos sin implantes metálicos), como en aquellos pacientes con prótesis metálicas se han obtenido empleando ETAAS o ICP-MS de cuadrupolo, técnicas cuya sensibilidad y/o selectividad no son adecuadas para abordar este tipo de análisis. Por este motivo, la mayoría de los resultados recogidos hasta el momento en la bibliografía deberían ser confirmados adecuadamente.

En la Tabla A.III se recogen algunas de las aplicaciones de la técnica de ICP-MS a la determinación de los metales liberados por las prótesis articulares de cadera M/M en fluidos biológicos.

Tabla A.III. Niveles de Co, Cr y Ti en muestras de suero, sangre y orina de personas sin implantes (controles) y portadoras de prótesis articulares de cadera M/M (pacientes) mediante ICP-MS

Autor/Ref.	Nº de Pacientes	Nº de Controles	Fluido biológico	ICP-MS	Metal	Niveles / ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
						Pacientes	Controles
I. Iavicoly y col. 2006/ [177]	14	19	Suero	HR-ICP-MS	Co	3,7-43,2	2,1-4,8
					Cr	0,4-4,9	1,1-1,8
H. Dahlstrand y col. 2009/ [172]	28	—	Suero	HR-ICP-MS	Co	0,2-2,1	—
					Cr	0,5-2,2	—
C. Anderson y col.2009/ [174]	91	—	Suero	HR-ICP-MS	Co	0,3-1,0	—
					Cr	0,6-1,4	
					Ti	1,8-4,4	
P.A. Vendittoli y col.2011/ [176]	64	—	Sangre	HR-ICP-MS	Co	0,2-2,0	—
					Cr	0,4-5,1	
P. Sauvé y col. 2007/ [173]	28	—	Sangre	ICP-DRC-MS	Co	1,0-3,4	—
					Cr	1,8-4,4	
E. Dunstan y col. 2005/ [151]	3	4	Sangre	HR-ICP-MS	Co	1,1-2,4	0,4-0,9
					Cr	1,7-2,5	1,9-2,3
					Ti	1,4-1,5	0,9-1,1
E. Dunstan y col. 2005/ [151]	3	4	Orina	HR-ICP-MS	Co	3,6-18,0	0,4-0,7
					Cr	1,8-3,9	< 1
					Ti	0,5-0,8	0,7-1,3
I. Iavicoly y col. 2006/ [177]	14	19	Orina	HR-ICP-MS	Co	1,5-9,4	0,1-0,4
					Cr	0,5-3,5	0,4-2,0
C. Anderson y col.2009/ [174]	91	—	Orina	HR-ICP-MS	Co	1,0-3,4	—
					Cr	1,8-4,4	
					Ti	1,8-4,4	

Los resultados recogidos en las Tablas A.II y A.III ponen de manifiesto que, en general, se produce un aumento en la concentración de Co, Cr y Ti en los fluidos biológicos de los pacientes portadores de prótesis de cadera M/M con respecto a los grupos control (personas sin implantes). Sin embargo, los resultados obtenidos en los diferentes estudios son muy variables; así los niveles

A. INTRODUCCIÓN

de Co en sangre de los pacientes oscilan entre 0,2 ppb [176] y 5,6 ppb [156]; en suero van desde 0,2 [159,172] hasta 10,5 [158] ppb y se han publicado valores de hasta 43,2 ppb [177]; y en orina se encuentran en el rango de 1,0 ppb [174] hasta 18,0 ppb [151]. Lo mismo ocurre en el caso del Cr y del Ti (ver Tablas A.II y A.III), por lo que es muy difícil establecer conclusiones y hacer comparaciones. Esto es debido a que dependiendo del estudio se utilizan: distintas metodologías analíticas; diferentes tipos de muestras (sangre, suero, orina); los pacientes llevan diferentes tipos de prótesis (con diferentes diseños, de diferentes casas comerciales, etc.) y durante distinto tiempo; el número de pacientes en estudio también es variable; el grupo control no es el mismo y a veces no existe. Sin olvidar las propias diferencias entre cada individuo, los factores ambientales, la influencia de la dieta, los hábitos de vida, etc.

A.2 ESPECIACIÓN DE METALES TRAZA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

A.2.1 Importancia y necesidad de la especiación metálica

Los trabajos de los últimos 40 años han demostrado claramente que los metales existen en el medio ambiente y los organismos vivos en distintas formas químicas: iones libres, complejos inorgánicos u orgánicos (neutros o cargados), asociados o enlazados a estructuras macromoleculares (proteínas, ADN), etc. Asimismo, está igualmente demostrado que el impacto ambiental y la actividad biológica de un elemento depende de su naturaleza y su concentración total en la muestra, pero sobre todo de las distintas especies químicas en las que el elemento está presente en la misma, entendida por *especie química* a la forma específica de cada elemento químico definida en función de su composición isotópica, estado de oxidación y/o complejos moleculares que forme [178].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha definido el concepto de *especiación de un elemento* como la distribución del mismo entre sus distintas especies químicas individuales en una muestra y *análisis de especiación* como la actividad analítica involucrada en la identificación y/o cuantificación de una o más especies químicas de un elemento en una muestra [179].

Los estudios de especiación metálica poseen, hoy en día, un carácter multidisciplinar ya que intervienen y se benefician de la información obtenida, expertos de diferentes campos: química ambiental, salud y nutrición y bioinorgánica, entre otros.

Un organismo debe regular la transcripción, la traducción, asimilación e incorporación de los metales necesarios para su función. Por lo tanto, para entender la química celular es necesario establecer no sólo las características de su material genómico (*genoma*) o la naturaleza y contenido de sus proteínas (*proteoma*), sino también la distribución de los metales y metaloides entre las

A. INTRODUCCIÓN

diferentes especies y los compartimentos de la célula, *metaloma* [180]. Surge así el concepto de metalómica: estudio de los metales y sus especies, sus interacciones, transformaciones y funciones en sistemas biológicos [181].

En la Figura A.14 se muestra una representación esquemática de las especies de interés en Química Analítica Bioinorgánica, que engloban todas las biomoléculas endógenas que contienen un heteroátomo covalentemente unido, así como complejos de elementos traza y sus compuestos [182].

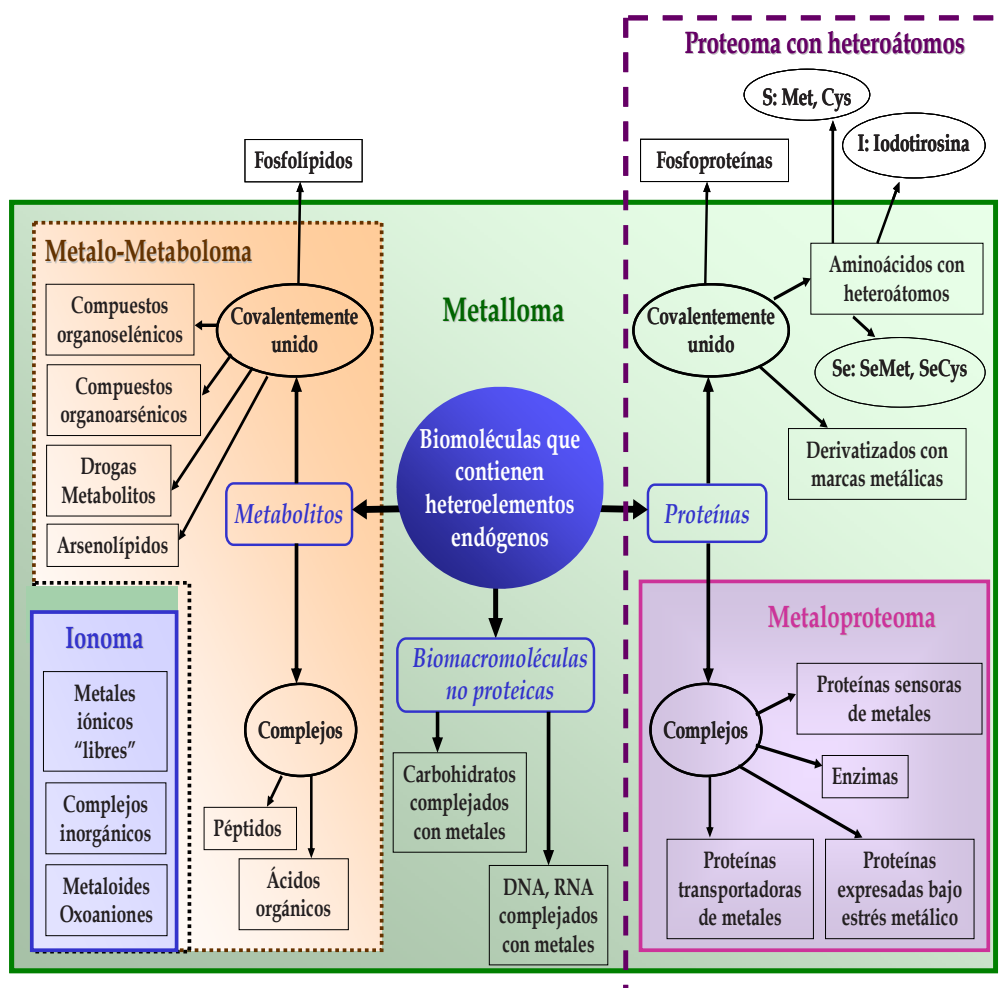


Figura A.14. Representación esquemática de las biomoléculas que contienen heteroelementos endógenos

A.2.2 Técnicas analíticas para la especiación metálica en fluidos biológicos

El análisis de especiación de los metales traza y ultratrazas en fluidos biológicos (sangre, suero, orina) sigue siendo un reto analítico, debido a que:

- a) Se encuentran a niveles de concentración muy bajos ($\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}) en muestras de matriz muy compleja (presencia de proteínas, altos contenidos salinos, etc.).
- b) Cada uno de los metales de interés, ya de por sí en una concentración muy baja, se pueden encontrar en la muestra distribuidos en un número determinado de especies químicas, por lo que los límites de detección y/o cuantificación requeridos para su especiación serán todavía más bajos que los necesarios para determinar su concentración total.
- c) La manipulación de la muestra durante todas las etapas del análisis debe preservar la integridad de las especies metálicas presentes en la misma.
- d) Finalmente, pero no menos importante, es necesario prestar especial atención a los problemas asociados al análisis de ultratrazas como son las posibles pérdidas del analito o la contaminación de la muestra durante el proceso analítico, por lo que es preciso cuidar en extremo todos los detalles de dicho proceso a fin de obtener resultados fiables.

Por todo ello, es evidente la necesidad de utilizar metodologías analíticas de muy elevada sensibilidad y selectividad para llevar a cabo los análisis de especiación metálica en fluidos biológicos. Esta altísima sensibilidad y selectividad sólo se puede conseguir mediante el empleo de *técnicas "híbridas" o acopladas* [183] que se basan en la combinación de una técnica de separación poderosa, capaz de separar con buena resolución las distintas especies en estudio, con un detector muy sensible y "específico" del metal de interés. Aunque existen una gran variedad de combinaciones entre las distintas técnicas

A. INTRODUCCIÓN

de separación y de detección (Figura A.15) [184], el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores atómicos son las técnicas más utilizadas en estudios de especiación metálica en fluidos biológicos [185-187].

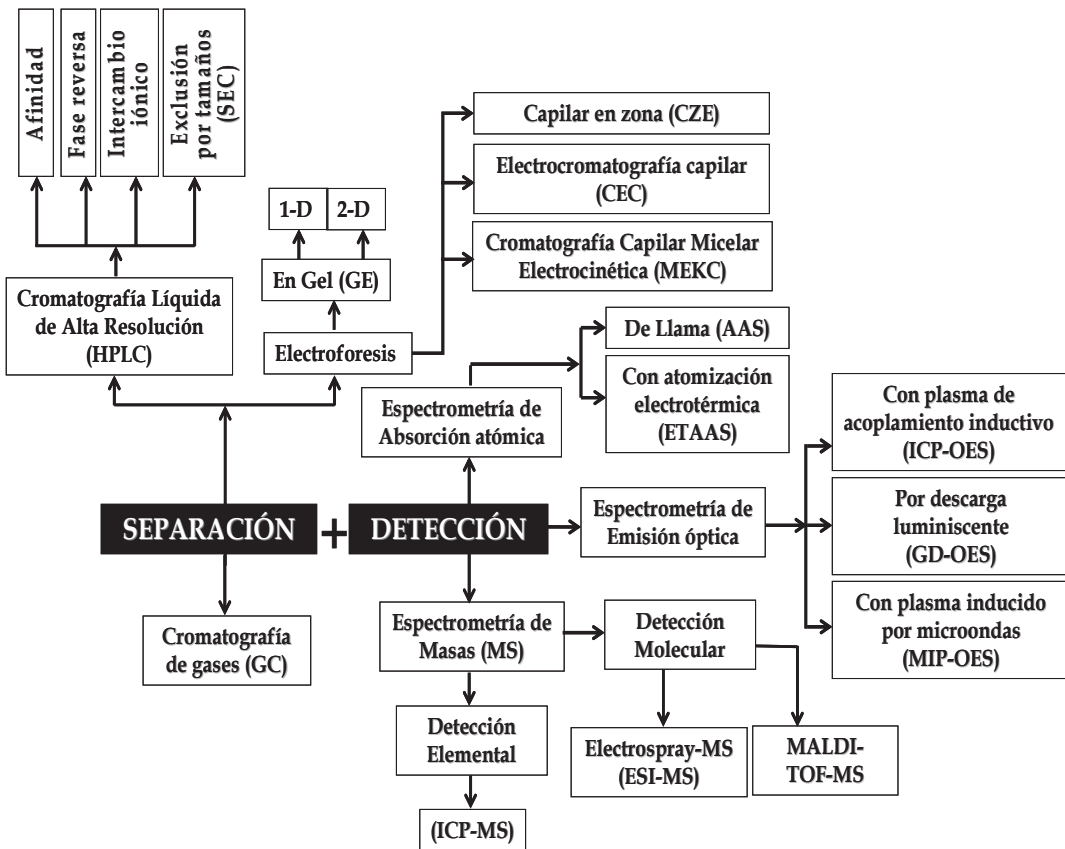


Figura A.15. Técnicas híbridas utilizadas para la especiación de metales traza en los fluidos biológicos

Durante los años 70 el acoplamiento de la HPLC en sus distintos modos, con la detección mediante espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) dio lugar a los primeros estudios de especiación metálica en fluidos biológicos [188]. El acoplamiento era sencillo en términos de instrumentación, pero los límites de detección no eran suficientes para la mayoría de las aplicaciones, por lo que fue preciso recurrir a técnicas de detección más sensibles como la espectrometría de absorción atómica con atomización electro térmica (ETAAS).

Esta técnica aunque con muy buenos límites de detección no es compatible con la introducción continua de la muestra procedente del sistema de HPLC, por lo que la detección se lleva a cabo de manera “off-line”, analizando por ETAAS las fracciones recogidas a la salida de la columna cromatográfica. El empleo, posteriormente, de la espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES) y la espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), permitió combinar buenos límites de detección, con la detección en línea y además con la capacidad multielemental de los plasmas [189]. A pesar de ello, el acoplamiento HPLC-ICP-OES presenta limitaciones, entre las cuales se podría destacar que no posee en muchos casos la sensibilidad suficiente para el análisis de especiación metálica de muestras biológicas [189,190]. Estas limitaciones fueron subsanadas con la aparición, a mediados de los años 80, de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) que, en la actualidad, no solo es, como ya se ha comentado, la técnica más empleada para la determinación de trazas y ultratrazas metálicas en muestras biológicas, sino que además es la técnica más utilizada como sistema de detección en las metodologías híbridas utilizadas para el análisis de especiación elemental de dichas muestras [186]. Esto es debido a que presenta características próximas a las exigibles a un detector específico ideal acoplado a técnicas de separación, como son: capacidad para introducir de forma continua o directa muestras gaseosas o líquidas; extremada sensibilidad (límites de detección de $0,001-10 \mu\text{g L}^{-1}$), gran especificidad elemental e isotópica, que permite aplicar técnicas de dilución isotópica para la cuantificación; amplios intervalos lineales; y capacidad multielemental y multi-isotópica. De este modo la combinación HPLC-ICP-MS se ha consolidado como la técnica híbrida más utilizada para la especiación metálica en fluidos biológicos [191].

El hecho de que el HPLC sea la técnica de separación más popular en el análisis de especiación de materiales biológicos, es debido a su enorme versatilidad como técnica de separación, ya que permite la separación de

A. INTRODUCCIÓN

mezclas complejas en cada uno de sus componentes en función de su volumen hidrodinámico (exclusión por tamaños), carga (intercambio iónico), carácter hidrofílico/hidrofóbico (fase normal o reversa) y afinidad [192]. Como primer paso, la estrategia más simple para detectar la presencia de un metal en un rango de especies de distinto peso molecular, sobre todo especies proteicas, es el acoplamiento entre la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y el ICP-MS [193]. Con esta metodología se garantiza la integridad de las especies (p.ej. no se desnaturalizan las proteínas) durante la separación. Sin embargo, la resolución entre las especies obtenidas mediante SEC suelen ser muy pobre. De este modo, con el propósito de mejorar dicha resolución, la separación por SEC puede ser seguida o reemplazada por otros mecanismos de separación, como intercambio iónico o fase reversa.

El acoplamiento entre la cromatografía de intercambio iónico y el ICP-MS ha sido utilizado con éxito para la especiación de numerosos elementos (Fe, V, Al, Cu, Zn, etc.) en suero humano [194-197], sin embargo no ha ocurrido lo mismo con el acoplamiento entre la cromatografía de fase inversa al ICP-MS. Este hecho se debe a que las separaciones mediante fase inversa requieren el uso de porcentajes relativamente elevados de modificadores orgánicos (metanol, acetonitrilo) en las fases móviles, con lo que se puede comprometer tanto la estabilidad de las especies metálicas en estudio (p.ej. las metaloproteínas), como la sensibilidad instrumental [193,198].

Dado que las velocidades de flujo de las fases móviles, habitualmente utilizadas en HPLC (en torno a 1 mL min^{-1}) son compatibles con la velocidad de aspiración de las muestras al plasma a través de los nebulizadores concéntricos convencionales empleados en ICP-MS, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es muy sencillo y representa uno de sus mayores atractivos. Dicho acoplamiento, consiste en la unión de la salida de la columna analítica al nebulizador del ICP-MS a través de un tubo de plástico inerte y cuya longitud y diámetro interno deben ser lo menor posible para evitar volúmenes muertos y ensanchamiento de los picos cromatográficos.

Es necesario, así mismo, tener en cuenta que la señal del ICP-MS puede verse afectada por las características de las fases móviles utilizadas en la separación cromatográfica. En este sentido, las fases móviles deben de poseer siempre un contenido salino inferior a 50 mM para evitar el colapso del plasma y/o la obturación del nebulizador y de los conos de la interfase. El empleo de sales altamente volátiles como el acetato amónico permite elevar el contenido en sales hasta al menos 400 mM [199]. Asimismo, la introducción en el plasma de elevadas cantidades de disolventes orgánicos produce un “enfriamiento” del mismo disminuyendo su capacidad de ionización y, por lo tanto, la sensibilidad e incluso puede llegar a provocar la extinción del plasma. Por esta razón, es necesario que el porcentaje de disolvente orgánico presente en las fases móviles utilizadas en la separación sea inferior al 20%. El empleo de sistemas de HPLC capilar (flujos de alrededor de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$) se presenta como alternativa cuando la separación requiere del empleo de fases móviles con altos porcentajes de disolventes orgánicos, ya que permiten la introducción directa de hasta un 100% de disolvente orgánico [200].

Finalmente, es necesario tener en cuenta que la metodología HPLC-ICP-MS solo proporciona información elemental de las especies separadas, pero no nos dice nada acerca de la naturaleza de las mismas. Por tanto y dado que en muchos casos los especies separadas son desconocidas, en los últimos años, los estudios de especiación elemental en fluidos biológicos se deben complementar con estudios de identificación, confirmación y/o caracterización de dichas especies metálicas mediante técnicas de espectrometría de masas molecular, como la espectrometría de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI) [201] y la espectrometría de masas con fuente de desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI) [184,202].

Las técnicas de ESI y MALDI permiten realizar, simultáneamente, tanto la volatilización, como la ionización de las moléculas del analito desde la muestra sólida o líquida llevando a fase gaseosa los iones moleculares del analito sin apenas fragmentación, razón por la que se conocen como técnicas de

A. INTRODUCCIÓN

ionización suaves o “blandas”. La aparición de estas técnicas a finales de los 80, permitió la utilización de las técnicas de espectrometría de masas para el estudio de analitos difíciles de volatilizar (termolábiles, de alto peso molecular y/o muy polares) y la convirtió en una herramienta imprescindible, hoy en día, en el estudio de biomoléculas [203-208].

A.2.3 Estudios de especiación de los metales liberados por los implantes ortopédicos y dentales en fluidos biológicos

Como se vio en apartados anteriores, los implantes metálicos, una vez en el organismo en contacto con los tejidos vivos y los fluidos biológicos, se degradan (como consecuencia de la corrosión y/o el desgaste) en mayor o menor extensión, liberando residuos metálicos. De ahí, la presencia de niveles elevados de los metales presentes en los materiales de los implantes (Cr, Co, Ti) en los fluidos biológicos de los pacientes portadores de éstos (sangre, suero, orina, líquido sinovial, etc.) [47,156]. Sin embargo, la forma química de estos residuos metálicos liberados no se conoce con certeza y puede ser muy variada: partículas metálicas (de diferentes tamaños), iones metálicos libres, complejos inorgánicos, compuestos organometálicos, sales metálicas, óxidos o hidróxidos (solubles o insolubles), etc. [209,210].

La naturaleza de dichos residuos metálicos liberados de los implantes va a determinar que se acumulen en los tejidos próximos al implante o que, por el contrario, puedan llegar al torrente circulatorio y distribuirse de forma sistémica por todo el organismo, mediante diferentes mecanismos de transporte. De esta manera y, dependiendo también de su forma química, pueden depositarse en diferentes órganos y tejidos donde podrían producir efectos tóxicos, o pueden ser metabolizado y/o excretados [78]. Por lo tanto, aunque el conocimiento de la concentración total de los metales traza liberados por las prótesis en los fluidos biológicos proporciona una información muy valiosa que puede ser utilizada en estudios clínicos con el fin de evaluar, por ejemplo, la biocompatibilidad de dichas prótesis. No permite comprender

realmente los efectos adversos que, a corto o largo plazo, pueden provocar dichos metales en el organismo humano. De ahí, la necesidad de llevar a cabo estudios de especiación metálica en fluidos biológicos.

Los estudios de especiación de los metales liberados por los implantes (Cr, Co y Ti) realizados hasta la fecha son bastante escasos y abordan fundamentalmente las posibles asociaciones metal-proteína en suero humano.

El suero humano (fase líquida remanente, después de que la sangre haya coagulado, y que carece de factores de coagulación incluyendo el fibrinógeno) es una mezcla muy compleja y heterogénea de: agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, proteínas y hormonas. La composición de agua y electrolitos del suero es la misma que la de todos los líquidos extracelulares y la concentración de proteína total (alrededor de 75 g L^{-1}) constituye casi toda la masa de los solutos presentes en el mismo. Las proteínas séricas son una mezcla muy numerosa (se han identificado más de 125 proteínas séricas) y compleja, formada no sólo por proteínas simples, sino también por proteínas conjugadas (glicoproteínas y lipoproteínas) de muy diferente concentración y numerosos anticuerpos.

Las principales proteínas séricas son la **albúmina** y las **globulinas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β y γ)**. *La albúmina* es la proteína más abundante del suero, su contenido es de $35\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$ y comprende cerca del 60% del contenido proteico total. La albúmina humana consiste en una cadena polipeptídica de 585 aminoácidos y contiene 17 puentes disulfuros. Debido a su peso molecular relativamente bajo (69 KDa) y a su elevada concentración, se piensa que es responsable del 75 al 80% de la presión osmótica del suero humano. También es la encargada de transportar sustancias de naturaleza química muy diversa, como ácidos grasos, metales, bilirrubina, tiroxina y numerosos fármacos, facilitando la transferencia de muchas de ellas desde la circulación sanguínea a órganos como el hígado, el riñón, el intestino y el cerebro. En cuanto a su función como transportadora de

A. INTRODUCCIÓN

metales se han propuesto diferentes sitios de unión de metales (como Cu, Ni y Cd), a la albúmina [211,212].

Las globulinas se dividen en 3 grupos: globulinas alfa (9-15% de la proteína sérica total), globulinas beta (8-13%) y globulinas gamma (14 -19%). La principal beta-globulina es la *transferrina*, proteína encargada del transporte del hierro en el organismo; es decir, transporta iones férricos desde los lugares de almacenamiento de hierro (ferritina intracelular o mucosal) hacia la médula ósea. La transferrina consiste en 687 aminoácidos y posee un peso molecular de alrededor de 80 KDa. Posee 2 dominios homólogos, cada uno de los cuales tiene un sitio de unión con alta afinidad por el hierro. La concentración sérica normal de la transferrina oscila entre 2 a 4 g L⁻¹ [213].

En la Figura A.16 están representados los niveles de concentración a los cuales están presentes las principales proteínas en el suero (más la hemoglobina (Hb), presente en los eritrocitos).

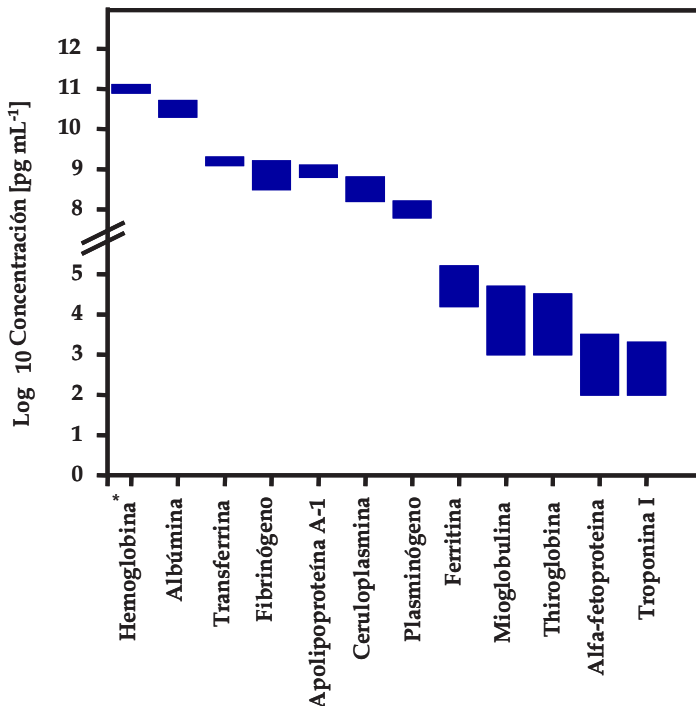


Figura A.16. Niveles de concentración de las principales proteínas séricas y Hb.

Todas las proteínas presentes en suero son potenciales transportadoras de los metales traza, como los liberados por las prótesis metálicas. En este sentido, N.J. Hallab y col [214], fueron los pioneros en realizar estudios de especiación de **romo** en el suero de pacientes portadores de prótesis de cadera, en aquellos pacientes con niveles elevados de este metal en suero. Sin embargo, dichos estudios los realizaron *in vitro* incubando el suero de los pacientes con CrCl_3 . A continuación, llevaron a cabo la separación de las proteínas séricas según sus pesos moleculares; utilizando una columna superdex 200 y detección mediante absorción UV, y también según su punto isoeléctrico usando geles de acrilamida. Tras los estudios realizados observaron que el Cr estaba asociado tanto a proteínas de ~ 70 KDa de peso molecular, como a proteínas de mayor peso molecular ~ 180 KDa (140 a 250 KDa). Concluyendo, que con dicho estudio no se podía especificar las proteínas a las cuales se unía exactamente el Cr. Previamente otros estudios [215], habían obtenido los mismos resultados, observando además, que el estado de oxidación influía en la unión a proteínas, ya que si el Cr se adicionaba como cromato de potasio [Cr (VI)] se enlazaba principalmente a los leucocitos y eritrocitos y no al suero [216], al igual que ocurría al adicionar Co en forma de cloruro de cobalto [(Co (II)]. Sin embargo, cuando el Cr se incubaba en forma de cloruro de cromo [Cr (III)] no se enlazaba a dichos eritrocitos. Estudios realizados mucho más recientemente [217] también confirman la unión del **cobalto** a los eritrocitos (tras la incubación de sangre con $^{57}\text{CoCl}_2$ y medida mediante “gamma-counting”). Por otro lado, otros estudios han demostrado que la proteína albúmina es capaz de enlazar al Co tras incubar una disolución del metal con un estándar de dicha proteína [218] o con el suero [219]. Lo que pone de manifiesto el interés actual en la elucidación de las proteínas que transportan a dichos metales en el organismo vivo.

También se han realizado estudios de especiación realizados tras la administración de cromo a ratas; Hopkins y Schwarz [220] observaron que aproximadamente el 90% del cromo en el suero, cuando se administraba en

A. INTRODUCCIÓN

forma de cloruro de cromo [Cr (III)] a las ratas (gastrointestinalmente), estaba asociado a la fracción de las beta globulinas (transferrina), y este elemento se enlazaba, además, a otras proteínas como la albúmina o gamma globulinas cuando se administraba en mayores concentraciones (dichos estudios se realizaron mediante el marcaje del suero con ^{51}Cr). Estos resultados fueron corroborados por otros autores los cuales ponían además de manifiesto que la vía de administración del Cr (intravenosa [221], oral [222] o gastrointestinal [231]) no parecía modificar dichos resultados. Sin embargo, en lo que sí parece influir la vía de administración es en los distintos órganos en los que se va a acumular el metal. De este modo, observaron que tras exponer a las ratas a cromo (como CrCl_3) vía gastrointestinal, el Cr se tendía a acumular en el pulmón, riñón, hígado y bazo, en cambio en trabajadores (soldadores) expuestos a cromo (fundamentalmente como Cr(VI)), en los cuales la vía de entrada es oral parece acumularse fundamentalmente en el pulmón [223].

Con estos estudios se demostró que tanto la ruta de absorción, como la especie administrada, junto con la dosis son aspectos críticos en la acumulación de dichos metales.

En el caso del **manganeso**, las primeras publicaciones orientadas a su especiación [224] habían sugerido a la proteína transferrina como principal transportador de Mn en suero, aunque en dichos estudios, se realizaba previamente a la especiación, una incubación del suero con Mn tras oxidarlo del estado de oxidación Mn^{2+} a Mn^{3+} (estado de valencia que parece ser el predominante para este elemento en el suero). Otras proteínas como la albúmina o la α -2 macroglobulina también se habían publicado como posibles transportadores de este elemento en suero [225]. Recientemente B. Michalke y col. [226] tras realizar estudios de especiación mediante SEC-ICP-MS en líquido cefaloraquídeo (LCR) llegaron a la conclusión de que así como la transferrina y la albúmina son las principales transportadoras de Mn en suero, en LCR los principales transportadores son especies de bajo peso molecular (p.ej. citratos)

y que, por tanto, serán los responsables de que el Mn atraviese las barreras celulares independientemente del receptor de la transferrina.

El caso del **titanio** requiere una mención un poco especial ya que a pesar de su importancia, la especiación química de Ti estuvo hasta la presente Tesis Doctoral muy lejos de poder llevarse a cabo *in vivo* en muestras biológicas (y más lejos aún, si se pretendía realizar de forma cuantitativa), debido entre otras, a las siguientes causas:

- 1) No es un elemento esencial y además, no parecía desprenderse de los implantes metálicos, que eran la principal fuente de exposición.
- 2) Una vez demostrada la presencia de este elemento a niveles de ultratrazas en fluidos biológicos, no se disponía de metodologías analíticas suficientemente sensibles para determinar con exactitud y de forma reproducible las diferentes especies en las que el metal se encontraba distribuido.

Estos hechos hacen que los pocos trabajos que se han realizado hasta la fecha en este campo hayan sido estudios *in vitro*. De este modo, cabe destacar el estudio llevado a cabo por A.D. Tinoco y col. [227,228] en el cual tras incubar las proteínas (albúmina y transferrina) con citrato de titanio observaron como el Ti se unía preferentemente a la transferrina con una altísima constante de afinidad. Así como el estudio de A. Sarmiento y col. [229] en los que tras la previa incubación del suero de un paciente con citrato de titanio (previamente sintetizado en el laboratorio), llegan a la conclusión de que el complejo Ti-transferrina es termodinámicamente inestable y se puede disociar durante el proceso de separación.

Actualmente, gran parte de la investigación enfocada en la especiación del titanio se orienta a su utilización como potencial droga anticancerígena (p.ej. el titanoceno). Así, M. Guo y col. [230] propusieron que la actividad anticancerígena de este tipo de drogas derivaba de la unión del Ti (IV) a la transferrina. No obstante, la asignación de la transferrina como la única

A. INTRODUCCIÓN

proteína capaz de unirse al Ti (IV) es un tema sobre el que actualmente continúa existiendo cierta controversia.

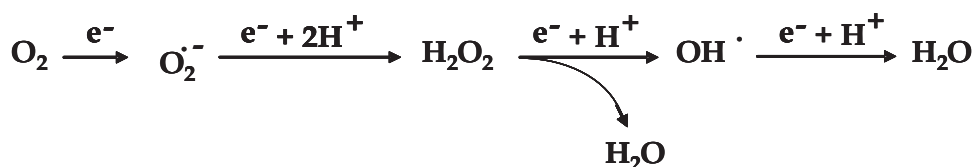
Aunque la mayor parte de los estudios presentados han sido estudios *in vitro*, lo cual permite la construcción de bases de datos con las posibles interacciones metal-proteína, se pierde la información biológica acerca de los niveles de expresión relativos, procesos transduccionales y modificaciones que pudiesen ocurrir *in vivo* y que ser verían afectados por la presencia de estos metales. Por ello sigue siendo de vital importancia tratar de realizar dichos estudios a los niveles presentes en el suero o en los tejidos, sin previa adición del metal al suero o a los tejidos sobre el cual se quiere llevar a cabo la especiación.

A.3. ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN A METALES

Una de las paradojas de la naturaleza es que el oxígeno, imprescindible para mantener la vida de los organismos aerobios, es también el punto de partida para la producción, durante el metabolismo celular, de especies oxidantes muy reactivas (especies reactivas de oxígeno, ROS) que pueden dañar a las biomoléculas esenciales para el desarrollo y crecimiento de las células. Por ello, los organismos aerobios han tenido que desarrollar una serie de estrategias adaptativas para paliar la producción indeseada de dichas especies oxidantes y minimizar sus efectos. De esta modo, se mantiene un balance de óxido-reducción constante (homeostasis redox), preservando el equilibrio entre la producción de las especies oxidantes (ROS) y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida de este balance de óxido-reducción, a favor de las ROS, lleva a una situación conocida como *estrés oxidativo* [231,232] cuya relación con los mecanismos fisiopatológicos para la iniciación y desarrollo de enfermedades de notable morbilidad y mortalidad (aterosclerosis, cáncer, diabetes, Alzheimer, Parkinson, etc.) constituye una área de investigación de enorme interés y actualidad [233].

A.3.1 Formación y toxicidad de las especies reactivas de oxígeno

En la mayoría de las células aerobias más de 95% del oxígeno consumido por ellas es reducido a agua por el mecanismo respiratorio mitocondrial, en cuya etapa final 4 electrones y 4 protones son transferidos casi simultáneamente a una molécula de oxígeno para formar agua ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$). Sin embargo, pequeñas cantidades de oxígeno (menos del 5%) pueden ser metabolizadas por otras vías, en las cuales se produce la reducción univalente o monovalente del oxígeno por etapas, de acuerdo con las siguientes reacciones:

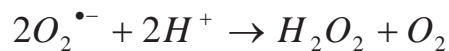


A. INTRODUCCIÓN

Como se puede observar en dichas reacciones, durante la reducción del oxígeno se generan especies químicas intermedias muy inestables y altamente reactivas, que normalmente suelen tener un electrón desapareado (radicales libres). Estas especies son conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS) y las principales son:

- *El radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)*: considerado la ROS primaria de la cual derivan, directamente o mediante catálisis, todas las demás ROS (secundarias). Se forma por la reducción univalente (captando un electrón) del oxígeno molecular, fundamentalmente durante la respiración celular, pero también en otros procesos enzimáticos como reacciones catalizadas por oxidasas/deshidrogenasas, flavoproteínas y metaloproteínas, por lo que es la ROS más abundante [234]. Carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas biológicas, ya que posee una vida media del orden de milisegundos. Sin embargo, puede iniciar la cadena de formación de otras ROS, directamente, o más frecuentemente a través de procesos catalizados por enzimas o metales.

- *El peróxido de hidrógeno (H_2O_2)*, el cual se forma por dismutación (espontánea o enzimática) del radical anión superóxido:



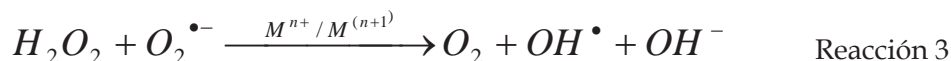
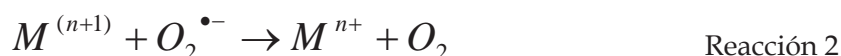
Aunque no se trata de un radical libre, es considerado una ROS debido a su capacidad para generar radicales libres, entre ellos, el potente radical hidroxilo. Además, el H_2O_2 al ser una molécula pequeña y sin carga presenta una importante difusión tisular, pudiendo atravesar las membranas celulares y dar lugar a efectos adversos a mayor distancia que otras ROS.

- *El radical hidroxilo ($OH\cdot$)*, el cual es la ROS más dañina de todas; ya que es capaz de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas muy rápidamente (su tiempo de vida es de 10^{-9} segundos). Se forma por

descomposición del H_2O_2 catalizada por metales de transición, mediante la reacción de Fenton [235].



M representa el metal, que es oxidado ($M^{n+} \rightarrow M^{n+1} + e^-$) durante el proceso. Para que el metal actúe como un auténtico catalizador, la Reacción 1 debe ir seguida de un paso de reducción ($M^{n+1} + e^- \rightarrow M^{n+}$) para regenerar la forma metálica que participa en la reacción de Fenton. Cuando el agente de reducción es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Reacción 2), la suma de las reacciones 1 y 2 forma el ciclo propuesto por Haber y Weiss (Reacción 3) [236].



La reacción de Fenton fue descrita para el hierro y las especies que participan son Fe^{2+}/Fe^{3+} . Sin embargo, también pueden actuar como catalizadores otros metales de transición (reacciones llamadas tipo Fenton), las parejas redox propuestas son: Cu^{1+}/Cu^{2+} , Cr^{2+}/Cr^{3+} , Cr^{5+}/Cr^{6+} , Co^{2+}/Co^{3+} , Ti^{3+}/Ti^{4+} y V^{4+}/V^{5+} [86,237,238].

Tanto el radical anión superóxido, como el hidroxilo y el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con otras moléculas biológicas (orgánicas o inorgánicas) para generar nuevas especies muy reactivas. Entre ellas, se encuentran los radicales alcoxil y peroxil (generados por acción de las ROS sobre las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados), el radical semiquinolona, los radicales hipoclorito y peroxinitrito, etc. [239].

Aunque la *fente endógena* de ROS más importante es el sistema mitocondrial de transporte de electrones, existen otros procesos metabólicos inherentes al organismo donde también se producen pequeñas cantidades de

A. INTRODUCCIÓN

ROS, debido a la actividad de diferentes enzimas. Así, se producen ROS durante la detoxificación de compuestos xenobióticos (contaminantes ambientales, fármacos, etc.) mediante reacciones de oxidación catalizadas por las enzimas citocromo P450 [240]; durante la síntesis de prostaglandinas, en la fase de transformación del ácido araquidónico en endoperóxidos bajo la acción de las enzimas ciclooxigenasas [241]; en el metabolismo del ácido úrico durante la depuración de las xantinas por acción de las xantina oxidasas [242]; y en las células fagocíticas activadas (macrófagos) durante procesos inflamatorios, donde las enzimas NADPH oxidasas generan ROS como mecanismo de defensa frente al agente inflamatorio (bacteria, partículas de diferente naturaleza, etc.) [243,244].

Las ROS también se pueden producir por *fuentes exógenas*, entre las que se incluyen la exposición al ozono, el humo del tabaco, las radiaciones ionizantes y no ionizantes, los pesticidas, fármacos, metales, etc. [245-248].

Las ROS son especies tremendamente reactivas, capaces de oxidar indiscriminadamente muchas estructuras biológicas fundamentales para la viabilidad celular como: ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o proteínas, alterando su función [249,250]. Así, las ROS producen la peroxidación (conversión oxidativa de ácidos grasos insaturados a hidroperóxidos) de los lípidos de las membranas celulares, con lo que las estructuras fosfolipídicas de las membranas se desorganizan y destruyen, lo que a la larga puede comprometer su funcionalidad [251,252]. También oxidan a los aminoácidos de las proteínas alterando su conformación y/o actividad catalítica, lo que desemboca en un efecto más o menos perjudicial, dependiendo de la función de dicha proteína [253,254]. En el caso de los ácidos nucleicos, pueden generar cortes en su cadena y modificaciones de las bases nitrogenadas, especialmente en el caso del ADN [254,255] el hecho de que estas lesiones puedan ser transmitidas a otras células si la portadora se divide, hace que las ROS se consideren como mutágenos [256].

A.3.2 Mecanismos celulares de defensa frente a las especies reactivas de oxígeno

En los organismos aerobios las ROS se están continuamente produciendo (de forma natural), debido al metabolismo celular y son esenciales para el control fisiológico del funcionamiento de la célula [257]. De hecho, existen una gran cantidad de evidencias experimentales que muestran que los organismos vivos utilizan las ROS para determinados procesos vitales para la función celular [258]. Sin embargo, dado que estas especies son muy oxidantes su concentración tiene que mantenerse en un determinado nivel para no producir daño celular. Esto ha llevado a los organismos aerobios a desarrollar un importante sistema de defensa frente a las ROS que actúa por medio de distintos mecanismos: impidiendo su formación (sistema de prevención); eliminando las ROS una vez formadas o inhibiendo sus efectos (sistema de eliminación); o favoreciendo la reparación y/o la eliminación de las moléculas o estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación) [259,260].

El sistema defensivo primario esta formado por especies antioxidantes que actúan eliminando directamente a las ROS y constituyen la principal barrera frente a ellas. Estas especies antioxidantes se pueden clasificar en:

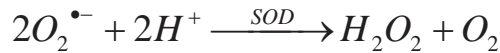
- *Antioxidantes no enzimáticos*: moléculas no proteicas que son capaces de neutralizar las ROS; ya sea por su carácter reductor, por su capacidad de enlazar los metales que intervienen en la formación de las ROS, o por que actúan como cofactores de antioxidantes enzimáticos. Algunos de los más importantes son: ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión, carotenoides, flavonoides y ácido úrico, entre otros [233].

- *Antioxidantes enzimáticos*: enzimas que catalizan reacciones en las que utilizan a las ROS como sustratos, transformándolas en productos más estables y sin propiedades oxidantes. Debido a que actúan como catalizadores, para ejercer su efecto sólo se necesita que estén presentes en pequeñas

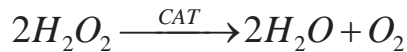
A. INTRODUCCIÓN

cantidades y son eficientemente recicladas después de su actuación [261]. Las enzimas antioxidantes más importantes son:

- *Las superóxido dismutasas (SODs)*: que catalizan la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente reacción:

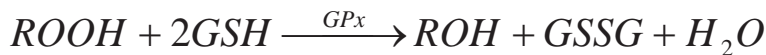
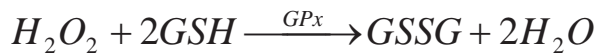


- *La catalasa (CAT)*: que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular como se muestra en la siguiente reacción:



La cual actúa, fundamentalmente, cuando la concentración de peróxido de hidrógeno es baja.

- *Las glutatión peroxidasas (GPXs)*: que catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno y la de los hidroperóxidos orgánicos (ROOH, R grupo alquilo) a agua en el primer caso, y alcoholes estables y agua en el segundo; mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) de acuerdo con las siguientes reacciones:



Las GPx son más importantes que la enzima catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno, ya que actúan a niveles bajos de éste.

Estos enzimas antioxidantes actúan conjuntamente como se muestra en la Figura A.17. Como se puede observar en dicha Figura, el GSSG se regenera por acción de la NADPH catalizada por el enzima glutation reductasa (GR).

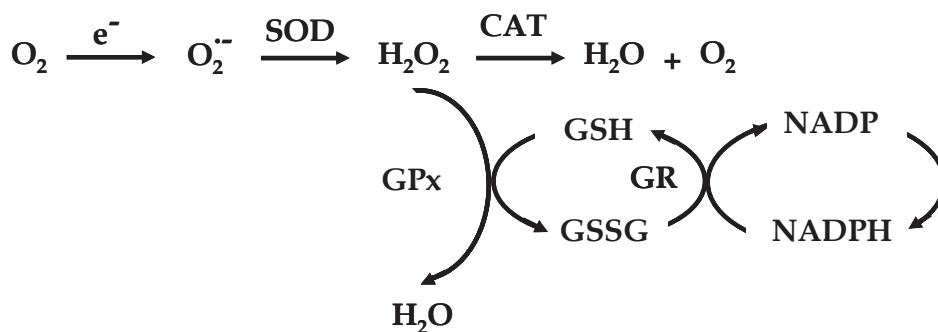


Figura A.17. Acción conjunta de los sistemas antioxidantes enzimáticos

A.3.3. Causas de inducción de estrés oxidativo y sus consecuencias sobre la salud

Como se mencionó anteriormente, el desequilibrio entre la generación y la eliminación de las ROS se conoce como *estrés oxidativo* y puede venir causado o inducido por algunas situaciones patológicas o ambientales.

Algunas de las causas más comunes que pueden inducir unos niveles de ROS anormalmente altos en el organismo y, por tanto, pueden provocar estrés oxidativo, son:

1. *Exceso de ejercicio físico*: se incrementa notablemente el consumo de O_2 para obtener energía y con ello la producción de ROS.
2. *Hiperglucemia*: altos niveles de glucosa en sangre estimulan la producción de ROS por diferentes mecanismos, autoxidación de la glucosa, intensificación de la cadena de transporte de electrones, etc.
3. *Exposición a radiaciones ultravioleta*: inducen la formación del radical anión superóxido.

A. INTRODUCCIÓN

4. *Procesos de isquemia-reperfusión*: en la fase de isquemia y, por tanto, de aporte de oxígeno insuficiente, un fallo energético de la bomba Na-K-ATPasa de membrana provoca un aumento de calcio en el interior de la célula. Esto activa una proteasa que irreversiblemente convierte la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa. De forma paralela el ATP celular es catabolizado hasta hipoxantina que se acumula. Posteriormente, en la reperfusión, el oxígeno, la hipoxantina y la xantina oxidasa se combinan para generar el radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno que dañan la célula.

5. *Exposición a xenobióticos*: el metabolismo celular inicia la detoxificación de compuestos xenobióticos hidrófobos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) o los bifenilos policlorados (PCB's) aumentando su hidrofiliidad mediante reacciones de oxigenación. Pero en estos procesos catalíticos, mediados por la familia de enzimas citocromo P450, se producen de manera indeseada ROS con una frecuencia muy elevada.

6. *Elevados niveles de metales libres en el organismo*: los metales actúan como catalizadores de las reacciones por las que el O_2 se transforma en alguna de las ROS. De hecho, los principales metales liberados por los implantes ortopédicos y dentales (Cr, Co y Ti) son metales redox que pueden generar dichas especies reactivas de oxígeno, principalmente el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) via la reacción de Fenton [235] y Haber Weiss [236] ya comentadas.

7. *Procesos inflamatorios*: los glóbulos blancos (neutrófilos y macrófagos) al encontrarse con un agente infeccioso (p.ej. las partículas metálicas procedentes de las prótesis) experimentan un aumento en el consumo de oxígeno denominado "explosión respiratoria", capaz de generar mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa de membrana abundantes ROS para luchar contra el agente infeccioso.

Esta claro, por lo tanto, que uno de los efectos secundarios que se puede producir en el organismo humano, como consecuencia del desgaste y/o la corrosión de las prótesis metálicas es el estrés oxidativo derivado de la presencia de los residuos metálicos (partículas e iones). De hecho, existen ya bastantes trabajos en los que se describe un aumento del daño oxidativo relacionado con las prótesis metálicas [86,262-265].

La oxidación masiva de biomoléculas de diversa naturaleza (ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos), producida por el estrés oxidativo (desequilibrio crónico producción/inactivación de ROS) puede generar múltiples patologías [233]. En muchos casos, la relación entre la patología y el estrés oxidativo aún no ha sido bien establecida, por lo que supone, en la actualidad, una vía de investigación de enorme interés. Entre las patologías más relevantes vinculadas al estrés oxidativo podemos citar:

- *Cáncer*: las ROS, principalmente el radical hidroxilo, pueden reaccionar con el ADN formando aductos que si no son reparados correctamente por los sistemas de reparación del organismo pueden derivar en mutaciones [266]. Si las mutaciones se producen en genes reguladores del ciclo celular pueden causar la aparición de cáncer [267-270]. Se ha observado que las células tumorales tienen unos niveles de ROS muy por encima de las células sanas del mismo tejido [271].

- *Enfermedades cardiovasculares*: existen indicios de que el estrés oxidativo puede causar daños en el tejido muscular del corazón incrementando el riesgo de infarto de miocardio [272-274]. También parece haber una asociación entre estrés oxidativo y aterosclerosis [248,275].

- *Enfermedades neurodegenerativas*: aunque la relación causa-efecto sigue sin estar clara, se ha constatado la asociación entre enfermedades neurodegenerativas de elevada incidencia como el Alzheimer o el Parkinson y el estrés oxidativo [276-283].

A. INTRODUCCIÓN

- *Diabetes Mellitus*: muchos de los problemas secundarios asociados a esta enfermedad pueden ser provocados por el estrés oxidativo derivado de la hiperglucemia [284].

- *Artritis reumatoide*: los procesos inflamatorios que causan los síntomas de esta enfermedad autoinmune implican un incremento descontrolado de la producción de ROS en el tejido sinovial de las articulaciones, provocando la destrucción parcial de dicho tejido [285].

- *Envejecimiento*: aunque existen varias teorías para explicar las causas del envejecimiento, la que goza de más aceptación es la teoría del envejecimiento causado por radicales libres. Según esta teoría, el envejecimiento es consecuencia de la acumulación de daños causados por las ROS que se producen a lo largo de toda la vida en la cadena de transporte de electrones [259,286-289].

A.3.4 La enzima superóxido dismutasa como biomarcador del estrés oxidativo

De lo expuesto en apartados anteriores, se hace patente la importancia de la monitorización de las ROS, para poder evaluar el papel del estrés oxidativo en la génesis y/o patogénesis de enfermedades de gran incidencia en la salud de la población de los países industrializados; así como para estudiar sus implicaciones en los cada vez más numerosos pacientes portadores de prótesis e implantes metálicos.

El seguimiento analítico del estrés oxidativo se lleva a cabo, generalmente, mediante la medida de biomarcadores del mismo, es decir, biomoléculas que reflejan los cambios medibles (ya sean éstos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos) que se asocian a la exposición o los efectos a las ROS. Existen dos grandes grupos de biomarcadores de estrés oxidativo [290]:

- *Los subproductos o productos finales del daño oxidativo*: sustancias que se originan como consecuencia del daño de las ROS en las biomoléculas (lípidos,

carbohidratos, proteínas, ADN). En este grupo se incluyen, entre otros: los aldehídos formados en la peroxidación de lípidos (p.ej. el 4-hidroxinonenal) y los productos resultantes de la oxidación de las bases del ADN (p.ej. la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina).

- *Los cambios en los agentes antioxidantes:* como ya se describió anteriormente, para intentar mantener el balance redox celular existen agentes antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos cuya concentración varía en respuesta a los cambios en el nivel de las ROS.

En el grupo de los oxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasas (SODs), que constituyen la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo. Estas enzimas están presentes en eritrocitos humanos a niveles relativamente elevados, y debido a que la toma de muestra de sangre es mucho más sencilla y menos agresiva que la toma de otro tipo de muestras (p.ej. tejidos), la medida de las SODs en eritrocitos, es uno de los biomarcadores más utilizados para la monitorización del estrés oxidativo [264,291,292].

A.3.4.1 Características generales de las superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SODs, EC 1.15.1.1), son un grupo de metaloenzimas que contienen un ión metálico de transición (Cu, Zn, Fe o Mn) en su sitio activo. Se conocen cuatro formas de SODs, cuyas características principales se recogen en la Tabla A.IV [293]. Estas a su vez pueden dividirse en 2 familias filogenéticas diferentes: Cu,Zn-SODs y Fe/Mn-SODs, entre las que no existe homología de secuencias ni de estructuras de orden superior, lo que indica que evolucionaron independientemente a partir de genes diferentes en respuesta a una presión evolutiva común: la presencia del oxígeno y la amenaza de su toxicidad [294]. En humanos solo existen las formas Cu,Zn-SOD citosólica (SOD1), Mn-SOD mitocondrial (SOD2) y la Cu,Zn-SOD extracelular (EC-SOD o SOD3), ampliamente distribuidas en prácticamente todos los tejidos del organismo. Todas las SODs actúan catalizando la conversión del radical

A. INTRODUCCIÓN

superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (ver Figura A.17), en una de las reacciones catalizadas por enzimas más rápida que se conoce [294].

Tabla A.IV. Principales características de las SODs

Tipo	Peso Molecular (KDa)	Estructura	Localización	Distribución
Cu,Zn-SOD	32	<i>Dímero</i>	<i>Citosol</i>	<i>Eucariontes y algunos procariontes</i>
Cu,Zn-SOD	160	<i>Tetrámero</i>	<i>Extracelular</i>	<i>Mamíferos, pájaros y peces</i>
Mn-SOD	80	<i>Tetrámero</i>	<i>Mitocondrial</i>	<i>Todos los aerobios</i>
Fe-SOD	40 o 80	<i>Dímero o Tetrámero</i>	<i>Citosol, cloroplasto o mitocondrias</i>	<i>Procariontes y algunos eucariontes</i>

Esta enzima citosólica, está constituida, en su forma nativa, por 2 subunidades idénticas, de peso molecular aproximado igual a 16 KDa (peso molecular del dímero alrededor de 32 KDa) y de 151 a 153 aminoácidos, unidas por puentes disulfuro. Cada una de estas cadenas tiene un puente disulfuro intracatenario, un grupo sulfhidrilo y un resto amino terminal acetilado [295]. En su composición de aminoácidos se destaca la existencia de 25 residuos de glicina por cada subunidad, que constituyen casi el 1/6 del total de aminoácidos y se distribuyen uniformemente a lo largo de la secuencia. Esto hace que la hoja β sea una característica prominente de la estructura secundaria de esta enzima, como se muestra en la Figura A.18. El contenido de aminoácidos aromáticos se caracteriza por la presencia de 8 residuos de fenilalanina, la escasez de tirosina (2 residuos) y la ausencia de triptófano.

Cada subunidad tiene unido un átomo de Cu^{2+} (esencial para su acción catalítica y sin el cual este enzima pierde su actividad [296]) y uno de Zn^{2+} (que desempeña un papel estructural de estabilización del enzima [297]).

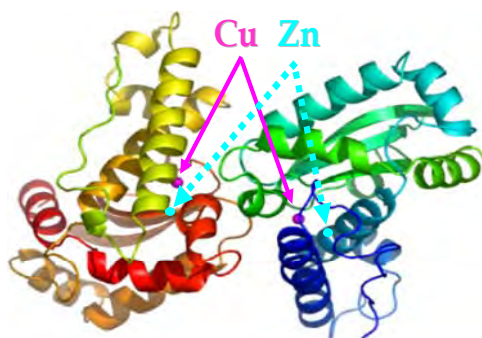


Figura A.18. Estructura cristalina de la enzima Cu,Zn-SOD humana

El centro activo del enzima, cuya estructura se ha podido determinar por difracción de rayos X (Figura A.19) [298], está constituido por un ión de Cu^{2+} coordinado a los nitrógenos imidazólicos de 4 residuos de histidina con una configuración cuadrado plana distorsionada.

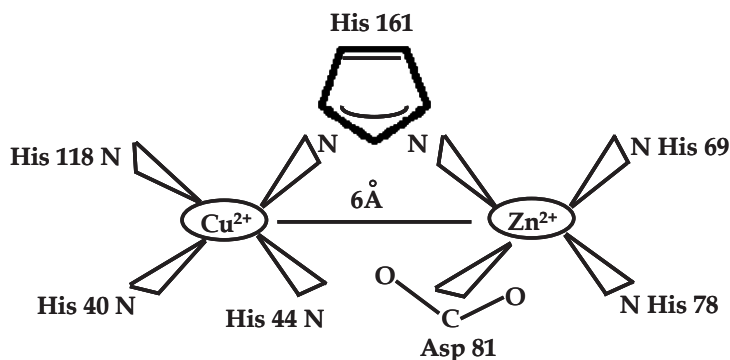
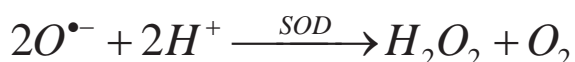
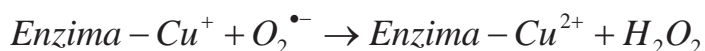


Figura A.19. Estructura del centro activo de la enzima Cu,Zn-SOD

En dicha Figura se puede observar cómo uno de los imidazoles unidos al cobre está desprotonado y coordinado también al ion Zn^{2+} , sirviendo como puente entre los 2 iones. A su vez, el zinc está unido a dos restos adicionales de histidina y a un resto de ácido aspártico a través del grupo carboxílico [297].

A. INTRODUCCIÓN

Las reacciones redox involucradas en la acción antioxidante del enzima tienen lugar mediante un mecanismo de oxidación/reducción cíclica en dos etapas a través del cofactor metálico cobre, de acuerdo con las siguientes reacciones:



A.3.4.2 Métodos de determinación de la Cu,Zn-superóxido dismutasa

Las metodologías, sin duda, más utilizadas para la monitorización de la Cu,Zn-SOD como biomarcador de estrés oxidativo en muestras de sangre y tejidos humanos se basan en la medida de su actividad enzimática, mediante métodos espectrofotométricos [301-306]. La medida de la actividad de SOD presenta un gran problema, poco frecuente en ensayos enzimáticos habituales, derivado de la inestabilidad intrínseca en medios acuosos de su sustrato (el radical anión superóxido). Por ello, dicha determinación se lleva a cabo de forma indirecta utilizando dos componentes: un generador del radical anión superóxido y un detector del mismo [299]. El generador produce el radical superóxido a una velocidad controlada constante. En ausencia de SOD, el radical superóxido se acumula hasta llegar a una concentración tal que la velocidad de reacción con el detector se iguale con la velocidad de producción, consiguiéndose este estado de equilibrio en más o menos un segundo. Si la SOD está presente, compite con el detector por el radical superóxido, produciéndose una disminución del radical superóxido captado por el detector, manifestándose ésta en una inhibición de la señal (absorbancia) del detector. De esta manera se considera como una unidad de actividad de SOD a la actividad

de esta enzima que produciría un 50% de la máxima inhibición causada por este enzima sobre la señal del detector [300].

Existen diferentes ensayos espectrofotométricos dependiendo del generador de radical superóxido y el detector que empleen. El generador del radical superóxido es normalmente el sistema xantina/xantina oxidasa mientras que como detectores pueden usarse: el citocromo c [300], la adrenalina [301], el azul de nitrotetrazolium [302], la hidroxilamina [303] o la sulfanilamida [304]. Sin embargo, el método espectrofotométrico más utilizado es el ensayo del pirogalol [305,306]. En este método, el generador de radical superóxido y el detector son el reactivo de pirogalol, compuesto orgánico que se autooxida en medio básico generando en el medio de reacción radicales superóxido, especie que es secuestrada por la SOD. Por lo que se mide el efecto inhibitor del enzima sobre la autooxidación del pirogalol, que puede ser monitorizado espectrofotométricamente a 420 nm.

Los ensayos comentados miden la actividad enzimática de la Cu,Zn-SOD y presentan una serie de ventajas, como son: rapidez, el tratamiento de muestra suele ser sencillo y el tiempo de medida corto; bajo coste, los reactivos son baratos y solo se necesita un espectrofotómetro para la medida; y muy buena sensibilidad. Sin embargo, también presentan inconvenientes; así, están afectados por bastantes interferencias; la reproducibilidad es baja, ya que la actividad de un enzima es muy sensible a factores como la temperatura, el pH, efectos de matriz (inhibidores de la actividad, interferentes, etc.), pequeñas variaciones en estos factores pueden ser una fuente de error de mucho peso en los resultados obtenidos; y, sobre todo, la falta de cuantitatividad, los ensayos de actividad enzimática sólo revelan información acerca de la actividad de un enzima (unidades de actividad enzimática), no de la concentración absoluta de la misma.

Además, en el caso de la medida de la actividad de la SOD, dada la definición de unidad de actividad enzimática, los valores obtenidos de

A. INTRODUCCIÓN

actividad son valores relativos; es decir, dependen del ensayo enzimático utilizado y, por tanto, no es posible la comparación entre los resultados obtenidos por cada uno de estos ensayos. De este modo, no es de extrañar encontrar valores normales (personas sanas) de SOD en eritrocitos humanos de: 913 U g^{-1} hemoglobina [307]; $0,460 \text{ U g}^{-1}$ hemoglobina [308]; $98,9 \text{ U g}^{-1}$ hemoglobina [309]; dependiendo del método con el que se haya medido la actividad del enzima.

Cuando se precisa conocer la concentración absoluta de la enzima Cu,Zn-SOD en fluidos biológicos es necesario emplear los métodos ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). Utilizando kits comerciales con el anticuerpo anti-SOD es posible determinar concentraciones del enzima en fluidos biológicos inferiores a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ a través de medidas espectrofotométricas, como se muestra en la Figura A.20.

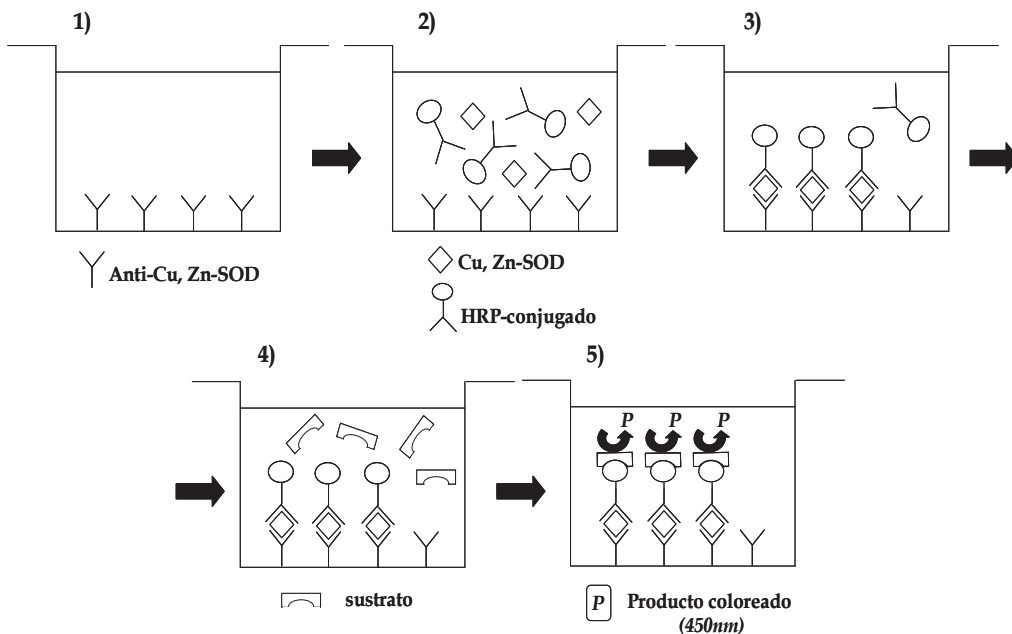


Figura A.20. Ensayo ELISA para la determinación de la concentración de Cu,Zn-SOD

En la figura anterior se pueden observar, esquemáticamente, los pasos seguidos para llevar a cabo dicha cuantificación:

- 1) Se añade el anticuerpo monoclonal específico de la enzima Cu,Zn-SOD (anti-Cu,Zn-SOD), el cual se inmoviliza en los micropocillos.
- 2) Se adiciona la disolución en la cual está presente el enzima Cu,Zn-SOD (muestra ó patrones). Esta enzima se enlazará a los anticuerpos anti-Cu,Zn-SOD. A continuación, se añade un anticuerpo monoclonal específico de la enzima Cu,Zn-SOD, conjugado con la enzima peroxidasa (HRP). Este último anticuerpo se enlaza a la enzima Cu,Zn-SOD (capturada por el primer anticuerpo).
- 3) Después de un tiempo de incubación se elimina el exceso de anticuerpo conjugado con la HRP que no hubiese reaccionado, mediante una etapa de lavado.
- 4) Se adiciona una disolución de sustrato específico de la enzima HRP conjugada al anticuerpo.
- 5) Finalmente, se mide la absorbancia a 450 nm del producto coloreado, formado en la reacción catalizada por la enzima (HRP), que es directamente proporcional a la cantidad de Cu,Zn-SOD que hubiese en la muestra (o en las disoluciones patrón).

Algunos autores han observado una disminución de la actividad de SOD, en suero y liquido cefalorraquídeo de pacientes con diversos tipos de daños vasculares cerebrales [310]. Mientras que se ha observado una mayor actividad de SOD en la enfermedad de Parkinson [311]. Igualmente, la actividad de SOD parece estar alterada en un gran número de tumores. Así, se ha encontrado que está disminuida en cáncer de estómago [312], cáncer hepático [313], en tumores cerebrales [314] y en cáncer de mama [315]. Estudios llevados a cabo en individuos con diabetes han mostrado que la actividad de SOD se encuentra disminuida en pacientes con diabetes insulina dependiente [316,317], mientras que está aumentada en madres con diabetes gestacional. En todas estas patologías se ha descrito el papel primordial desempeñado por la

A. INTRODUCCIÓN

SOD, sin embargo, no son las únicas ya que existen también otra serie de patologías en las que la actividad de SOD puede estar alterada. Así, por ejemplo, se ha detectado que la actividad de esta enzima parece disminuir al aumentar patológicamente la tensión arterial [318]. Por otra parte, también se ha encontrado que la actividad de SOD se encontraba disminuida en pacientes con artritis reumatoide [319] y con infecciones respiratorias [320]. En cuanto a los estudios realizados en pacientes portadores de prótesis son todavía escaso y los resultados contradictorios. Así en un estudio se concluyó que no habían observado un incremento significativo de la actividad de dicho enzima en el suero de los pacientes portadores de prótesis M/M [263]; en cambio en otro estudio observaron que la actividad del enzima SOD era aproximadamente un 65% menor en el suero de los pacientes tras 1 año o 2 desde la introducción del implante respecto a los controles y que este valor iba aumentando hasta equipararse con el de los controles (a los 3 años), o incluso llegaba a superarlo a los 4 años o más de su implantación [264].

A.4 REFERENCIAS

- [1] D. Arcos, I. Izquierdo-Barba y M. Vallet-Regí. *Promising trends of bioceramics in the biomaterials field*. J. Mater. Sci. Mater. Med. 20 (2009) 447-455.
- [2] L. Carmona, R. Gabriel, F.J. Ballina, A Laffon. *Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española. Metodología, resultados del reclutamiento y características de la población*. Rev. Esp. Reumatol. 28 (2001) 18-25.
- [3] A. Sargeant y T. Goswami. *Hip implants-Paper VI-Ion concentrations*. Materials & Design. 28 (2007) 155-171.
- [4] C. Wolner, G.E. Nauer, J. Trummer, V. Putz y S. Tschegg. *Possible reasons for unexpected bad biocompatibility of metal-on-metal hip implants*. Mater. Sci. Eng. 26 (2006) 34-40.
- [5] J.C. Fernandez-Lopez, A. Laffon, F.J. Blanco y L. Carmona. *Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain*. Clin. Exp. Rheumatol. 26 (2008) 324-332.
- [6] M. Maier. *Elastic stable intramedullary nailing of femur fractures in children*. Oper. Orthop. Traumatol. 20 (2008) 364-372.
- [7] N. Charles y M.D. Cornell. *Internal Fracture Fixation in Patients with osteoporosis*. J. Am. Aca. Orthop. Surg. 11 (2003) 109-119.
- [8] E. Robert y M.D. Zickel. *An intramedullary fixation device for the proximal part of the femur*. J. Bone Joint Surg. 58 (1976) 866-872.
- [9] L.V. Rush y L.H. Rush . *A reconstructive operation for comminuted fractures of the upper third of the ulna*. Am. J. Surg. 38 (1937) 332-333.
- [10] G.Küntschner. *Die Marknagelung von Knochenbrüchen*. Klin. Wschr, Langenbeck's (1940) 444-455.
- [11] I. Kempf, A. Crosse y D. Lafforfge. *L'apport de verrouillage dans l'enclouage centromedullaire des os longs*. Rev. Chir. Orthop. 64 (1978) 635-651.
- [12] R. Zanasi, F. Rotolo, P. Romano, V. Galmarini y L. Zanasi. *Intramedullary osteosynthesis*. Italian J. Orthop. Traumat. 16 (1990) 143-157.
- [13] P.G. Raynaud y J. Letenneur. *Treatment of delayed and nonunions of the humeral shaft using the seidel locking nail*. J. Orthop. Trauma. 8 (1994) 240-244.
- [14] H. Habernek, E. Orthner. *A Locking Nail for Fractures of the Humerus*. J. Bone Joint Surg. (Br). 73 (1991) 651-665.
- [15] A.F. Farragos, E. Schemitsch y M.D. Mckee. *Complication of intramedullary nailing for fractures of the humeral shaft: a review*. J. Orthop. Trauma. 13 (1999) 258-267.
- [16] N.J. Hallab. *A review of the biologic effects of spine implant debris: Fact from fiction*. SAS Journal. 3 (2009) 143-160.
- [17] A. Lambotte. *L'intervention opératoire dans les fractures récentes et anciennes envisagées particulièrement au point de vue de l'ostéo-synthèse*. H. Lamertin, Bruxelles. (1907).
- [18] W.A. Lane. *The operative treatment of fractures*. Medic. Publishing Co, London (UK). (1905).

- [19] F. Pauwels. *Der schenkelhalsbruch ein mecha-nisches problem*. Z. Orthop. Ihre. Grenzgeb. 63 (1935).
- [20] H.M. Sherman y D. Tait. *Fractures near joints and fractures into joints*. S.G.O. 19 (1914) 131-341.
- [21] M.E. Müller, M. Allgöwer, R. Schneider y H. Willenegger. *Manual der osteosynthese: AO technik*. Springer, Berlin-Heidelberg-New-York. (1977) 1-409.
- [22] P. Rommens, D. Endrizzi, J. Blum y R. White. *AO principles of fractures management*. AO Publishing, New York. (2000) 291-305.
- [23] A. Sarmiento, J. Waddell y L. Latta. *Diaphyseal humeral fractures: treatment options*. J. Bone Joint Surg. (Am). 83 (2001) 1566-1579.
- [24] R.S. Breederveld, P. Patka y J.C. Van Mourik . *Refractures of the femoral shaft*. Neth. J. Surg. 37 (1985) 114-116.
- [25] P.I. Branemark, R. Adell, U. Breine, B.O. Hansson. J. Lindstrom y A. Ohlsson. *Intraosseous anchorage of dental prostheses. Experimental studies*. J. Plast. Reconstr. Surg. 3 (1969) 81-100.
- [26] P.I. Branemark. *Osseointegration and its experimental background*. J. Prosthet. Dent. 50 (1983) 399-410.
- [27] C.A. Bain y P.K. Moy. *The association between the failure of dental implants and cigarette smoking*. Int. J. Oral Maxillofac. Impl. 8 (1993) 609-615.
- [28] R.W. Melanie y G.V. Stanley. *A review of selected dental literature on evidence-based treatment planning for dental implants: Report of the Committee on research in fixed prosthodontics of the academy of fixed prosthodontics*. J. Prosthet. Dent. 92 (2004) 447-462.
- [29] M. Santos, M. Campos y S. Line. *Early dental implant failure: a review of the literature*. Braz. J. Oral Sci. 1 (2002) 103-111.
- [30] D.F. Williams. *Definitions in biomaterials, progress in biomedical engineering*. Ed. Elsevier, Ámsterdam. 4 (1987) 291-363.
- [31] J. Charnley. *Biocompatibility of orthopaedic implants*. J. Bone Surg. 42 (1960) 28-30.
- [32] J.W. Nicholson. *The chemistry of medical and dental materials*. RSC Materials Monographs, Cambridge (UK). (2002).
- [33] T. Albrektsson, P.I. Branemark y H.A. Hansson. *The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone*. Ann. Biomed. Eng. 11 (1983) 1-27.
- [34] P.G. Laing, A.B. Ferguson y E.S Hodge. *Tissue reaction in rabbit muscle exposed to metallic implants*. J. Biomed. Mater. Res. 1 (1967) 135-149.
- [35] U. Meyer, D.H. Szulczewski, R.H. Barckhaus, M. Atkinson y D.B. Jones. *Biological evaluation of an ionomeric bone cement by osteoblast cell culture methods*. Biomaterials. 14 (1993) 917-924.
- [36] P. R. Walker, J. Leblanc y M. Sikorska. *Effects of aluminum and other cations on the structure of brain and liver chromatin*. Biochemistry. 28 (1989) 3911-3915.
- [37] E.P. Lautenschlager y P. Monaghan. *Titanium and titanium alloys as dental materials*. Int. Dent. J. 43 (1993) 245-253.

- [38] D.F. Williams. *Biocompatibility of clinical implant materials*. CRC Press, Boca Raton, EE.UU. (1981) 99-123.
- [39] J.T. Scales. *Arthroplasty of hip using the foreing materials: a history*. Inst. Mech. Eng. 63 (1967) 63-84.
- [40] G.K. McKee. *Developments in total hip joint replacements, Symposium on lubricatin and wear in living and artificial human joints*. Inst. Mech. Eng. 181 (1967) 85-89.
- [41] S.R. Brown, D.H Davies y D.H. DeHeer. *Long term survival of Mc-Knee-Farrar total hip prostheses*. Clin. Orthop. 402 (2002) 157-163.
- [42] J.H. Dumbleton y M.T. Manley. *Metal-on-Metal total hip replacement. What's the literature say?* J. Arthrop. 20 (2005) 184-188.
- [43] C. Rieker y P. Kottig. *In vivo tribological performance of 231 metal-on-metal hip articulations*. Hip International. 12 (2002) 73-76.
- [44] L.D. Dorr, Z. Wan y D.B. Longjohn: *Total hip arthroplasty with the use of the metasul metal-on metal articulation. Four to seven year results*. J. Bone Joint Surg. (Am) 82 (2000) 789-798.
- [45] P. Doorn, P.A. Campbell y H.C. Amstutz. *Metal versus polyethylene wear particles in total hip replacements*. Clin. Orthop. 329 (1996) 206-216.
- [46] A. Buford y T. Goswami. *Review of wear mechanisms in hip implants*. Mater. Design. 25 (2004) 385-393.
- [47] S.J. McDonald, R.W. McCalden, D.G. Chess, R.B. Bourne, C.H. Rorabeck y D. Cleland. *Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty*. Clin. Orthop. Rel. Res. 406 (2003) 283-296.
- [48] Y. Yan, A. Neville y D. Dowson. *Tribo-corrosion properties of cobalt-based medical implant alloys in simulated biological environments*. Wear. 263 (2007) 1105-1111.
- [49] D. Dowson. *Tribological principles in metal-on-metal hip joint design*. Eng. Med. 220 (2006) 161-171.
- [50] T. Hanawa. *Metal ion release from metal implants*. Mat. Sci. Eng. 24 (2004) 745-752.
- [51] M.P. Gispert, A.P. Serro, R. Claco y B. Saramago. *Friction and wear mechanisms in hip prosthesis: comparison of joint materials behaviour in several lubricants*. Wear. 260 (2006) 149-158.
- [52] P.F. Doorn, P.A. Campbell, J. Worrall, P.D. Benya, H.A. McKellop y H. Amstutz. *Metal wear particle characterization from metal-on-metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles*. J. Biomed. Mater. Res. 42 (1998) 103-111.
- [53] I. Catelas, J. Bobyn y J. Medley. *Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal-metal wear particles. Analysis of particle size and shape*. J. Biomed. Mater. Res. 55 (2001) 320-329.
- [54] A. Buford y T. Goswami. *Review of wear mechanisms in hip implants*. Mater. Design. 25 (2004) 385-393.

- [55] J.J. Jacobs, L.M. Patterson, A.K. Skipor, D.J. Hall, R.M. Urban, J. Black y J.O. Galante. *Postmortem retrieval of total joint replacement components*. J. Biomed. Mater. Res. 48 (1999) 385-391.
- [56] Y. Yan, A. Neville, D. Dowson, S. Williams y J. Fisher. *Effect of metallic nanoparticles on the biotribocorrosion behaviour of Metal-on-Metal hip prostheses*. Wear. 267 (2009) 683-688
- [57] M. Nakagawa, S. Matsuya y K. Udoh. *Corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys in fluoride containing solutions*. Dent. Mater. J. 20 (2001) 305-314.
- [58] J.W. Schultze y M.M. Lohrengel. *Stability, reactivity and breakdown of passive films. Problems of recent and future research*. Electrochim. Acta. 45 (2000) 2499-2513.
- [59] I. Milosev y H.H. Strehblow. *The composition of the surface passive film formed on CoCrMo alloy in simulated physiological solution*. Electrochim. Acta. 48 (2003) 2767-2774.
- [60] I. Milosev, H.M. Metikos y H.H. Strehblow. *Passive film on orthopaedic TiAlV alloy formed in physiological solution investigated by X-ray photoelectron spectroscopy*. Biomaterials. 21 (2000) 2103-2113.
- [61] D.C. Smith, R.M. Pilliar, J.B. Metson y N.S. McIntyre. *Dental implant materials. II. Preparative procedures and surface spectroscopic studies*. J. Biomed. Mater. Res. 25 (1991) 1069-1084.
- [62] E.J. Kelly. *Electrochemical behavior of titanium*. Mod. Aspect. Electrochem. 14 (1982) 319-424.
- [63] S. Virtanen, I. Milosev, E.G. Barrera, R. Trebse, J. Salo y I.T. Konttinen. *Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions*. Biomaterials. 4 (2008) 468-476.
- [64] J.J. Jacobs, J.L. Gilbert y R.M. Urban. *Current concepts review: corrosion of metal orthopaedic implants*. J. Bone Joint Surg. 80 (1998) 268-282.
- [65] J.J. Jacobs, A.K. Skipor, L.M. Patterson, N.J. Hallab, W.P. Paprosky, J. Black y J.O. Galante. *Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study*. J. Bone Joint Surg. 80 (1998) 1447-1458.
- [66] I. Milosev. *The effect of complexing agents on the electrochemical behaviour of orthopaedic stainless steel in physiological solution*. J. Appl. Electrochem. 32 (2002) 311-320.
- [67] M.K. Khan, R.L. Williams y D.F. Williams. *The corrosion behaviour of Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb and Ti-13Nb-13Zr in protein solution*. Biomaterials. 20 (1999) 631-637.
- [68] K. Merritt y S.A. Brown. *Effect of proteins and pH on fretting corrosion and metal ion release*. J. Biomed. Mater. Res. 22 (1988) 111-120.
- [69] A. Cross y O.T.G. Jones. *Enzymic mechanisms of superoxide production*. Biochim. Biophys. Acta. 1057 (1991) 281-298.

- [70] I. P. Tengvall, I. Lundstrom, L. Sjoqvist, H. Elwing y L.M. Bjursten. *Titanium- hydroxide peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants*. *Biomaterials*. 10 (1989) 166-175.
- [71] C. Brown, J. Fisher y E. Ingham. *Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses*. *J. Engineering in Medicine*. 220 (2006) 335-369.
- [72] A.G. Cobb y T. P. Schmalzreid. *The clinical significance of metal ion release from cobalt-chromium metal-on-metal hip joint arthroplasty*. *J. Eng. Med*. 20 (2005) 385-398
- [73] E. Chassot, J.L. Irigaray, S. Terver y G. Vanneuville. *Contamination by metallic elements released from joint prostheses*. *Med. Eng. Phys*. 26 (2004) 193-199.
- [74] D.R.P. Neumann, C. Thaler, W. Hitzl, M. Huber, T. Hofstädter y U. Dorn. *Long-term results of a contemporary Metal-on-Metal total hip arthroplasty A 10-year follow-up study*. *J. Arthroplasty*. 25 (2010) 700-708.
- [75] B.F. Shahgaldi, F.W. Heatley, A. Dewar y B. Corrin. *In vivo corrosion of cobalt chromium and titanium wear particles*. *J. Bone Joint Surg*. 77 (1995) 962-966.
- [76] I. Catelas, P.A. Campbell, J.D. Bobyn, J.B. Medley y O.L. Huk. *Wear particles from metal-on-metal total hip replacements: effects of implant design and implantation time*. *Proc. Inst. Mech. Eng*. 220 (2006) 195-208.
- [77] T. Wright y S. Goodman. *Implant wear in total joint replacement: clinical and biologic issues, material and design considerations*. A.A.O.S, EE.UU. (2001) 176-85.
- [78] G.M. Keegan, I.D. Learmonth y C.P. Case. *Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: a review of current knowledge and future strategies*. *J. Bone Joint Surg. (Br)*. 89 (2007) 567-73.
- [79] H.G. Willert, G.H. Buchhorn y A. Fayyazi. *Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: a clinical and histomorphological study*. *J. Bone Joint Surg. (Am)*. 87 (2005) 28-36.
- [80] W. J. Gillespie, D.A. Henry, D.L O'Connell, S. Kendrick, E. Juszczak, K. McInnenv y L. Derby. *Development of hematopoietic cancers after implantation of total joint replacement*. *Clin. Orthop*. 329 (1996) 290-296.
- [81] L. Lidgren. *Chronic inflammation, joint replacement and malignant lymphoma*. *J. Bone Joint Surg. (Br)*. 90 (2008) 7-10.
- [82] A. Kobayashi, W. Bonfield, Y. Kadoya, T. Yamac, M.A.R. Freeman, G. Scott y P.A. Revell. *The size and shape of particulate polyethylene wear debris in total joint replacements*. *Proc. Inst. Mech. Eng*. 211 (1997) 11-15.
- [83] C.R. Clark. *A potential concern in total joint arthroplasty: systemic dissemination of wear debris*. *J. Bone Joint Surg. (Am)*. 82 (2000) 455-456.
- [84] J.J. Jacobs. K.A. Roebuck, M. Archibeck, N.J Hallab y T.T. Glant. *Osteolysis: basic science*. *Clin. Orthop. Relat. Res*. 393 (2001) 71-77.
- [85] N. Taki, J.M. Tatro, J.L. Nalepka, D. Togawa, V.M. Goldberg, C.M. Rimmac y E.M. Greenfield. *Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms*. *J Orthop Res*. 23 (2005) 376-83.

- [86] C. Fleury, A. Petit, F. Mwale, J. Antoniou, D.J. Zukor, M. Tabrizian y O.L. Huk. *Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity, and oxidative stress*. *Biomaterials*. 27 (2006) 3351-3360.
- [87] The NJR 2nd Annual Report. National Joint Registry 21st Sept 2005. http://www.njrcentre.org.uk/documents/reports/2nd_annual_report.html (date last accessed 3 October 2008).
- [88] R.B. Treacy, C.W. McBryde y P.B. Pynsent. *Birmingham hip resurfacing arthroplasty. A minimum follow-up of five years*. *J. Bone Joint Surg. (Br)*. 87 (2005) 167-170.
- [89] C.B. Hing, D.L. Back, M. Bailey, D.A. Young, R.E. Dalziel y A.J. Shimmin. *The results of primary Birmingham hip resurfacings at a mean of five years: An independent prospective review of the first 230 hips*. *J. Bone Joint Surg. (Br)*. 89 (2007) 1431-1438.
- [90] C. Brown, J. Fisher y E. Ingham. *Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses*. *Eng. in Med*. 220 (2006) 335-369.
- [91] Y.S. Park, Y.W. Moon, S.J. Lim, J.M. Yang, G. ASHnn y Y.L. Choi. *Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacements*. *J. Bone Joint Surg. (Am)*. 87 (2005) 1515-1521.
- [92] M.F. Swiontkowski, J. Agel, J. Schwappach, P. McNair y M. Welch. *Cutaneous metal sensitivity in patients with orthopaedic injuries*. *J. Orthop. Trauma*. 15 (2001) 86-89.
- [93] L. Kanerva y L. Förström. *Allergic nickel and chromate hand dermatitis induced by orthopaedic metal implant*. *Contact Dermatitis*. 44 (2001) 103-104.
- [94] L. Büdinger y M. Hertl. *Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview*. *Allergy*. 55 (2000) 108-115.
- [95] M.S. Peters, A.L. Schroeter, H.M. Hale y J.C. Broadbent. *Pacemaker contact sensitivity*. *Contact Dermatitis*. 11 (1984) 214-218.
- [96] A.W. Parker, D. Drez y J.J. Jacobs. *Titanium dermatitis after failure of a metal-backed patellas*. *J. Knee Surg*. 6 (1993) 129-131.
- [97] G. Rostoker, J. Robin y O. Binet. *Dermatitis due to orthopaedic implants. A review of the literature and report of three cases*. *J. Bone Joint Surg*. 69 (1987) 1408-1412.
- [98] S. Buchet, D. Blanc, P. Humbert, P. Girardin, M. Vigan y T. Anguenot. *Pacemaker dermatitis*. *Contact Dermatitis*. 26 (1992) 46-47.
- [99] J. King, A. Fransway y R.B. Adkins. *Chronic urticaria due to surgical clips*. *N. Engl. J. Med*. 329 (1993) 1583-1584.
- [100] S. Nakamura, Y. Yasunaga, Y. Ikutu, K. Shimogaki, N. Hamada y N. Takata. *Autoantibodies to red cells associated with metallosis-a case report*. *Acta Orthop. Scand*. 68 (1997) 495- 496.
- [101] J. Black, H. Sherk, J. Bonini, W.R. Rostoker, F. Schajowicz y J.O. Galante. *Metallosis associated with a stable titanium-alloy femoral component in total hip replacement*. *J. Bone Joint Surg*. 72 (1990) 126-130.

- [102] H.G. Willert, G.H. Buchorn, A. Fayyazi, R. Flury, M. Windler y G. Koster. *Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study.* J. Bone Joint Surg. (Am). 87 (2005) 28-36.
- [103] P. Korovessis, G. Petsinis, M. Repanti y T. Repantis. *Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty.* J. Bone Joint Surg. (Am), 88 (2006) 1183-1191.
- [104] I. Milosev, R. Trebse, S. Kovac, A. Cor y V. Pisot. *Survivorship and retrieval analysis of Sikomet metal-on-metal total hip replacements at a mean of seven years.* J. Bone Joint Surg. (Am). 88 (2006) 1171-1172.
- [105] J. Foussereau y P. Laugier. *Allergic eczemas from metallic foreign bodies.* Trans. St. Johns Hosp. Dermatol. Soc. 52 (1966) 220-225.
- [106] S. Handa, S. Dogra y R. Prasad. *Metal sensitivity in a patient with a total knee replacement.* J. Cont. Dermat. 49 (2003) 259-260.
- [107] J. Beecker, J. Gordon y M. Pratt. *An interesting case of jointprosthesis allergy.* Dermatitis. 20 (2009) 4-9.
- [108] G. Xiang, H. Rong-xin, Y. Shi-gui y Li-dong Wu. *Dermatitis Associated With chromium following total knee arthroplasty.* J. Arthrop. 26 (2011) 13-16.
- [109] D. Granchi, E. Cenni, G. Trisolino, A. Giunti y N. Baldini. *Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement.* J Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomaterials. 77 (2006) 257-64.
- [110] N.J. Hallab, S. Anderson, T. Stafford, T. Glant y J.J. Jacobs. *Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty.* J. Orthop. Res. 23 (2005) 384-391.
- [111] P. Thomas, L.R. Braathen, M. Dorig, J. Aubock, F. Nestle y T. Werfel. *Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and perimplant T-lymphocytic inflammation.* Allergy. 64 (2009) 1157-1165.
- [112] N.J. Hallab, K. Merritt y J.J. Jacobs. *Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants.* J. Bone Joint Surg. (Am). 83 (2001) 428-436.
- [113] J.J. Jacobs, R.M. Urban, N.J. Hallab, A.K. Skipor, A. Fischer y M.A. Wimmer. *Metal-on-metal bearings surfaces.* J. Am. Acad. Orthop. Surg. 17 (2009) 69-76.
- [114] M. Lindemann, F. Rietschel, M. Zabel y H. Grosse-Wilde. *Detection of chromium allergy by cellular in vitro methods.* Clin. Exp. Allergy. 38 (2008) 1468-75.
- [115] K. Müller y E. Valentine-Thon. *Hypersensitivity to titanium: Clinical and laboratory evidence.* Neuro. Endocrinol. Lett. 27 (2006) 31-35.
- [116] B. Delay, A.T. Doherty, B. Fairman y J.P. Case. *Wear debris from hip and knee replacement causes chromosomal damage in human cells in tissue culture.* J. Bone Joint Surg. (Br). 86 (2004) 598-606.
- [117] D. Ladon, A. Doherti, R. Newson, J. turner, M. Bhamra y C.P. Case. *Changes in metal levels and chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients after metal-on-metal hip arthroplasty.* J. Arthroplasty. 219 (2004) 78-83.
- [118] E. Dunst, D. Ladon, P. Whittingham-Jones, R. Carrington y T.W.R. Briggs. *Chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients with metal-on-metal hip bearings.* J. Bone Joint Surg. (Am). 90 (2008) 517-522.

- [119] S. Bonassi. *Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction*. Mutat. Res. 511 (2002) 73-86.
- [120] L. Hagmar, S. Bonassi, U. Stromberg, A. Brogger, L. Knudsen, H. Norppa y C. Reuterwall. *The european study group on cytogenetic biomarkers and health. chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetics Biomarkers and Health (ESCH)*. Cancer Res. 58 (1998) 4117-4121.
- [121] W. Brodner, G.J. Grohs y D Baucher-Todesca. *Does the placenta inhibit the passage of chromium and cobalt after metal-on-metal total hip arthroplasty?* J. Arthroplasty. 19 (2004) 102-106.
- [122] C. Delaunay, I. Petit, I.D. Learmonth, P. Ogerd y P.A. Vendittoli. *Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: The cobalt and chromium ions release concern*. Orthop. Traum. Surg. Research. 96 (2010) 894-904
- [123] A. Schuh, G. Zeiler, U. Holzwarth y T. Aigner. *Malignant fibrous histiocytoma at the site of a total hip arthroplasty*. Clin. Orthop. 425 (2004) 218-222.
- [124] H. Pandit, S. Glyn-Jones y P. McLardy-Smith. *Pseudotumors associated with metal-on-metal hip resurfacing*. J. Bone Joint Surg (Br). 90 (2008) 847-51.
- [125] R. Tharani, F.J. Dorey y T.P. Schmalzried. *The risk of cancer following total hip or knee arthroplasty*. J. Bone Joint Surg. (Am). 83 (2001) 774-780.
- [126] O. Nyren, J.K. McLaughlin, G.G. Anders-Ekbom, O. Johnell y H. Adami. *Cancer risk after hip replacement with metal implants: a population-based cohort study in Sweden*. J. Natl. Cancer Inst. 87 (1995) 28-33.
- [127] W.J. Gillespie, C.M. Frampton, R.J. Henderson y P.M. Ryan. *The incidence of cancer following total hip replacement*. J. Bone Joint Surg. (Br). 70 (1988) 539-542.
- [128] T. Visuri, P. Pulkkinen y P. Paavolainen. *Malignant tumors at the site of total hip prosthesis. Analytic review of 46 cases*. J. Arthroplasty. 21 (2006) 311-323.
- [129] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>. Septiembre 2011.
- [130] *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chromium, nickel and Welding*. I.A.R.C. 49 (1990) 1-667
- [131] *Cobalt in hard metals and cobalt sulphate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide in: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. I.A.R.C. 86 (2003) 1-297.
- [132] *Monograph Titanium Dioxide, 2006. Orthop.* <http://Monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/93-titaniumdioxide.pdf>. Septiembre (2011).
- [133] M. Koike y H. Fuji. *In vitro assessment of corrosive properties of titanium as a biomaterial*. J. Oral Rehabil. 28 (2001) 540-548.
- [134] E. Velasco-Ortega, A. Jos, A. M. Cameán, J. Pato-Mourelo y J. J. Segura-Egea. *In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of a commercial titanium alloy for dental implantology*. Mutat. Research. 702 (2010) 17-23.
- [135] J. Chen, X. Dong, J. Zhao y G. Tang. *In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection*. J. App. Toxicol. 29 (2009) 330-337.

- [136] J. Versieck, R. Cornelis. *Trace Elements in Human Plasma or Serum*. Boca Raton, CRC Press, USA. (1989).
- [137] D. Lison, M. De Boeck, V. Verougstraete y M. Kirsch-Volders. *Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds*. *Occup. Environ. Med.* 58 (2001) 619-625.
- [138] D. Beyersmann y A. Hartwig. *The genetic toxicology of cobalt*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115 (1992) 137-145.
- [139] S.S. Tower. *Arthroprosthetic cobaltism: identification of the at-risk patient*. *Alaska Med.* 52 (2010) 28-32.
- [140] T.W. Clarkson, G.F. Nordberg y P.R. Sager. *Reproductive and developmental toxicity of metals*. *Scand. J. Work Environ. Health.* 11 (1985) 145-154.
- [141] D. Bagchi, M. Bagchi y S.J. Stohs. *Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene*. *Mol. Cell. Biochem.* 222 (2001) 149-158.
- [142] D. Bagchi, S. Stohs, B. Downs, M. Bagchi y H. Preuss. *Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium*. *Toxicology.* 180 (2002) 5-22.
- [143] A. Leina, P.A. Lay. *Chemical properties and toxicity of chromium (III) nutritional supplements*. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 563-571.
- [144] M.S. Morgan y K.H. Schaller. *An analysis of criteria for biological limit values developed in Germany and in the United States*. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 72 (1999) 195-204.
- [145] K. Smet, R. De Haan y A. Calistri. *Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing*. *J. Bone Joint Surg. (Am)*. 90 (2008) 202-208.
- [146] A.W. Schaffer, A. Pilger, C. Enhelhardt, K. Zweymueller y H.W. Ruediger. *Increased blood cobalt and chromium after total hip replacement*. *J. Toxicol.* 37 (1999) 839-844.
- [147] Medical Device Alert. *Metal-on-Metal hip replacements*. Disponible en: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/dtsbs/documents/medicaldevicealert/con079162.pdf>. M.H.R.A., UK.
- [148] A.H. Hosman, H.C van der Mei, S.K Bulstra, H.J Busscher y D. Neut. *Effects of metal-on-metal wear on the host immune system and infection in hip arthroplasty*. *Acta. Orthop.* 81 (2010) 526-534.
- [149] R. Lauwerys y P. Hoet. *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring*. Boca Raton, Lewis, Florida. (1993).
- [150] T.D. Richardson, S.J. Pineda, K.B. Streng, T.A. Van Fleet, M. MacGregor, J.C. Milbrandt, J.A. Espinosa y P. Freitag. *Serum titanium levels after instrumented spinal arthrodesis*. *Spine.* 33 (2008) 792-796.
- [151] E. Dunstan, A. P. Sanghrajka, S. Tilley, P. Unwin, G. Blunn, S. R. Cannon y T. W. R. Briggs. *Metal ion levels after Metal-on-Metal proximal femoral replacements: a 30-year follow-up*. *J. Bone Joint Surg.* 87 (2005) 628-631.
- [152] J. Daniel, H. Ziaee, C. Pradhan, P. B. Pynsent y D. J. W. McMinn. *Blood and urine metal ion levels in young and active patients after Birmingham hip resurfacing*

- arthroplasty: four-year results of a prospective longitudinal study.* J. Bone Joint Surg. (Br). 89 (2007) 169-173.
- [153] A. Sarmiento-González, J. Marchante-Gayón, J. María Tejerina-Lobo, J. Paz-Jimenez y A.Sanz-Medel. *ICP-MS multielemental determination of metals potentially released from dental implants and articular prostheses in human biological fluids.* Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1001-1009.
- [154] L. Savarino, D. Tigani, M. Greco, N. Baldini y A. Giunti. *The potential role of metal ion release as a marker of loosening in patients with total knee replacement.* J. Bone Joint Surg. 92 (2010) 634-638.
- [155] K. Maezawa, M. Nozawa, T. Yuasa, K. Aritomi, K. Matsuda y K. Shitoto. *Seven years of chronological changes of serum chromium levels after metal-on-metal total hip arthroplasty.* J. Arthrop. 25 (2010) 1196-1200.
- [156] G. Adami, D. Smarrelli, B. Martinelli, A. Acquavita y E. Reisenhofer. *Cobalt blood levels after total hip replacements (THR): A new follow-up study in Trieste (Italy).* Ann. Chim. 93 (2003) 1-10.
- [157] C. Lhotka, T. Szekeres, I. Steffan, K. Zhuber y L. Zweymüller. *Four years study of cobalt and chromium blood levels in patients managed with two different metal-on-metal total hip replacements.* J. Orthop. Res. 21 (2003) 189-195.
- [158] A. Gröbl, M. Marker, W. Brodner, A. Giurea, G. Heinze, V. Meisinger, H. Zehetgruber y R. Kotz. *Long-term follow-up of metal-on-metal total hip replacement.* J. Bone Joint Surg. 88 (2007) 1003-1005.
- [159] I. Milosev, V. Pisot y P. Campbell. *Serum levels of cobalt and chromium in patients with Sikomet metal-metal total hip replacements.* J. Orthop. Res. 23 (2005) 526-535
- [160] V.J. Rasquinha, C.S. Ranawat, J.Weiskopf, J.A. Rodriguez, A.K. Skipor y J.J. Jacobs. *Serum metal levels and bearing surfaces in total hip arthroplasty.* J. Arthrop. 21 (2006) 47-52.
- [161] K. Maezawa, M. Nozawa, T. Hirose, K. Matsuda, M. Yasuma y K. Shitoto. *Cobalt and chromium concentrations in patients with metal-on-metal and other cementless total hip arthroplasty.* Arch. Orthop. Trauma. Surg. 122 (2002) 283-287.
- [162] W.C. Witzleb, J. Ziegler, F. Krummenauer, V. Neumeister y K.-P. Guenther. *Exposure to chromium, cobalt and molybdenum from metal-on-metal total hip replacement and hip resurfacing arthroplasty.* Acta Orthopaedica. 77 (2006) 697-705.
- [163] W. Brodner, P. Bitzan, V. Meisinger, A. Kaider, F. Gottsauner-Wolf y R. Kotz. *Serum cobalt levels after metal-on-metal total hip arthroplasty.* J. Bone Joint Surg. 85 (2003) 2168-2173.
- [164] J. Jacobs, A.K. Skipor, P.F. Doorn, P. Campbell, T.P. Schmalzried y J. Black. *Cobalt and chromium concentrations in patients with metal on metal total hip replacements.* Clin. Orthop. Rel. Res. 329 (1996) 256-263.
- [165] J. Jacobs, A.K. Skipor, L.M. Patterson, N.J. Hallab, W.G. Praposky y J. Black. *Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty.* J. Bone Joint Surg. 80 (1998) 1447-1458.

- [166] F. Barbosa, S. Simião de Souza, D. Santos y F. Krug. *Evaluation of electrodeposited tungsten chemical modifier for direct determination of chromium in urine by ETAAS*. J. Microchem. 78 (2004) 7-13.
- [167] M. Álvarez y J. Hermida. *Determinación simultánea de Cr, Ni y V en orina mediante ETAAS*. Quim. Nova. 34 (2011) 940-944.
- [168] C.I. Hur, T.R. Yoon, S.G. Cho, E.K. Song y J.K. Seon. *Serum ion level after Metal-on-Metal THA in patients with renal failure*. Clin. Orthop. Relat. Res. 446 (2008) 696-699.
- [169] A. Zeh, M. Planert, G. Siegert, P. Lattke, A. Held y W. Hein. *Release of cobalt and chromium ions into the serum following implantation of the metal-on-metal maverick-type artificial lumbar disc*. Spine. 32 (2007) 348-352.
- [170] A. Grül, M. Weissinger, W. Brodner, A. Gleiss, A. Giurea, M. Gruber, G. Pöll, V. Mcisinger, F. Gottasauner-Wolf y R. Kotz. *Serum cobalt levels after ceramic-on-ceramic and metal-on-metal total hip replacement*. J. Arthroplasty. 19 (2004) 102-106.
- [171] H. Ziaee, J. Daniel, A.K. Data, S. Blunt y D.J.W. McMinn. *Transplacental of cobalt and chromium in patients with metal-on-metal hip arthroplasty*. J. Bone Joint Surg. 89 (2007) 301-305.
- [172] H. Dahlstrand, A. Stark, L. Anissian y N.P. Hailer. *Elevated serum concentrations of cobalt, chromium, nickel, and manganese after Metal-on-Metal arthroplasty of the hip: a prospective randomized study*. J. Arthrop. 24 (2009) 837-845.
- [173] P. Sauvé, J. Mountney, T. Khan, J. De Beer, B. Higgins y M. Grover. *Metal ion levels after metal-on-metal ring total hip replacement: A 30-year follow-up study*. J. Bone Joint Surg. 89 (2007) 586-590.
- [174] C. Anderson, S.J. MacDonald, S. Sritulanondha, A. Thompson, D. Naudie y A. Charles. *Metal ion levels after Metal-on-Metal total hip arthroplasty: a randomized trial*. Clin. Orthop. Relat. Res. 467 (2009) 101-111.
- [175] A. Sarmiento-González, J. Marchante-Gayón, J. María Tejerina-Lobo, J. Paz-Jimenez y A. Sanz-Medel. *High resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis*. Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2583-2589.
- [176] P.A. Vendittoli, A.G. Roy, D. Lusignan, J. Girard y M. Lavigne. *Metal Ion Release With Large-Diameter*. J. Arthrop. 26 (2011) 282-288.
- Metal-on-Metal Hip Arthroplasty.
- [177] I. Iavicoli, G. Falcone, M. ALessaandrelli, R. Cresti, V. De Santis, S. Salvatori, A. Limonti y G. Carelli. *The release of metals from metal-on-metal surface arthroplasty of the hip*. J. Trace Ele. Med. Biol. 20 (2006) 25-31.
- [178] D.M. Templeton, F.Ariese, R.Cornelis, L.G. Danielson, H. Muntan, H.P. Van Leeliwen y R. Lobinski. *Guidelines for terms related o chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*. Pura Appl. Chem. 72 (2000) 1453-1470.
- [179] J.A. Carusso, B. Klaue, B. Michalke y D.M. Rocke. *Group assessment: elemental speciation*. Ecotox. Environ. Safe. 56 (2003) 32-44.

- [180] R.J.P. Williams. *Chemical selection of elements by cells*. *Coord. Chem. Rev.* 216 (2001) 583-592.
- [181] J. Szpunar. *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 54-56.
- [182] R. Lobinsky, Dirk Schaumlöffel y Joanna Szpunar. *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*. *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 255-289.
- [183] J. Szpunar. *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*. *Analyst.* 125 (2000) 963-988.
- [184] J. Szpunar y R. Lobinski. *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. *Analyst.* 130 (2005) 442-465.
- [185] M. Montes-Bayón, A.B. Soldado-Cabezuelo, E. Blanco-González, J.I. García-Alonso y A. Sanz-Medel. *Capabilities of fast protein liquid chromatography coupled to a double focusing inductively coupled plasma mass spectrometer for trace metal speciation in human serum*. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 947-951.
- [186] J. Feldmann. *What can the different current detection methods offer for element speciation?* *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 228-242.
- [187] J.S. Becker. *Trace and ultratrace analysis in liquids by atomic spectrometry*. *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 243-254.
- [188] A. Sanz-Medel. *Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends*. *Spectrochim. Acta B.* 53 (1998) 197-211.
- [189] A. Sanz-Medel. *Flow Analysis with atomic spectrometry detectors*. Elsevier, Amsterdam. (1999) 407-433.
- [190] J. Begerow, M. Turfeld y L. Dunemann. *New horizons in human biomonitoring of environmentally and occupationally relevant metals-sector-field ICP-MS versus electrothermal AAS*. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 347-352.
- [191] M. Montes-Bayón, K. DeNicola y J.A. Caruso. *Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. *J. Chromatogr.* 1000 (2003) 457-476.
- [192] E.B. González y A. Sanz-Medel. *Elemental Speciation: new Approaches for Trace Element Analysis*. XXXIII. Servier Science, UK (2000) 81-121.
- [193] J. Bettmer, M. Montes Bayón, J. Ruiz Encinar, M.L. Fernández Sánchez, M. Fernández de la Campa y A. Sanz Medel. *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. *J. Proteomics.* 72 (2009) 989-1005.
- [194] M.H. Nagaoka, H. Akiyama y T. Maitani. *Binding patterns of V to transferrin in healthy human serum studied with HPLC/high resolution ICP-MS*. *Analyst.* 129 (2004) 51-54.
- [195] A. Prange y D. Schaumlöffel. *Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms*. *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 441-453.
- [196] C.N. Ferrarello, M. Montes Bayon, R. Fernandez de la Campa y A. Sanz-Medel. *Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallothionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively*

- coupled plasma time-of-flight mass spectrometric detection*. J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 1558-1563.
- [197] M. E. del Castillo-Busto, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Bettmer y A. Sanz-Medel. *Stable isotope labelling and ICP-MS-SF-MS for accurate determination of clinical iron status parameters in human serum*. 133 (2008) 379-384.
- [198] E.H. Larsen. *Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry*. Spectrochim. Acta Part B. 53 (1998) 253-265.
- [199] A.B. Cabezuelo-Soldado, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González y J.I. García Alonso. *Speciation of basal Aluminium in human serum by FPLC with inductively coupled plasma mass spectrometric detection*. Analyst. 123 (1998) 865-869.
- [200] D. Schaumlöffel, J. Ruiz Encinar y R. Lobinski. *Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping*. Anal. Chem. 75 (2003) 6837-6842.
- [201] J.B. Fenn, M.Mann, C.K. Meng, S.F. Wong y C.M Whitehouse. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science. 246 (1989) 64-71.
- [202] K. Tanaka, H. Kaki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida y T. Yoshida. *Protein and polymer analysis of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988) 151-153.
- [203] R. Aebersold y D.R. Goodlett. *Mass spectrometry in proteomics*. Chem. Rev. 101 (2001) 269-295.
- [204] L.F. Marvin, M.A. Roberts y L.B. Fay. *Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in clinical chemistry*. Clin. Chim. Acta. 37 (2003) 11-21.
- [205] M. Wind y W.D. Lehmann. *Element and molecular mass-spectrometry-an emerging analytical dream team in the life sciences*. J. Anal. Atom. Spectrom. 19 (2004) 20-25.
- [206] M. Dernovics y R. Lobinski. *Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast. Part II. On the reliability of the quantitative determination of selenocysteine*. J. Anal. At. Spectrom. 23 (2008) 744-751.
- [207] S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada y J.S. Edmonds. *Characterization of arsenic species in kidney of the clam *Tridacna derasa* by multidimensional liquid chromatography- ICPMS and electrospray time-of-flight tandem mass spectrometry*. Anal. Chem. 74 (2002) 2370-2378.
- [208] J. Ruiz Encinar, R. Ruzik, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski y J. Szpunar. *Detection of selenocompounds in a tryptic digest of yeast selenoprotein by MALDI time-of-flight MS prior to their structural analysis by electrospray ionization triple quadrupole MS*. Analyst. 128 (2003) 220-224.
- [209] T. Hanawa, M. Kaga y Y. Itoh. *Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulphides of metals*. Biomaterials. 13 (1992) 20-24.

- [210] A.C. Lewis y P.J. Heard. *The effects of calcium phosphate deposition upon corrosion of Co Cr alloys and the potential for implant failure.* J Biomed. Mater Res. 75 (2005) 365-73.
- [211] E. Mothes y P. Faller. *Evidence that the principal Co II-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia.* Biochemistry. 46 (2007) 2267-2274.
- [212] P.J. Sadler, A. Tucker y J.H. Viles. *Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺.* Eur. J. Biochem. 220 (1994) 193-200.
- [213] P. Kleinert, T. Kuster, S. Durka, D. ahausen, N.U. Bosshard, B. Steinmann, E. Häseler, J. Jaeken, C.W. Heizman y H. Troxler. *Mass spectrometric analysys of human transferrin.* Clin. Chim. Acta. 190 (1990) 1-46.
- [214] N.J. Hallab, J.J. Jacobs, A. Skipor, J. Black, K.Mikecz y J.O. Galante. *Systemic metal-protein binding associated with total joint replacement arthroplasty.* J. Biomed. Mater. Res. 49 (1999) 353-361.
- [215] K. Merritt, S.A. Brown y N.A. Sharkey. *The binding of metal salts and corrosion products to cells and proteins in vitro.* J. Biomed. Mater. Res. 18 (1984) 1005-2025.
- [216] J. Yang y J. Black. *Competitive binding of chromium, cobalt and nickel to serum proteins.* Biomaterials. 15 (1994) 262-268.
- [217] L.O. Simonsen, A.M. Brown, H.Harbak, B.I. Kristensen y P.Bennekou. *Cobalt uptake and binding in human red blood cells.* Blood Cell Mol. Dis. 46 (2011) 266-276.
- [218] D. Bar-O, G. Curtis, N. Rao, N. Bampos y E. Lau. *Characterization of the Co²⁺ and Ni²⁺ binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia.* Eur. J. Biochem. 268 (2001) 42-47.
- [219] D.Bar-Or, L.T. Rael, R.Bar-Or, D.S. Slone, C.W. Mains, N.K.R. Rao y C.Gerald Curtis. *The cobalt-albumin binding assay: Insights into its mode of action.* Clin. Chim. Acta. 387 (2008) 120-127.
- [220] L. Hopkins y K. Schwarz. *Chromium (III) binding to serum proteins, specifically siderophilin.* Biochim. Biophys. Acta. 90 (1964) 484-491.
- [221] Y. Sayato, K. Nakamuro, S. Matsui y M. Ando. *Metabolic fate of chromium compounds. I. Comparative behavior of chromium in rat administered with Na₂⁵¹CrO₄ and ⁵¹CrCl₃.* J. Pharmacobiodyn. 3 (1980) 17-23.
- [222] J.H. Brock. *Transferrins in Metalloproteins.* Harrison P. M. 2 (1985) 183-262.
- [223] A. Aitio y Y. Jarvisalo. *Health hazards and biological effects of welding fumes and gases.* Elsevier, Amsterdam. (1989) 169-179.
- [224] R.A. Yokel y J.S. Crossgrove. *Manganese toxicokinetics at the blood-brain barrier.* Res. Rep. Health Eff. Inst. 119 (2004) 1-84.
- [225] M. Ashner. *Environ. Manganese: brain transport and emerging research needs.* Health Perspect. 108 (2000) 429-432.

- [226] B. Michalke, S. Halbach y V. Nischwitz. *Speciation and toxicological relevance of manganese in humans*. J. Environ. Monit. 9 (2007) 650-656.
- [227] A.D. Tinoco y A.M. Valentine. *Ti (IV) binds to human serum transferrin more tightly than does Fe (III)*. J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 11218-11219.
- [228] A.D. Tinoco, E.V. Eames y A.M. Valentine. *Reconsideration of serum Ti(IV) transport: albumin and transferrin trafficking of Ti (IV) and its complexes*. 130 (2008) 2262-2270.
- [229] A. Sarmiento-González, J. Ruiz-Encinar, A.M. Cantarero-Roldán, J.M. marchante-Gayón y A. Sanz-Medel. *HPLC-ICP-MS and stable isotope-labeled approaches to assess quantitatively Ti (IV) uptake by transferrin in human blood serum*. Anal. Chem. 80 (2008) 8702-8711.
- [230] M. Guo, H. Sun, H.J. McArdle, L. Gambling y P.J. Sadler. *Ti (IV) uptake and release by human serum transferrin and recognition of Ti (IV)-transferrin by cancer cells: understanding the mechanism of action of the anticancer drug titanocene dichloride*. Biochemistry. 39 (2000) 10023-10033.
- [231] K.B. Beckman y B.N. Ames. *The Free Radical Theory of Aging Matures*. Physiol. Soc. 78 (1998) 547-581.
- [232] B. Halliwell. *Free radicals and antioxidants - quo vadis?*. Trends Pharmacol. Sci. 32 (2011) 125-130.
- [233] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur y J. Telser. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 39 (2007) 44-84
- [234] B. Halliwell, R. Aeschbacht, J. Loligert y O. I. Aruoma. *The Characterization of Antioxidants*. Food. Chem. Toxic. 33 (1995) 601-617.
- [235] S. Goldstein. *The Fenton Reagents*. Free Radic. Biol. Med. 15 (1993) 435-45.
- [236] F. Haber y J. Weiss. *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Proc. R. Soc. Ser. A. 147 (1934) 332-52.
- [237] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic y M. Mazur. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem. Biol. Interact. 160 (2006) 1-40.
- [238] G. Harris y X. Shi. *Signaling by carcinogenic metals and metalinduced reactive oxygen species*. Mutat. Res. 533 (2003) 183-200.
- [239] O.I. Aruoma, B. Halliwell, N. Mahmood, A. Burke y H.C. Greenspan. *Characterization of Drugs as Antioxidant Prophylactics*. Free Rad. Biol. Med. 20 (1996) 675-705.
- [240] M. Paolini, P. Perocco, D. Canistro, L. Valgimigli, G.F. Pedulli, R. Iori, C.D. Croce, G. Cantelli-Forti, M.S. Legator y S.Z. Abdel-Rahman. *Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli*. Carcinogenesis. 25 (2004) 61-67.
- [241] G.M. Rowe, H.N. Caplan y M. Hess. *Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway*. Circ. Res. 53 (1983) 584-591.

- [242] B.G. Halliwell. *The antioxidants of human extracellular fluids*. Arch. Biochem. Biophys. 280 (1990) 1-8.
- [243] B. Babior. *Oxygen dependent microbial killing by phagocytes*. N. Eng. J. Med. 298 (1978) 721-725.
- [244] F. Rossi. *The superoxide forming NADPH oxidase of phagocytes: nature, mechanism of activation and function*. Biochim. Biophys. Acta. 853 (1986) 65-89.
- [245] P.K. Riesz. *Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications*. Free Radic. Biol. Med. 13 (1992) 247-270.
- [246] M. Dietrich, G. Block, E.P. Norkus, M. Hudes, M.G. Traber, C.E. Cross y L. Packer. *Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes*. Am. J. Clin. Nutr. 77 (2003) 160-166.
- [247] R.J. Bloomer. *Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to non smokers: impact of dietary intake*. J. Nutr. 6 (2007) 39-44.
- [248] A.H. Auchincloss, A.V. Roux, J.T. Dvorchak, P.L. Brown, R.G. Barr, M.L. Davignus, D.C. Goff, J.D. Kaufman y M.S. O'Neill. *Associations between recent exposure to ambient fine particulate matter and blood pressure in the multi-ethnic study of atherosclerosis*. Environ. Health Perspect. 116 (2008) 486-491.
- [249] M.B. Grisham y J.M. McCord. *Physiology of Oxygen Radicals*. Am. Physiol. Soc., Maryland. (1986) 1-18.
- [250] M. Rojkind, J.A. Domínguez-Rosale, N. Nieto y P. Greenwel. *Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses*. Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 1-20.
- [251] S.C. Marcus, D.E. Mark, D. Miral y L. Joseph. *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J. 17 (2003) 1195-214.
- [252] D. Mukul, B. Kishore, P.R. Naveen y M.S. Lalit. *Oxidative damage of plasma proteins and lipids in epidemic dropsy patients: Alterations in antioxidant status*. Biochim. Biophys. Acta. 1722 (2005) 209-17.
- [253] E.R. Stadtman. *Protein oxidation and aging*. Science. 257 (1992) 1220-1224.
- [254] P. Therond. *Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA)*. Ann. Pharm. Fr. 64 (2006) 383-389.
- [255] C.G. Cochrane. *Cellular injury by oxidants*. Am. J. Med. 92 (1991) 23-30.
- [256] R. Singh, B. Kaur, I. Kalina, T.A. Popov, T. Georgieva, S. Garte, B. Binkova, R.J. Sram, E. Taioli y P.B. Farmer. *Effects of environmental air pollution on endogenous oxidative DNA damage in humans*. Mutat. Res. 620 (2007) 71-82.
- [257] B. Halliwell y J.M.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. O.U.P. (1999) 530-533.
- [258] W. Dröge. *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol. Rev. 82 (2003) 47-95.
- [259] B.N. Ames, M.K. Shigenaga y T.M. Hagen. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 90 (1993) 7915-7922.

- [260] J.M. Mates. *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. Toxicology.153 (2000) 83-104.
- [261] R.A. Jacob. *The integrated antioxidant system*. Nutr. Res. 15 (1995) 755-66.
- [262] S.J. Stosh y D. Bagchi. *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. Free Radical Biol. Med. 18 (1995) 321-336.
- [263] J. Antoniou, D.J. Zukor, F. Mwale, W. Minarik, A. Petit y O.L. Huk. *Metal ion levels in the blood of patients after hip resurfacing: A comparison between twenty-eight and thirty-six-millimeter-head metal-on-metal prostheses*. J. Bone Joint Surg. (Am). 90 (2008) 142-148.
- [264] C. Tkaczyk, A. Petit, J. Antoniou, D. J. Zukor, M. Tabrizian y O. L. Huk. *significance of elevated blood metal ion levels in patients with metal-on- metal prostheses: an evaluation of oxidative stress markers*. Open Orthop. J. 4 (2010) 221-227.
- [265] V.K. Raghunathan, E.M. Ellis y M.H. Grant. *Response to chronic exposure to hexavalent chromium in human monocytes*. Toxicol. Vitro. 23 (2009) 647-652.
- [266] M. Sánchez, J.V. Torres, C. Tormos, A. Iradi, M.R. Oliva y P. Muñiz. *Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a spanish community*. Cancer Lett. 233 (2006) 28-35.
- [267] G. Ray y S.A. Husain. *Oxidants, antioxidants and carcinogenesis*. Indian J. Exp. Biol. 40 (2002) 1213-1232.
- [268] Y. Sun. *Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis*. Free Rad. Biol. Med. 8 (1990) 583-599.
- [269] L. Marrot, C. Jones, P. Perez y J.R. Meunier. *The significance of Nrf2 pathway in (photo)-oxidative stress response in melanocytes and keratinocytes of the human epidermis*. Pig. Cell Mel. Res. 21 (2008) 79-88.
- [270] D.I. Feig, T.M. Reid y L.A. Loeb. *Reactive oxygen species in tumorigenesis*. Cancer Res. 54 (1994) 890-894.
- [271] T.P. Szatrowski y C.P. Nathan. *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. Cancer Res. 51 (1991) 794-798.
- [272] J.C. Romero y J.E. Reckelhoff. *Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension*. Hypertension. 34 (1999) 943-949.
- [273] K. Yasumari, K. Maeda, M. Nakamura y J. Yoshikawa. *Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose and C-reactive protein*. Hypertension. 39 (2002) 777-780.
- [274] K. Irani. *Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling*. Circ. Res. 87 (2000) 179-183.
- [275] J. Heinecke. *Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis*. Am. J. Cardiol. 91 (2003) 12-16.
- [276] B. Halliwell. *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment*. Drugs Aging. 18 (2001) 685-716.

- [277] A.D. Cash, G. Perry, O. Ogawa, A.K. Raina, X. Zhy y M.A. Smith. *Is Alzheimer's disease a mitochondrial disorder?* *Neuroscientist*. 8 (2002) 489-496.
- [278] S. Fahn y G. Cohen. *The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it.* *Ann. Neurol.* 32 (1992) 804-812.
- [279] D.B. Clane. *The free radical hypothesis in idiopathic Parkinsonism: evidence against it.* *Ann. Neurol.* 32 (1992) 799-803.
- [280] T.M. Dawson and V.L. Dawson. *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease.* *Science*. 302 (2003) 819-22.
- [281] M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews y E. Masliah. *Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction y neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases.* *Neuromol. Med.* 4 (2003) 21-36.
- [282] G. Fiskum, A. Starkov, B.M. Polster y C. Chinopoulos. *Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 991 (2003) 111-119.
- [283] P. Jenner. *Oxidative stress in Parkinson's disease.* *Ann. Neurol.* 53 (2003) 26-38.
- [284] E.C. Opara. *Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control.* *J. Investig. Med.* 52 (2004) 19-23.
- [285] A. Pérez de la Cruz, J. Abilés y J. Castaño Pérez. *Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías.* *Nutr. Clin. Med.* 2 (2008) 45-64.
- [286] J. Jordan, V. Cena y J.H. Prehn. *Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders.* *J. Physiol. Biochem.* 59 (2003) 129-141.
- [287] E. Paradis, S. Clément, P. Julien y M.E.V. Murthe. *Lipoprotein lipase affects the survival and differentiation of neural cells exposed to very low density lipoprotein.* *J Biol. Chem.* 278 (2003) 9698-9705.
- [288] B. Bandy y A.J. Davison. *Mitochondrial mutation may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging?* *Free Radio Biol.* 8 (1990) 523-539.
- [289] J. Sastre, F.V. Pallardo y J. Vina. *The role of mitochondrial oxidative stress in aging.* *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 1-8.
- [290] R.H. Griffiths, L. Møller, G. Bartosz, A. Bast, C.B. Freddari, A. Collins, M. Cooke, S. Coolen, G. Haenen, A.M. Hoberg, S. Loft, J. Lunec, R. Olinski, J. Parry, A. Pompella, H. Poulsen, H. Verhagen y S.B. Astley. *Biomarkers.* *Mol Aspects Med.* 23 (2002) 101-208.
- [291] S. Argüelles, S. García, M. Maldonado, A. Machado y A. Ayala A. *Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status?* *Biochim. Biophys. Acta.* 1674 (2004) 251-259.
- [292] J.M. Matés, Pérez-Gómez y T. Núñez de Castro. *Antioxidant enzymes and human diseases.* *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595-603.
- [293] B.A. Omar, S.C. Flores y J.M. McCord. *Superoxide dismutase: Pharmacological developments and applications.* *Adv. Pharmacol.* 23 (1992) 109-161.
- [294] A. Domínguez. *Modificación de la superóxido dismutasa para mejorar sus propiedades biofarmacéuticas.* *Biotecnología Aplicada.* 23 (2006) 11-16.

- [295] I. Fridovich. *Free Radicals in Biology*. Acad. Press, New York. (1976) 239-277.
- [296] L. Banci, I. Bertini, F. Cramaro, R. Del Conte y M.S. Viezzoli. *Solution Structure of Apo Cu,Zn superoxide dismutase: role of metal ions in protein folding*. *Biochemistry*. 42 (2003) 9543-9553.
- 297 J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson y D.C. Richardson. *Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase*. *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 181-217.
- [298] A. Doadrio. *Química Bioinorgánica*. L.A.E.F, Madrid. (1979).
- [299] J.M. McCord, J.L. Crapo y Fridovich. *Superoxide and superoxide dismutases*. Academic press, New York. (1977) 11-17.
- [300] J.M. McCord y I. Fridovich. *Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemoglobin*. *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049-6055.
- [301] S. Girotti, F. Fini, E. Ferri, R. Budini, S. Piazzini y D. Cantagalli. *Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay*. *Talanta*. 51 (2000) 685-692.
- [302] L.W. Oberley y D.R. Spitz. *Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue*. *Meth. Enzymol.* 105 (1984) 457-464.
- [303] L.E.A. Henry, B. Hallywell y D.O. Hall. *The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and a rapid assay technique*. *FEBS Lett.* 66 (1976) 303-306.
- [304] E.F. Elstner, R.J. Youngman y W. Osswald. *Superoxide dismutase. Methods of enzymatica Assay*. Verlag. Chemie. 3 (1983) 293-302.
- [305] S. Marklund y G. Marklund. *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase*. *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469-474.
- [306] B.H. Gary, L.H. Lee y J.F. Wyman. *An automated analysis for superoxide dismutase enzyme activity*. *J. Anal. Toxicol.* 9 (1985) 36-39.
- [307] M.E. Inal, G. Kambak y E. Sunal. *Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging*. *Clin. Chim. Acta.* 305 (2001) 75-80.
- [308] I. Puscasa, M. Baicanb, M. ColtaĂuc, C. Puscasc y G. Domutac. *Erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with digest cancer: adjuvant diagnosis test*. *Canc. Lett.* 143 (1999) 95-98.
- [309] J.A. Serra, E.R. Marschoff, R.O. Domínguez, E.S. de Lustig, A.L. Famulari, E.L. Bartolomeć y E.M. Guareschie. *Comparison of the determination of superoxide dismutase and antioxidant capacity in neurological patients using two different procedures*. *Clin. Chim. Acta* 301 (2000) 87-102.
- [310] T. Strand y S.L. Marklund. *Release of superoxide dismutase into cerebrospinal fluid as a marker of brain lesion in acute cerebral infarction*. *Stroke*. 23 (1992) 515-518.
- [311] H. Saggi, J. Cooksey, L. Dexter, F.R. Wells, L.P. Jenner y C.D. Marsden. *A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinsonian substantia nigra*. *U. Neurochem.* 53 (1989) 692-697.
- [312] J. Chen, C. Geissler, B. Parpia y T.C. Campbell. *Antioxidant status and cancer mortality in China*. *Int. J. Epidemiol.* 21 (1992) 625-635.

- [313] C.M. Bartoli, B. Giannattasio, P. Palozza y A. Cittadini. *Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis*. *Biochem. Biophys. Acta.* 966 (1998) 214-221.
- [314] Y. Ikeda y L.M. Long. *Oxygen free radicals in the genesis of peritumoural brain oedema in experimental malignant brain tumours*. *Acta Neurochir. Suppl.* 51 (1990) 142-144.
- [315] K. Kumar, M. Thangaraju y P. Sachdanandam. *Changes observed in antioxidant system in the blood of post-menopausal women with breast cancer*. *Biochem. Int.* 25 (1991) 371-380.
- [316] R.O. Strange, P. Jonos, J. Bicknell y J. Soarpello. *Expression of CuZn superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes from diabetic and non-diabetic subjects*. *Clin. Chim. Acta.* 207 (1992) 261 -263.
- [317] A. Loven, Y. Romem, I.Z. Pelly, G. Holcberg y G. Agam. *Copper Metabolism a factor in gestational diabetes?* *Clin. Chim. Acta.* 213 (1992) 51-59.
- [318] S. Sagar, K. Kallu, N. Naliki, N.K. Ganguly y K. Sharma. *Oxygen free radicals in essential hypertension*. *Mol. Cel. Biochem.* 111 (1992) 103-108.
- [319] A. Cmadaya, K. Terasawa, H. Tosa, M. Okamoto y K. Toriizuka. *Erythrocyte antioxidant enzymes are reduced in patients with rheumatoid arthritis*. *J. Rheumatol.* 15 (1988) 1628-1631.
- [320] S. Umeki, M. Sumi, Y. Niki y F. Soejima. *Concentrations of superoxide dismutase and superoxide anion in blood of patients with respiratory infection and compromised immune systems*. *Clin. Chem.* 33 (1987) 2230-2233.

B. OBJETIVOS/OBJECTIVES

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de la presente Tesis Doctoral, el empleo de implantes metálicos en ortopedia y odontología ha experimentado un crecimiento constante, asociado en gran extensión, al envejecimiento de la población. Dichos implantes, contienen elementos metálicos como; cobalto, cromo, níquel, titanio etc., que pueden liberarse, circular y depositarse en distintos órganos con consecuencias aún desconocidas. Por este motivo, parece imprescindible el desarrollo de nuevas metodologías que permitan; tanto la detección temprana de dichos elementos liberados a muy bajos niveles de concentración; como su transporte por parte de las biomoléculas; así como, la evaluación de las consecuencias asociadas a su presencia a nivel celular.

Por tanto, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es *la puesta a punto de estrategias analíticas para la evaluación de la liberación de los metales procedentes de implantes ortopédicos y dentales, su transporte y efectos a nivel celular*. Con este fin se pondrán a punto metodologías analíticas adecuadas basadas en diferentes principios de medida, desde el empleo de métodos colorimétricos (para la medida de la actividad enzimática), hasta las más sofisticadas herramientas de proteómica como el MALDI, con la finalidad de abordar cada uno de los siguientes objetivos parciales:

- Determinar con la mayor **precisión y exactitud** posible la concentración total de los principales metales liberados por dichos implantes (Cr, Co, Mo, Mn y Ti), en los fluidos biológicos (sangre, suero y orina). En este sentido, se evaluará el potencial analítico de dos instrumentos de ICP-MS, equipados con analizadores de masas diferentes: un sistema con celda de colisión/reacción (ICP-DRC-MS) y un equipo de alta resolución o doble enfoque (HR-ICP-MS), con el propósito de minimizar las interferencias espectrales que afectan a la medida de los analitos estudiados.

B. OBJETIVOS

- Evaluar el transporte de estos metales en suero, particularmente mediante su asociación a proteínas. Para ello, se utilizarán **metodologías integradas** basadas en técnicas de espectrometría de masas atómica (HPLC-ICP-MS) y molecular (MALDI-TOF-MS). En primer lugar, se llevarán a cabo estudios de especiación metálica cualitativa (“screening”), combinada con estrategias de MALDI, para la caracterización de los bioligandos. Finalmente, se desarrollará una metodología analítica que permita llevar a cabo la especiación cuantitativa de Ti en suero, en condiciones fisiológicas, mediante el empleo de técnicas analíticas de dilución isotópica.

- Elucidar algunos de los efectos biológicos, a nivel celular, producidos por la liberación de estos elementos traza, por parte de los implantes metálicos. En concreto, se llevará a cabo la evaluación del **estrés oxidativo**, mediante la observación de los cambios de expresión producidos en la enzima *Cu,Zn-superoxido dismutasa* (primera línea de defensa antioxidante en el organismo). Teniendo en cuenta que se trata de un metaloenzima, será necesario desarrollar metodologías que permitan obtener; tanto la concentración absoluta de la especie; como su actividad enzimática.

As described in the introduction of this Ph.D. Thesis, the use of the metallic implants for orthopedics and odontology has risen over the last years mainly due to the aging of the population. Particularly, the increasing number of patients exposed to orthopaedic metal alloys has caused concern about their long-term biological effects. These implants are often made of metal alloys containing elements such as cobalt, chromium, nickel, titanium, etc., and these metals can be released from the metallic implants, transported through the blood stream and stored into the different organs. The consequences of such deposition are still unknown, thus it seems mandatory to develop new methodologies that permit, the early detection of metal release by metallic implants (at very low concentration), their transport, as well as their biological effect at the cellular level.

For these purpose, the **main objective** of the present Ph.D. Thesis is *the development of analytical strategies to evaluate metals release from orthopedic and dental implants, their transport and their effect at cellular level*. This goal will be undertaken by using different methodological approaches based on various spectroscopic properties, since colorimetric based assays to address the enzymatic activity of specific metalloenzymes, to the use of the most sophisticated tools in proteomics such as MALDI, for protein identification. To accomplish the main objective of this Ph.D. Thesis, we have structure the work in the following partial aims:

- Determination of the total concentration of the metals released by orthopedic and dental implants (Cr, Co, Mo, Mn y Ti) in biological fluids such as blood, serum and urine (at ultratrace levels), with high **precision and accuracy**. For this aim, the potential of two different ICP-MS instruments will be evaluated in order to minimize polyatomic interferences coming from the serum samples: an ICP-MS with a dynamic reaction cell placed before the quadrupole mass analyzer (ICP-DRC-MS) and a high resolution or double focusing ICP-MS (HR-ICP-MS).

B. OBJECTIVES

- Evaluation of the transport of the metals released by metallic implants by serum proteins. **Integrated mass spectrometric strategies** combining atomic MS after liquid chromatographic separation of the biomolecules (HPLC-ICP-MS) and molecular MS for protein identification (MALDI-TOF-MS) will be used. First of all, elemental speciation will be carried out through the use of HPLC-ICP-MS, which allows the sensitive and specific detection of the metal associated to the protein. Then the MALDI-TOF-MS will be applied for the unequivocal identification and characterization of the metal-containing protein. Finally, the quantitative aspects of the speciation work will be focused on Ti and its association to serum biomolecules that will be pursued by isotope dilution analysis methods.

- Study of the biological effects, at cellular level, caused by the metals once they have been released by the metallic implants. Basically, the studies will be focus on the **oxidative stress** generated by metal release through the changes on the expression of **Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme (Cu,Zn-SOD)** which is the first line of antioxidant defense in the cells. Take into account that Cu,Zn-SOD is a metalloenzima it will be necessary to develop new methodologies that permit to obtain, not only the absolute concentration of the species, but also its enzymatic activity.

C. EXPERIMENTAL

C.1 INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

En esta sección se describirá la instrumentación de carácter general utilizada a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

C.1.1 Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Los espectrómetros de masas elementales surgen del acoplamiento entre una fuente de ionización, el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y un espectrómetro de masas (MS). Se basa en la formación de un *plasma de Ar* mediante la aplicación de un campo electromagnético oscilante de radiofrecuencias. Este fenómeno tiene lugar en una *antorcha de cuarzo*, la cual está rodeada por una boquilla de inducción, y a través de la cual fluye gas Ar. El plasma formado alcanza una temperatura entre 8000 y 10000 K [1], lo cual permite que la muestra líquida, una vez que llega al plasma, sea desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada.

El ICP es, por tanto, una fuente de ionización a presión atmosférica que genera iones principalmente monoatómicos y monopositivos. Puesto que los analizadores de masas funcionan a alto vacío, es necesario que los iones formados en el plasma (a presión atmosférica) lleguen al analizador de la forma más eficaz posible. Para ello, los iones formados pasan a través de *una interfase de extracción*, que comprende el espacio delimitado entre los dos conos de metal: un cono de muestreo (*sampler*), con un orificio aproximado de 1 mm de diámetro interno y un cono de extracción (*skimmer*), con un orificio de 0,4 mm de diámetro interno, según se muestra en la Figura C.1. Dicha interfase de extracción se encuentra a vacío de aproximadamente 1-2 torr.

Aproximadamente, sólo el 1% de los iones formados en el plasma pasa a través de esta interfase de extracción hasta el *sistema de lentes electrostáticas*, cilindros metálicos sometidos a voltajes variables, cuya función principal es acelerar los iones muestreados y enfocarlos independientemente de su masa

C. EXPERIMENTAL

hacia el analizador. El objetivo será obtener un haz colimado de iones hacia la entrada del analizador de masas, minimizando la entrada de otras especies (como átomos neutros o fotones) al mismo. Una vez en el *analizador de masas*, los iones se separarán en función de su relación m/z . Dependiendo del equipo de ICP-MS, el analizador de masas es diferente (como se comentará a continuación). Finalmente, sólo los iones seleccionados son detectados por un *multiplicador de electrones secundarios (SEM)* que funciona en modo digital ó en modo analógico (dependiendo de la intensidad de los iones).

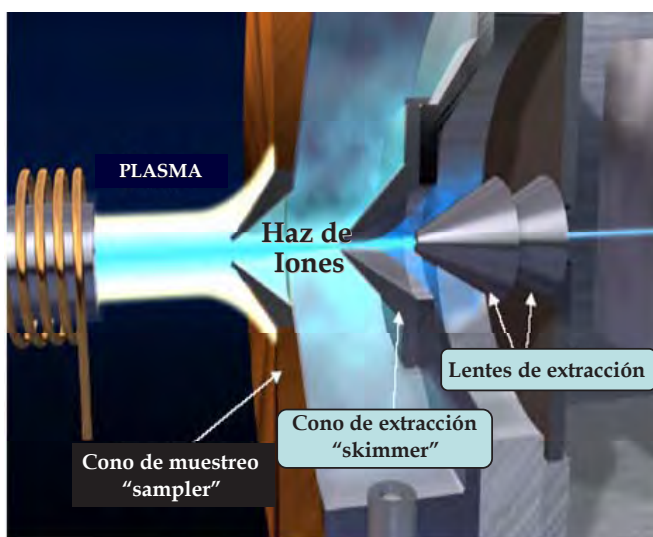


Figura C.1. Plasma e interfase de extracción en un ICP-MS

Con el fin de eliminar o al menos minimizar las posibles interferencias poliatómicas que afectan a algunos de los analitos objeto de estudio a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se emplearon tres equipos ICP-MS, equipados con dos analizadores de masas diferentes: un ICP-MS de doble enfoque y dos ICP-MS de tipo cuadrupolo equipados con celda de colisión/reacción.

- **ICP-MS de alta resolución o doble enfoque (HR-ICP-MS)**

El modelo empleado de ICP-MS de doble enfoque fue un ELEMENT 2 de Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) cuyo esquema se muestra en la Figura C.2. La principal diferencia respecto a otros ICP-MS, es el analizador de

masas, el cual en este equipo es de doble enfoque, formado por un *sector magnético* y un *sector electrostático*. En este caso concreto dispuestos conforme a una geometría Nier Johnson inversa (el enfoque magnético se realiza previamente al electrostático). Esta configuración permite minimizar los efectos de colisión que producirían unos niveles de ruido elevados y disminuirían la sensibilidad.

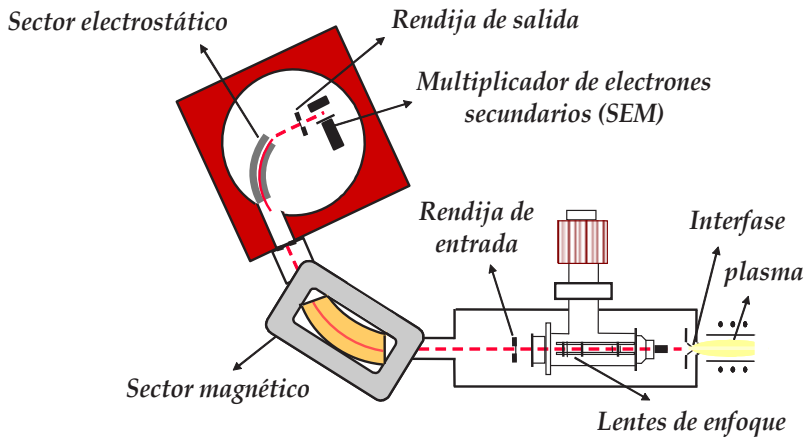


Figura C.2. Esquema del ICP-MS de alta resolución o doble enfoque con geometría de Nier-Johnson inversa

El equipo viene equipado con dos rendijas; una de entrada y otra de salida (según se muestra en la Figura C.2). Variando la anchura de dichas rendijas se modifica el poder de resolución del equipo (R), de este modo, se podrán realizar medidas a baja resolución ($R \approx 300$), lo que supondrá tener las rendijas abiertas al máximo, o sucesivamente más cerradas en los modos de media resolución ($R \approx 4000$) y alta resolución ($R \approx 7500$). El poder de resolución (R) expresa la capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre masas próximas y se define como:

$$R = m / \Delta m$$

Donde Δm es la diferencia de masas entre dos picos adyacentes y m la masa media de los dos. Dos picos se consideran separados si la altura del valle entre los mismos no es superior a un cierto porcentaje (generalmente un 10%) de la

C. EXPERIMENTAL

altura de los mismos (considerando que ambos tienen una altura similar). La principal ventaja de este sistema es su capacidad para la resolución de interferencias espectrales sobre los analitos de interés. En la Tabla C.I se muestran las interferencias más importantes que afectan a los elementos monitorizados en los estudios llevados a cabo durante la presente Tesis.

Tabla C.I. Principales interferencias espectrales que afectan al Co, Cr, Mn, y Ti así como la resolución necesaria para poder separarlas

Elemento	Interferencia	Resolución
^{47}Ti	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$, $^{32}\text{S}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$	Media
^{48}Ti	$^{32}\text{P}^{16}\text{O}^+$, $^{12}\text{C}^{36}\text{Ar}$	Media
^{49}Ti	$^{31}\text{P}^{18}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^+$	Media
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$	Media
^{53}Cr	$^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$	Media
^{55}Mn	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$	Media
^{59}Co	$^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{24}\text{Mg}^{35}\text{Cl}^+$	Media
^{95}Mo	$^{79}\text{Br}^{16}\text{O}^+$	Media

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un aumento en la resolución conlleva una disminución de la sensibilidad, con lo que se deberá adoptar una situación de compromiso. En la presente Tesis se trabajó a media resolución ($R=4000$) puesto que como se observa en la Tabla C.I, es suficiente para poder evitar las interferencias espectrales más comunes.

Este equipo está ubicado en una habitación con atmósfera limpia cuya principal característica es la de proporcionar de forma continua un flujo de aire laminar para evitar la presencia de polvo en la atmósfera del laboratorio que podría contaminar eventualmente las muestras.

Los parámetros experimentales se optimizaron diariamente mediante el análisis de una disolución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Li, Y y Tl de Merck (Darmstadt,

Alemania) a baja, media y alta resolución. También se realizó diariamente el Mass Offset del equipo, mediante la medida de una disolución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr, Co, Mo, Mn y Ti en HNO_3 al 1%, con el fin de asegurar que se estaba midiendo únicamente la señal correspondiente a estos analitos y no la señal correspondiente a las posibles interferencias.

- **ICP-MS de tipo cuadrupolo equipado con celda de colisión/reacción (ICP-DRC-MS)**

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron dos equipos de ICP-MS, con analizador de tipo cuadrupolo y celda de colisión/reacción de dos casas comerciales distintas: A) Thermo Fisher y B) Agilent Technologies.

A) Thermo Fisher modelo X series II.

Este ICP-MS con analizador de tipo cuadrupolo, equipado con celda de colisión/reacción fue el modelo X series II de Thermo Fisher. Este equipo está provisto de un sistema de nebulización, constituido por un nebulizador concéntrico y una cámara de nebulización de paso sencillo de Pyrex, refrigerada mediante efecto Peltier. Los conos de la interfase también están fabricados de níquel. El analizador de masas en este equipo es de tipo cuadrupolo y entre el sistema de lentes de extracción y enfoque iónico y el analizador de masas se encuentra la *celda de colisión/reacción*. Se puede emplear uno u otro modo dependiendo del gas con el que se presurice la celda (con helio de colisión ó con hidrógeno de reacción) así como los potenciales de entrada y salida de la propia celda. En este equipo la configuración de la celda consiste en un *hexapolo* y fue presurizada con 2 mL min^{-1} de He como gas de colisión, para poder así eliminar las interferencias poliatómicas que afectan a los elementos en estudio y que aparecen recogidas en la Tabla C.I. En este equipo se realizaron los estudios de especiación de los principales metales liberados por los implantes en el suero de los pacientes portadores de éstos. En la Figura C.3 se puede ver un esquema del mismo.

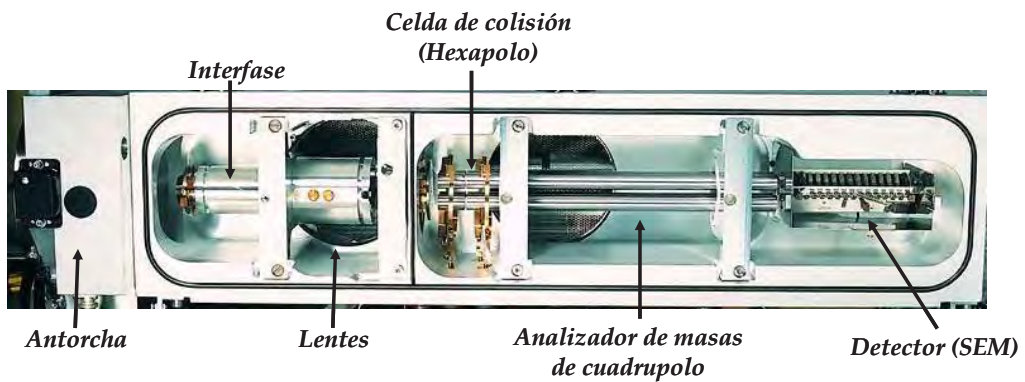


Figura C.3. Esquema del equipo de ICP-MS Thermo Fisher X series II

B) Agilent Technologies Modelo 7500 ce.

El otro equipo de ICP-MS, de tipo cuadrupolo, utilizado en la presente Tesis Doctoral fue el ICP-MS modelo 7500ce de Agilent Technologies (Tokio, Japón), cuyo esquema se muestra en la Figura C.4.

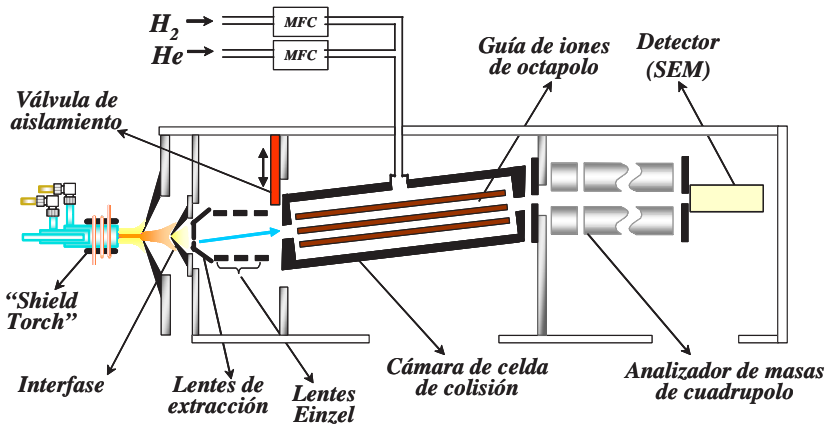


Figura C.4. Esquema del equipo de ICP-MS Agilent 7500ce

Este equipo consta de un nebulizador tipo Meinhard, una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott refrigerada a 2°C. La celda de colisión/reacción es, en este caso, un octapolo y puede igualmente presurizarse con helio o hidrógeno. En la presente Tesis, este equipo se utilizó para la

cuantificación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos y la celda no se empleó como sistema de eliminación de interferencias sino sólo como guía de iones.

La sensibilidad de ambos equipos se optimizó siempre previamente a su uso, mediante la medida de una solución de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Li, Co, Y, Tl y Ce (que cubrían todo el rango de masas de los analitos objeto a estudio) en ácido nítrico (al 1% p/p). Dichas optimizaciones se llevaron a cabo sin presurizar la celda con gas, cuando se utilizó el quipo ICP-DRC-MS y tanto sin presurizar la celda con gas como presurizándola con gas (en nuestro caso He) cuando se utilizó el equipo ICP-MS Thermo Fisher X Series II.

C.1.2 Espectrómetros de masas moleculares

Para la caracterización estructural de proteínas se empleó la espectrometría de masas molecular con fuente de ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) y analizador de tiempo de vuelo (TOF), que se describe a continuación:

- **MALDI-TOF-MS**

El MALDI-TOF-MS empleado en esta Tesis, fue el modelo Voyager-DE™ STR Biospectrometry™ Workstation de Applied Biosystems (Langen, Alemania), equipado con un láser pulsado de nitrógeno (337 nm) y con el que se trabajó en el *modo lineal* positivo para la identificación de las proteínas intactas y en *modo reflectrón* positivo, con el fin de mejorar la resolución espectral, para el análisis de proteínas a través de sus péptidos (mediante mapeo peptídico).

Se utilizaron dos estrategias de trabajo: el análisis de la proteína intacta (con el fin de conocer su peso molecular) y el análisis de péptidos o mapeo peptídico para la identificación de proteínas (mediante la utilización de bases de datos). Para la identificación de las principales proteínas que transportan el Cr, Co, Mn y Ti en suero, se eligió la matriz de ácido sinapínico (AS). Sin embargo, en el caso concreto de la identificación del enzima Cu,Zn-SOD las

C. EXPERIMENTAL

matrices elegidas fueron dos con fines de comparación: el α -ciano-4-hidroxicinámico y la 2,4,6-trihidroxiacetofenona. En la Tabla C.II se recogen los parámetros instrumentales empleados para el análisis de proteínas intactas mediante MALDI-TOF-MS: análisis de Cu,Zn-SOD (A) y para el análisis de las principales proteínas transportadoras de Cr, Co, Mn y Ti en suero (B); y así como para el mapeo peptídico (C).

Tabla C.II. Parámetros instrumentales empleados en el análisis por MALDI-TOF-MS de Cu,Zn-SOD intacta (A), de las principales proteínas transportadores de Cr, Co, Mn y Ti en suero (B) y para el mapeo peptídico (C)

MALDI-TOF-MS	A	B	C
Tipo de barrido	Positivo	Positivo	Positivo
Modo	Lineal	Lineal	reflectrón
Tipo de nebulización	Directa	Directa	Directa
Calibración externa	Cyt c+bovine SOD+lactalbúmina+ β -lactoglobulina	Albúmina de suero bobino (BSA)	Mezcla Comercial (Calmix)
Matriz	α -ciano-4-hidroxicinámico 2,4,6-Trihidroxiacetofenona	Ácido Sinapínico	α -ciano-4-hidroxicinámico
Láser	2600V/3100 V	2800 V	2800 V
Rango de masas	6000-35000 Da	5000-200000 Da	500-4000 Da
Disparos por espectro	150	150	150
Voltaje de aceleración	25000V	25000V	25000V
Grid	90%	90%	90%
Tiempo de retardo	1000 ms	1000 ms	1000 ms

C.1.3 Instrumentación utilizada en las separaciones cromatográficas

Para las separaciones cromatográficas se empleó un equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) compuesto por una bomba de alta presión de doble pistón Shimadzu LC-10 AD VP (Kyoto, Japón) y una válvula

de inyección Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EE.UU.) utilizando bucles de inyección de peek® de 20, 50 y 100 µL de capacidad.

En los estudios en los cuales se requirió un detector UV-Vis se empleó un equipo de HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) el cual consta de una bomba cuaternaria, un desgasificador, un automuestrador, un sistema de termostatación de las columnas y un array de diodos como detector.

Las columnas cromatográficas utilizadas en los distintos estudios de especiación fueron las siguientes:

- Columna de intercambio aniónico Mono Q™ 5/50 GL de 50 mm x 5 mm d.i y 10 µm de tamaño de partícula de Pharmacia, GE Healthcare (España).
- Columna preparativa (25 x 0.5 mm d.i) “scavenger” o quelante de metales para eliminar trazas metálicas. La columna fue empaquetada con el agente quelante Kelex-100 (Schering, Alemania) impregnada de sílica con cadenas de C₁₈ (35-55 µm de partícula) de Bondapak, Waters Corporation, (EE.UU.).

Para los análisis de especiación cualitativos y cuantitativos se emplearon las “técnicas híbridas”, concretamente se llevaron a cabo mediante el acoplamiento entre el sistema de HPLC con los ICP-MS tipo cuadrupolo con celda de colisión/reacción y de alta resolución.

C.1.4 Instrumentación utilizada en el tratamiento de muestras biológicas

Con el fin de obtener el contenido total de metales traza presentes en muestras de sangre se llevó a cabo una previa digestión ácida (HNO₃ + H₂O₂) de las muestras de sangre. Para llevar a cabo esta mineralización se utilizó un horno de microondas Milestone modelo Ethos 2 de Milestone (Socisole, Italia) equipado con un rotor para diez bombas de teflón de media presión y con un sensor de temperatura.

C. EXPERIMENTAL

La centrifugación de las muestras de sangre se llevó a cabo a 4°C, utilizando una centrífuga Biofuge Stratos modelo Heraeus (Hanau, Alemania).

Las incubaciones de las muestras de suero humano con los distintos metales, para los estudios *in vitro*, se llevaron a cabo en un baño termostatzado con control digital modelo Digiterm 100 de J. P. Selecta (Barcelona, España).

Las muestras y estándares se filtraron mediante filtros Millex-GV de 0,22 µm de Millipore (Bedford, EE.UU.) de un solo uso y jeringas de 1 mL BD Plastipak™ de Becton Dickinson and Company (España) antes de su inyección en el sistema cromatográfico. En los casos en los que se disponía de poco volumen de muestra, se usaron filtros de 0,22 µm spin filters (Agilent Technologies) incorporados en tubos de Eppendorf (Alemania) estériles de 2 mL, también de un solo uso.

La purificación (desalinización y preconcentración) de las fracciones cromatográficas recogidas (tras la inyección sucesiva de un suero en el sistema HPLC-UV), para su correspondiente identificación por MALDI-TOF-MS, se llevó a cabo empleando filtros de membrana tipo Centricón con una membrana de tamaño de corte diferente dependiendo de la aplicación (p.ej. YM-10 de 10 KDa), adquiridos a la casa comercial Millipore.

Con el fin de eliminar las sales, tras la digestión trípica de las fracciones recogidas, se utilizaron cartuchos de extracción en fase reversa Zip-Tip 18.

Para la medida de la actividad del enzima Cu,Zn-SOD, tanto en el material de referencia, como en el extracto de eritrocitos, se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS, Lambda 20 de Perkin-Elmer (Massachussets, EE.UU.).

Con el fin de eliminar el exceso de ⁶⁵Cu y de ⁶⁸Zn, previamente añadidos al enzima Apo Cu,Zn-SOD para obtener el encima Cu,Zn-SOD enriquecido isotópicamente, se utilizó una membrana de diálisis de 3 mL con un corte de membrana de peso molecular de 5000 Da de Spectra/por® CE Float-A-Lyzer, Spectrum Europe B.V. (Breda, Netherlands).

C.1.5 Otra instrumentación utilizada

El ajuste de pH de las fases móviles empleadas en las separaciones cromatográficas se llevó a cabo con un pH metro modelo micropH2000 de Crisol Instruments S.A. (Barcelona, España).

Para las pesadas se utilizó una balanza de 0,01 mg modelo AE 163 de Mettler Cambridge, Productos Científicos (Cambridge, MA, EE.UU.).

Para la completa disolución de las soluciones (p.ej. las matrices utilizadas para MALDI) se utilizó un agitador magnético ó Vortex Velp de Scientifica (España).

Para la infusión directa o dilución post-columna se utilizó una jeringa Hamilton de 1 mL modelo 1000 Series Gastight.

C.2 MATERIALES, REACTIVOS Y DISOLUCIONES

El material de laboratorio que se utilizó de forma general fue:

- 1) Guantes de látex.
- 2) Pipetas pasteur de 1,5 y 3 mL de Brand (Alemania)
- 3) Micropipetas de distinto volumen: 1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL de Eppendorf.
- 4) Tips para micropipetas de Eppendorf.
- 5) Tubos de centrifuga de polietileno de Brand.

Todas las disoluciones acuosas se prepararon en Agua Milli-Q, obtenida mediante un sistema Milli-Q Advance A10 de Millipore. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

El ácido nítrico empleado para la limpieza del material de plástico, para la estabilización de las disoluciones metálicas ó para la realización de las digestiones ácidas en microondas, se purificó previamente mediante una destilación lenta “sub-boiling” a partir de ácido nítrico concentrado al 65% (p/v) de Merck. Así mismo, el peróxido de hidrógeno concentrado empleado en las digestiones de microondas también era de alta pureza (Suprapur[®], Merck).

Los patrones de proteínas empleados de apotransferrina, inmunoglobulina G, albúmina, ceruloplasmina, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, citocromo c, ovalbúmina, albúmina de suero bovino y superóxido dismutasa de suero humano y de suero bovino, se adquirieron en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Para la preparación de las fases móviles utilizadas en las separaciones cromatográficas (con la columna de intercambio aniónico) se empleó: Tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) y acetato de amonio (NH_4Ac TraceSelect) suministrados por Merck. El ajuste del pH de las fases móviles se realizó

empleando ácido acético (HAc) y NH₃ Suprapur® de Merck. Las fases móviles fueron preparadas el mismo día de su utilización y desgasificadas mediante borbotado con helio (He) justo antes de su utilización.

Las disoluciones de calibración de los elementos analizados (Cr, Co, Mo, Mn, Ti, Cu y Zn) y de los elementos utilizados como patrones internos (Ga e Y) fueron obtenidos de Merck. Las disoluciones fueron preparadas a partir de disoluciones de 1000 mg mL⁻¹ de cada uno de los patrones individuales de calidad ICP con contenidos certificados de impurezas en medio ácido (en HNO₃, excepto el Ti el cual estaba diluido en HF).

Para el análisis por dilución isotópica se utilizaron los siguientes patrones enriquecidos:

- Patrón de Cu enriquecido en el isótopo de m/z 65 (99,71% de abundancia en el isótopo ⁶⁵Cu) y una concentración de 604,38 ppm.
- Patrón de Zn enriquecido en el isótopo de m/z 68 (85,99% de abundancia en el isótopo ⁶⁸Zn) y una concentración de 1009,78 ppm.
- Patrón de Ti enriquecido en el isótopo de m/z 47 (80,71% de abundancia en el isótopo ⁴⁷Ti) y una concentración de 4,18 ppm.

Todos ellos obtenidos de Spectrascan, Teknolab A.S. (Dröbak, Norway). La concentración de estos patrones se determinó mediante dilución isotópica inversa, empleando los patrones de Cu, Zn y Ti con abundancias naturales. Las disoluciones fueron conservadas en nevera a 4°C. A estas disoluciones antes de ser utilizadas se les realizó una dilución con agua de calidad Milli-Q y HNO₃ al 2%, con el fin de preservar los metales en disolución.

Para la optimización diaria de las condiciones de operación y parámetros de adquisición del ICP-MS se utilizó una disolución de 10 ng g⁻¹ de Li, Co, Y y Tl en HNO₃ 1% (p/p), preparadas a partir de patrones comerciales de 1000 mg L⁻¹ de Merck. Para la optimización del HR-ICP-MS se utilizó una disolución de 10 ng g⁻¹ de Li, Y y Tl.

C. EXPERIMENTAL

El gas Ar (99, 999% de pureza) utilizado como gas plasmógeno y el gas He (99, 999% de pureza) utilizado para presurizar la celda de colisión en el ICP-MS (Thermo Fisher X SeriesII), fueron suministrados por la casa comercial Air Liquide (Madrid, España).

Para llevar a cabo el análisis por MALDI-TOF-MS se utilizaron las siguientes matrices: ácido sinapínico, 2,4,6-trihidroxiacetofenona y α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma Aldrich). Todas estas disoluciones se prepararon en acetonitrilo de pureza HPLC (Merck) y ácido trifluoroacético (TFA) de grado espectrofotométrico $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich).

Para las digestiones enzimáticas, se empleó bicarbonato amónico, yodoacetamida (IAA), DL-ditiotreitol (DTT) y tripsina, todos estos reactivos eran de Sigma-Aldrich.

Para la saturación de la transferrina con hierro se utilizaron disoluciones de cloruro de hierro (III) y bicarbonato de sodio de Merck.

Se utilizó neuraminidasa procedente de *Clostridium perfringens* (N2876-10U; grado proteómico, Sigma) para la ruptura secuencial de los ácidos siálicos.

Para realizar la limpieza de la columna se utilizaron disoluciones de cloruro de sodio, azida de sodio e hidróxido de sodio de Sigma y ácido clorhídrico de Merck.

C.3 MATERIALES DE REFERENCIA Y MUESTRAS

C.3.1 Materiales de referencia

Para la validación de las metodologías analítica empleadas para la medida de los contenidos totales de los elementos de interés (Cr, Co, Mo, Mn y Ti) en sangre, suero y orina, se emplearon los siguientes materiales de referencia: Seronorm™ Trace Element Whole Blood (Ref. 9067), Seronorm™ Trace Element Urine (Ref. 201205) y Seronorm™ Trace Element Serum (Ref. 201405), todos ellos del Nivel 1 de concentración de Seronorm™ (Nycomed AS, Oslo, Noruega, Noruega). A este nivel de concentración los metales se encontraban en el mismo orden de concentración que en los individuos no expuestos, utilizados como controles.

Para la validación de la metodología desarrollada par la cuantificación de Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos y bovinos, se emplearon estándares comerciales de este enzima extraído de eritrocitos humanos (S9636-3KU) y bovinos (S5395-15KU), respectivamente (Sigma Aldrich).

C.3.2 Muestras

Las muestras de sangre (tanto provistas como desprovistas de anticoagulante, con el fin de poder separar el suero) y orina, tanto de pacientes portadores de implantes, como de los individuos no expuestos (utilizados como controles), fueron proporcionadas por el Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Asturias, España), con el “consentimiento informado” de todas las personas involucradas y con la aprobación del estudio por el “Comité de Ética Local”.

C.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales más relevantes y aquellos que no han sido suficientemente detallados en los diferentes artículos publicados durante el transcurso de la presente Tesis Doctoral.

C.4.1 Protocolos de limpieza

Con el fin de evitar posibles contaminaciones (problema bien conocido y de gran trascendencia en el análisis de trazas metálicas), los recipientes de plástico utilizados durante la presente Tesis Doctoral fueron sometidos a una etapa de limpieza. Esta etapa de limpieza consistió en llenar los recipientes con una disolución de HNO_3 de calidad “sub-boiling” al 10%, al menos durante 48h. A continuación, se lavaron varias veces con agua destilada de calidad Milli-Q y se secaron en la estufa previamente a su uso. Dicho protocolo también se llevó a cabo para la limpieza de los recipientes empleados en la recogida de las muestras de orina.

C.4.2 Obtención y tratamiento de las muestras biológicas (orina, sangre y suero)

Todas las muestras fueron recogidas, almacenadas y tratadas siguiendo un estricto protocolo con el fin de evitar la contaminación metálica.

A) Muestras de orina: en el caso de las muestras de orina y siguiendo el protocolo puesto a punto en nuestro grupo de investigación [2] siempre se recogió la primera orina de la mañana, con el fin de que los analitos estuviesen lo más concentrados posibles. Las muestras fueron recogidas en botes de polietileno de baja densidad (LPDE) de 50 mL, previamente descontaminados en nuestro laboratorio (siguiendo el protocolo detallado en el apartado anterior de la presente Tesis Doctoral).

Teniendo en cuenta que la orina poseen un alto contenido salino y de materia orgánica que pueden producir importantes interferencias, tanto

espectrales como de matriz, así como obturaciones en el nebulizador, en el canal central de la antorcha ó en los conos de la interfase, se evaluó el mejor tratamiento de muestra con el fin de poder determinar la concentración total de los metales de interés (Cr, Co, Mo, Mn y Ti) en dichas muestras de orina humana mediante ICP-MS. Para ello, una vez que las muestras estaban en el laboratorio se filtraron (filtros de 0,2 μm), para eliminar la materia orgánica en suspensión. A continuación, se les añadió la cantidad necesaria de HNO_3 concentrado de calidad "sub-boiling", con el fin de tener una concentración final del 1% (v/v) y así evitar el crecimiento bacteriano y las adsorciones de los metales sobre las paredes de los botes y por tanto, permitiendo mantener dichos metales en disolución de forma estable. Finalmente, las muestras acidificadas se agitaron vigorosamente y se guardaron en el congelador hasta su análisis.

El día del análisis, se les realizó una dilución 1:10 con agua de calidad Milli-Q, con el fin de minimizar las interferencias de matriz y se les adicionaron los patrones internos (Ga e Y) en una concentración final de 1 ppb.

B) Muestras de sangre: la recogida de las muestras de sangre se llevó a cabo en tubos especialmente preparados para el análisis de trazas y ultratrazas metálicas (Vacuette, Greiner Bio-one, Madrid, España), acondicionados con heparina de litio como anticoagulante. Previamente a la toma de muestra, mediante venipuntura, se acondicionó la piel del paciente, limpiándola con agua de calidad Milli-Q y a continuación con etanol de alta pureza, dejándola secar al aire (sin emplear gasas ó algodón). Además, para evitar todo tipo de contaminación y dado que las agujas de las jeringuillas están normalmente compuestas de aleaciones de Al, Co, Cr, Mn, Mo, Ni o V, se utilizaron agujas insertadas en cánulas de teflón. De manera que, con la aguja metálica se atravesaba la piel del paciente hasta llegar a la vena y, a continuación, se retiraba la aguja con lo que la sangre se extraía únicamente a través de la cánula de teflón. Aún así, la sangre extraída de cada paciente (10 mL) se dividía en dos tubos vacuette, los 5 mL de sangre del primer tubo se utilizó para realizar las

C. EXPERIMENTAL

optimizaciones de la metodología y los 5 mL de sangre del segundo tubo era la que se utilizaban para llevar a cabo los análisis finales.

Las muestras de sangre, debido a su complejidad, requieren ser sometidas a digestión ácida en un horno de microondas antes de proceder a su análisis mediante ICP-MS. Para ello se introdujo aproximadamente 1 mg de sangre en cada bomba de teflón, se adicionaron 6 mL de ácido nítrico “sub-boiling” (diluído 1:3 con agua Milli-Q) y 1mL de peróxido de hidrógeno. Una vez adicionada la mezcla, las bombas se cerraron e introdujeron en el horno microondas sometiéndolas al programa de temperaturas optimizado que aparece detallado en la C.III.

Tabla C.III. Programa de microondas utilizado para la digestión de las muestras de sangre

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Potencia (W)
3	95	900
10	160	900
18	185	900

A continuación, la muestra se diluyó con el fin de eliminar o al menos minimizar al máximo las interferencias de matriz, por lo que se estudió la dilución más adecuada sin que ello supusiese una pérdida excesiva de la sensibilidad. La dilución resultó ser 1:20, con agua Milli-Q. De este modo, una vez que las muestras de sangre estuvieron digeridas se extrajeron de las bombas, se les adicionaron los patrones internos (1 ppb de Ga e Y), para corregir la deriva instrumental, se diluyeron 1:20 como agua Milli-Q y se reservaron en el congelador hasta la medida. Se realizaron 3 réplicas de cada muestra y se obtuvo un blanco en cada ataque de microondas.

C) Muestras de suero: finalmente, para la obtención de las muestras de suero se procedió del mismo modo que para la obtención de las muestras de sangre, pero en este caso, se utilizaron tubos de polietileno de baja densidad (Vacuette) desprovistos de anticoagulante. Una vez que las muestras de sangre estaban en laboratorio (el mismo día de su recogida), se sometieron a una centrifugación a 3000g durante 20 min, que permitió separar el suero de los eritrocitos o glóbulos rojos. Para la cuantificación total de Ti en el suero mediante dilución isotópica, se tomaron 0,6 mL de cada muestra de suero, a continuación se le adicionó la cantidad adecuada de una disolución enriquecida isotópicamente en el isótopo ^{47}Ti y, finalmente, se diluyeron hasta un volumen de 3mL (procedimiento que se detallará más adelante). Con el fin de llevar a cabo la especiación metálica en muestras de suero humano, éste se diluyó 1:1 con Fase móvil A (50 mM Tris-hidroximetilaminometano a pH 7,4), previamente a su inyección en el sistema cromatográfico. Para la cuantificación de Ti en el material de referencia certificado por SERONORM, así como en aquellos pacientes que poseían una baja concentración de este metal en suero ($< 2 \text{ ng g}^{-1}$), la muestra se preconcentró mediante el uso de filtros de membrana con un tamaño de corte de 30 KDa.

C.4.3 Tratamiento de las muestras de sangre para la extracción de la enzima Cu,Zn-superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD)

En la presente Tesis Doctoral se desarrolló una metodología para la extracción de la enzima Cu,Zn-SOD de los glóbulos rojos o eritrocitos. De este modo, las muestras de sangre se trataron para separar los glóbulos rojos mediante una centrifugación a 3000g durante 20 min a 4°C. A continuación, se descartó el suero y los glóbulos rojos fueron hemolizados mediante adición de agua fría (a 4°C) de calidad Milli-Q (4,5 mL de agua por 0,5 g de glóbulos rojos) y agitación continua durante 3 minutos a temperatura ambiente, utilizando un vortex. Una vez hemolizados los glóbulos rojos, se procedió a la precipitación de la hemoglobina. Éste es un paso muy importante ya que la

C. EXPERIMENTAL

hemoglobina es la proteína más abundante en la sangre, para ello se adicionó una mezcla de etanol y cloroformo en relación de volumen (2:1) (3,75 mL totales por 0,5 g de glóbulos rojos). Tras la adición de esta mezcla se agitó vigorosamente durante 5 minutos y la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se dividió en dos alícuotas, a una de ellas se le midió la actividad enzimática directamente y la otra se hizo pasar por un filtro de membrana con un tamaño de corte de 10 KDa, para la eliminación de sales y para su preconcentración hasta un volumen aproximado de 150 μ L, antes de proceder a su análisis por HPLC-UV y HPLC-ICP-MS.

C.4.4 Medida de la actividad de la enzima Cu,Zn-SOD mediante el ensayo del pirogalol

La actividad de la enzima Cu,Zn-SOD fue determinada por el método de la autooxidación del pirogalol [3]. Dicho método está basado en la generación del radical superóxido (a una velocidad controlada constante) por el reactivo pirogalol al mismo tiempo que éste se autooxida (a un pH aproximado de 8,2), generando un producto amarillento que absorbe a 420 nm. En presencia del enzima SOD, éste compite con el pirogalol por el radical superóxido, produciendo la inhibición del nivel de autooxidación del pirogalol y por tanto del producto final coloreado, que se mide espectrofotométricamente.

En este método, una unidad de actividad de SOD es definida como aquella capaz de producir un 50% de inhibición. En el caso del estándar comercial se tomó una alícuota del mismo y en el caso de las muestras reales de sangre se tomó una alícuota tras realizarle el protocolo para extraer el enzima de los eritrocitos y posterior precipitación de la hemoglobina. A continuación, se llevaron a un volumen final de 1,9 mL con una disolución reguladora de Tris/HCl, pH 8,20 (la cual contenía ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA, 1mM), para eliminar iones de Cu que pudiesen estar libres) y justo antes de la medida espectrofotométrica a cada una de las muestras se les añadió un volumen fijo de 100 μ L de pirogalol 5 mM (previamente preparado en HCl 10

mM), se agitaron y se esperó unos 40 s antes de la medida de la absorbancia. Finalmente, la absorbancia se midió durante 4 minutos a temperatura ambiente. En la Figura C.5 se muestran las gráficas obtenidas al representar la absorbancia frente al tiempo (A), para una serie de estándares de actividad creciente, expresado en $U\ mL^{-1}$ (B), mediante este ensayo.

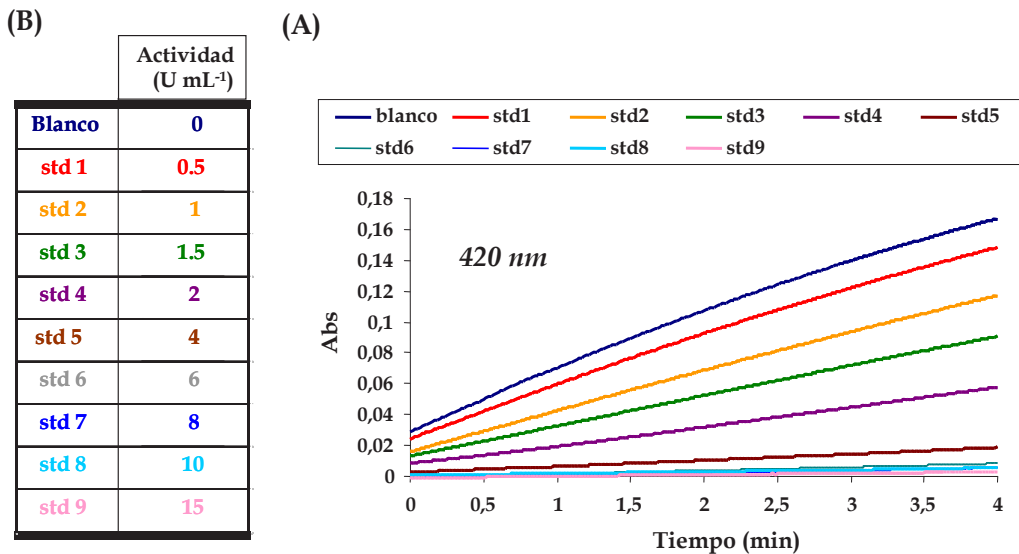


Figura C.5. Representación de la Absorbancia frente al tiempo (A) para una serie de estándares de actividad creciente (B), obtenidos mediante el ensayo del Pirogalol

Gracias a esta representación (absorbancia frente a tiempo) es fácil observar cómo a medida que aumenta la cantidad de enzima (actividad) en los distintos estándares disminuye la absorbancia, de este modo el blanco (traza azul) será el que mayor absorbancia produce y a partir de él ésta irá disminuyendo al aumentar la actividad del enzima (traza roja, naranja, verde, etc.).

A continuación, se representó la absorbancia/tiempo (es decir, la pendiente de cada una de las rectas anteriores) frente a la actividad teórica de cada estándar (información del fabricante) obteniendo la gráfica que se muestra en la Figura C.6.

C. EXPERIMENTAL

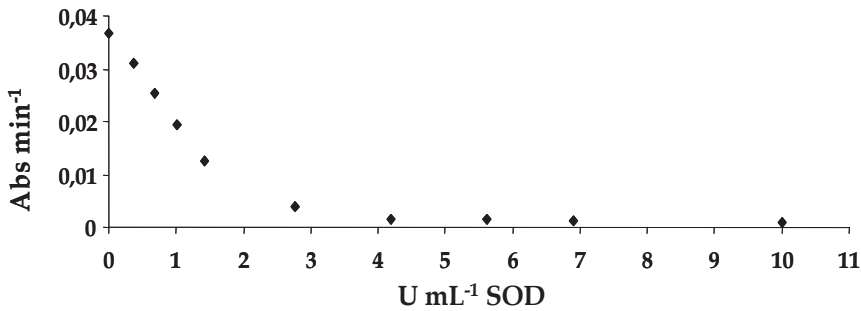


Figura C.6. Representación de la Abs min⁻¹ frente a la actividad teórica (U mL⁻¹) para varias diluciones de un estándar de Cu,Zn-SOD

Es fácil observar cómo a partir de 2 U mL⁻¹ del enzima se produce su saturación con lo cual podremos ajustarlo a una recta si representamos sólo hasta este valor de actividad (Figura C.7).

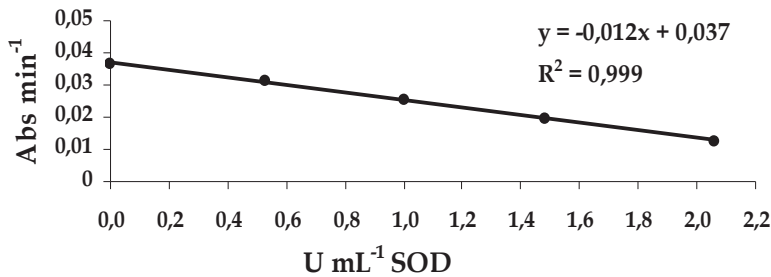


Figura C.7. Representación del rango lineal de la Abs min⁻¹ frente a la actividad teórica (U mL⁻¹) para varias diluciones de un estándar de Cu,Zn-SOD

Teniendo en cuenta que el porcentaje de inhibición viene dado por la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs min}^{-1} \text{ blanco} - \text{Abs min}^{-1} \text{ Muestra}}{\text{Abs min}^{-1} \text{ blanco}} * 100$$

Se puede representar el porcentaje de inhibición frente a actividad según se muestra en la Figura C.8.

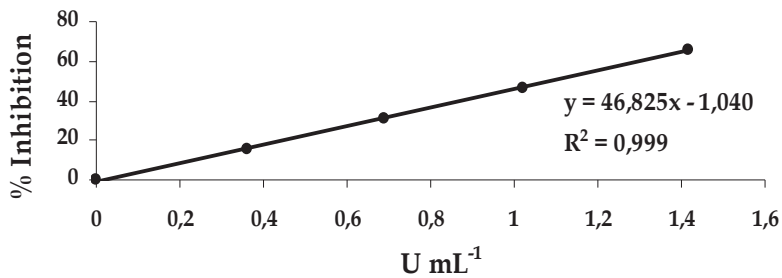


Figura C.8. Representación del % de Inhibición de la autoxidación del pirogalol frente a la actividad teórica (U mL⁻¹) para varias diluciones de un estándar de Cu,Zn-SOD

C.4.5 Evaluación de la recuperación del Cu y Zn asociados al enzima Cu,Zn-SOD de la columna cromatográfica de intercambio aniónico

Con el fin de evaluar la recuperación del enzima Cu,Zn-SOD de la columna cromatográfica de intercambio aniónico (Mono Q), se midieron las concentraciones de estos elementos (Cu y Zn), mediante ICP-MS, en un estándar bovino de Cu,Zn-SOD antes y después de su inyección en la columna cromatográfica. Una vez recogido el eluyente después de la separación cromatográfica se añadieron los patrones internos Ga e Y y se llevó a cabo la cuantificación mediante ICP-MS a través de calibrado externo de Cu y Zn. Los cálculos pertinentes proporcionaron unas recuperaciones para el Cu de $103 \pm 2\%$ y para el Zn de $70 \pm 3\%$.

Teniendo en cuenta este hecho y también que el Cu es el centro catalítico del enzima (sin el cual éste pierde su actividad), para la cuantificación del Cu,Zn-SOD mediante dilución isotópica sólo se tuvo en cuenta este metal, aunque el Zn siempre se monitorizó para confirmar la identidad de la especie. La labilidad del Zn ya había sido estudiada previamente [4] observando que bajo condiciones ligeramente ácidas (pH=4) el primer metal en liberarse del enzima Cu,Zn-SOD era precisamente el Zn.

C.4.6 Obtención de la enzima Cu,Zn-superóxido dismutasa isotópicamente enriquecida

Para llevar a cabo la dilución isotópica específica fue necesario sintetizar la enzima Cu,Zn-SOD isotópicamente enriquecida, debido a que no existe de forma comercial. Para ello, se tomaron como base los trabajos llevados a cabo por C. Dietrich y col. [5] y Y. Yamazaki y col [4].

Experimentalmente se trató 1 mg tanto del patrón de Cu,Zn-SOD extraído de eritrocitos bovinos como de humanos y se disolvió en 1 mL de 10 mM de acetato de amonio (pH 6,3). A continuación, se transfirió a una membrana de diálisis de 3 mL con un corte de membrana de peso molecular de 5000 Da. La disolución de la enzima se dializó frente a un buffer de acetato de amonio 20 mM pH 6,3 durante 1h a temperatura ambiente, con el fin de eliminar impurezas de bajo peso molecular y así obtener una solución más pura.

Para la obtención de la apo-enzima, la disolución se dializó frente a 20 mL de acetato de amonio 20 mM pH 3,1 conteniendo 5 mM EDTA durante 2h. A continuación, el buffer de diálisis se reemplazó por otro buffer de acetato de amonio 20 mM pH 6,8 durante 1h, obteniendo de este modo la apo-enzima (enzima desprovisto de metales). A continuación, la estructura de la apo-enzima se confirmó mediante MALDI-TOF-MS según las condiciones que se mostrarán a continuación.

Finalmente, la enzima apo-SOD fue remetalada con Cu y Zn isotópicamente enriquecidos en los isótopos ^{65}Cu y ^{68}Zn . Para la correcta incorporación de estos metales las disoluciones de ^{65}Cu y ^{68}Zn fueron añadidas secuencialmente a diferentes pH según el trabajo de C. Dietrich [5]. En primer lugar, se procedió a la incorporación del ^{68}Zn , para ello se añadieron 100 μL de una disolución de 1009,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 8,2 y se dejó incubando a 37°C durante 4h. A continuación, se añadieron 250 μL de una disolución de ^{65}Cu de 604,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a pH 8,2 y fue incubada a 37°C durante toda la noche. Con el fin de

eliminar el exceso de ^{65}Cu y ^{68}Zn que no se hubiese enlazado, la enzima re-metalada se pasó a través de un filtro de membrana de 10 KDa de corte y lavada varias veces con agua Milli-Q. La estructura de la enzima ^{65}Cu , ^{68}Zn -SOD isotópicamente enriquecida fue confirmada mediante MALDI-TOF (proteína intacta y a través de sus péptidos una vez realizada la digestión triptica) como se muestra a continuación.

C.4.7 Tratamiento de las muestras para su análisis mediante MALDI-TOF-MS

Para la confirmación de la identidad de las proteínas que transportan los principales metales liberados de los implantes, así como de la enzima Cu,Zn-SOD, en el pico cromatográfico en el que co-eluyen el Cu y el Zn, se utilizó el MALDI-TOF-MS. La identificación mediante MALDI se puede llevar a cabo a través de la identificación de la proteína intacta o a través de sus péptidos una vez digerida ésta (mapeo peptídico).

Para las proteínas intactas, las fracciones cromatográficas correspondientes a las especies de interés se ultrafiltraron mediante el uso de filtros de membrana con un tamaño de corte de peso molecular de 10 KDa (Centricon YM-10) debido a la facilidad de uso y porque permite desalinizar y preconcentrar hasta volúmenes de 25 μl .

Para llevar a cabo el análisis de proteínas mediante mapeo peptídico utilizando MALDI-TOF-MS se necesita llevar a cabo una *digestión triptica* previa de dichas proteínas. Para ello, se procedió como se explica a continuación: a 50 μL de muestra se le añadieron 50 μL de urea (12 M en 0,1 M de Tris-HCL) y 5 μL de ditioneitol (DTT, 0,2 M) con el fin de reducir las uniones disulfuro. A continuación, la mezcla fue cenrifugada durante 1 min a 700 g y se mantuvo 1h a T^a ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 20 μL de yodoacetamida (IAA, 0,2 M) con el fin de proteger los grupos SH y la mezcla se dejó reaccionar una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 20 μL más de DTT con el objetivo de consumir el exceso de IAA y tras una hora se

C. EXPERIMENTAL

añadieron 775 μL de agua de calidad Milli-Q y 100 μL de tripsina. Toda la mezcla se introdujo en un baño a 37 °C durante 15h. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción ajustando el pH con ácido acético a un pH aproximado de 6. Finalmente, los péptidos obtenidos mediante este procedimiento fueron purificados utilizando cartuchos de fase reversa Zip-Tip C₁₈.

Para ello se debe seguir el protocolo que se indica a continuación:

1. Acondicionamiento de los Zip-Tip C₁₈ aspirando en primer lugar acetonitrilo (ACN) al 50% y posteriormente ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%.
2. Aspiración de la muestra. Para ello, se transfieren 10 μL de la muestra de péptidos a un eppendorf al cual se había adicionado previamente con 1 μL de TFA al 1% y se aspira con el Zip-Tip durante varias veces (cogiendo y depositando en el propio eppendorf evitando la entrada de aire).
3. Lavado de la muestra mediante aspiración de 10 μL de TFA al 0,1% y descarte.
4. Elución de los péptidos. Para ello, se adicionan 5 μL de ACN al 50% a un eppendorf y se aspiran y eluyen en el propio eppendorf varias veces.

El análisis, tanto de las proteínas intactas, como de sus péptidos, se realizó con un MALDI-TOF-MS, trabajando en todos los casos en modo positivo. Las muestras se depositaron en una placa de acero inoxidable recubierta de teflón (Voyager 96 x 2 Sample Plate P/N V700813), utilizando la técnica de cristalización de gota secada al aire que consta de dos pasos: en primer lugar se deposita en el pocillo de la placa 0,5 μL de la muestra desalinizada y preconcentrada y sobre ella la misma cantidad de la disolución de la matriz.

C.4.8 Saturación de la transferrina con hierro

Para separar las sialoformas de la transferrina (Tf) de suero humano mediante cromatografía de intercambio aniónico es preciso llevar a cabo la saturación con Fe de la proteína puesto que el punto isoeléctrico de dichas especies depende tanto del contenido en ácidos siálicos, como del contenido en Fe.

En el caso del tratamiento para el patrón de Tf, se disolvieron 3 mg del estándar de apo-transferrina (Tf libre de Fe) en 1 mL de agua Milli-Q. La solución se agitó en Vortex hasta completa disolución. A continuación, se añadieron 25 μ L de una disolución de 500 mM de bicarbonato sódico, como anión sinérgico, y 25 μ L de una disolución 10 mM de FeCl₃. Esta concentración proporciona un exceso de Fe respecto a la concentración de Tf de aproximadamente siete veces (hay que considerar que aunque la estequiometría del complejo Fe:Tf en condiciones de saturación es de 2:1, el exceso de Fe es necesario para forzar el equilibrio). La mezcla se incubó 15h a T^a ambiente. También se llevó a cabo una semi-saturación de la transferrina siguiendo el mismo protocolo anterior y únicamente modificando la cantidad de FeCl₃ añadida (29 μ L de una disolución de 2,5 mM de FeCl₃ lo que proporciona un exceso de Fe de 1,8 veces la concentración de Tf, es decir inferior a las condiciones de saturación). En el caso de la saturación de las muestras de suero humano, se tomaron 500 μ L de suero y se diluyeron 1+1 con una disolución reguladora de Tris-HAc 25mM a pH 7,4 antes de la adición de Fe de forma análoga al estándar.

Una vez realizada la saturación y semisaturación con Fe, las muestras y los estándares se filtraron mediante filtros de 0,22 μ m, previamente a su inyección en el sistema cromatográfico.

C.4.9 Tratamiento enzimático de la transferrina con neuraminidasa

Para eliminar los ácidos siálicos presentes en la cadena de carbohidratos de la Tf, se procedió al tratamiento tanto del estándar de la proteína, como de un suero (tanto de un paciente como de un control), con una enzima denominada sialidasa (o neuraminidasa). La neuraminidasa es un enzima capaz de eliminar de forma gradual los ácidos siálicos de la glicoproteína hasta la aparición de la asialoproteína, permaneciendo el resto de las cadenas de azúcares unidas a la proteína. Para ello, 3 mg del patrón de Tf y 500 μ L de suero (tanto de un paciente como de un control) se disolvieron en 3 mL y 500 μ L, respectivamente, de una disolución de acetato de sodio 0,1M a pH 5,0 y en ambos casos se les añadió el volumen necesario del enzima para tener una actividad en disolución de 0,1 U de neuraminidasa. La mezcla se dejó reaccionar durante 24h a 37°C. Transcurrido este tiempo, cada una de estas mezclas se dializaron frente a agua de calidad Milli-Q durante 2h para obtener, finalmente, las formas asialo de la Tf. El patrón de apo Tf asialo se dividió en tres alícuotas (de 1 mL cada una). A la primera no se le añadió Fe y las otras dos alícuotas se trataron como se describió en la sección anterior, con el fin de llevar a cabo la saturación y la semi-saturación del patrón apo-Tf asialo con Fe. A la muestra de suero control asialo, teniendo en cuenta que ya se encuentra naturalmente semi-saturado con Fe (pues la concentración de Fe en el suero es inferior a la concentración de la Tf) se le realizó el procedimiento anterior con el fin de obtener el suero control asialo saturado en Fe.

C.4.10 Estudio de la posible hipersensibilidad asociada a los metales liberados por los implantes metálicos mediante el test MELISA

Aunque estos análisis se realizaron en el Instituto Sabater (Barcelona) que posee la única licencia en España para realizar este ensayo específico, se describirá brevemente en que consiste. El ensayo MELISA acrónimo de “Memory Lymphocyte Immuno-Stimulation Assay” es un ensayo que estudia la hipersensibilidad a metales. Muestras de sangre periférica anti-coagulada se recogieron en tubos vacutainer libres de metales con citrato como anticoagulante. Las muestras se lavan dos veces con medio RPMI-1640 que

contiene Hepes, 8 mg L⁻¹ de gentamicina y 6,25 mM de L-Glutamina. Las células mononucleares se separan por centrifugación durante 30 minutos a 600 g. A continuación, las células se resuspenden en el mismo medio conteniendo 20% de suero humano inactivado y se incuban durante 30 minutos a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Este procedimiento produce la eliminación parcial de los monocitos presentes en la suspensión de linfocitos. Las células son resuspendidas en un medio que contiene glutamina y 10% de suero humano inactivado hasta una concentración final aproximada de 1x10⁶ células ml⁻¹. Un mL de la suspensión se añade a cada pocillo de placas de cultivo (48 pocillos) pre-recubiertas con las sales de los metales de interés en el estudio. Las disoluciones de los metales (Cr, Co, Mn y Ti) se prepararon por dilución de las sales sólidas en agua desionizada y filtrada a través de un filtro estéril. Tres pocillos sin metal son utilizados como controles negativos. Se utiliza como control positivo 1 mL de la suspensión de linfocitos al que se le ha añadido el mitógeno Poke Weed (Sigma-Aldrich).

Después de cinco días de incubación a 37°C y 100% de humedad, 600 µl de la suspensión celular de cada pocillo se transfiere a una nueva placa de cultivo y se le añaden 111 kBq de metil-³H-timidina. Tras cuatro horas de incubación se recogen las células y la radiactividad incorporada en el DNA de las mismas se mide, con un contador de centelleo.

La estimulación de los linfocitos en los cultivos que contienen metal se expresa como índice de estimulación (SI):

$$SI = \frac{\text{cpm (en cultivos experimentales)}}{\overline{\text{cpm (en cultivos control)}}$$

Donde: cpm son cuentas por minuto y $\overline{\text{cpm}}$ es la media de las cuentas por minuto.

C. EXPERIMENTAL

De este modo:

- » valores de **SI** < 2 indicaría una respuesta negativa.
- » valores de **SI** entre 2 y 3 indicaría una posible sensibilización a metales.
- » Valores de **SI** > 3 indicaría una respuesta positiva.

Puesto que el índice de estimulación (**SI**) es altamente dependiente de los valores controles, a veces la estimulación de los linfocitos también puede expresarse como delta cpm (Δcpm).

$$\Delta\text{cpm} = \text{cpm (en cultivos experimentales)} - \text{cpm (en cultivos control)}$$

C.5 METODOLOGÍAS DE CÁLCULO

En este apartado se detallan las metodologías de cálculo llevadas a cabo en la presente Tesis Doctoral.

C.5.1 Medida de las relaciones isotópicas: cálculo del factor de discriminación de masas y tiempo muerto del detector en el ICP-MS

Las medidas de relaciones isotópicas están sujetas a una serie de errores sistemáticos que deben conocerse y tenerse en cuenta, como son las interferencias espectrales (previamente comentadas), el tiempo muerto del detector y la discriminación de masas.

- **Tiempo muerto del detector**

Se podría definir como el tiempo que necesita el detector de ICP-MS para contabilizar la llegada de dos iones como dos eventos diferentes. Los equipos de ICP-MS convencionales poseen un sistema de detección que incluye una electrónica de conteo, por tanto las señales se registran como número de pulsos por unidad de tiempo. Cuando la velocidad de conteo es muy elevada ($> 10^6$ cuentas por segundo) es cuando el efecto del tiempo muerto del detector adquiere real importancia ya que se estarán registrando menos iones de los que están llegando al detector. Dado que la pérdida de cuentas es función del número de iones que llegan al detector por unidad de tiempo, cuando se mide una relación isotópica distinta a la unidad, la pérdida de cuentas para los dos isótopos será de distinta magnitud y, por tanto, la relación isotópica medida será diferente a la real. Por tanto este parámetro debe ser evaluado para corregir las relaciones isotópicas. Una vez conocido el tiempo muerto del detector (T) las intensidades se pueden corregir utilizando la ecuación siguiente (Ecuación C.1):

$$T_{\text{corregida}} = \frac{I_{\text{medida}}}{1 - I_{\text{medida}} T} \quad \text{Ecuación C.1}$$

El método más habitual para calcular el tiempo muerto del detector es la medida de las relaciones isotópicas de un elemento a diferentes concentraciones [6]. Los valores de este parámetro obtenidos para los distintos ICP-MS empleados en la presente Tesis Doctoral oscilaron entre 15 y 60 ns.

- **Discriminación de masas**

Consiste en una transmisión preferencial de los iones más pesados frente los más ligeros, tanto a través de la interfase de extracción como de las lentes iónicas (efecto espacio-carga) del espectrómetro de masas. Por lo tanto, una relación isotópica medida experimentalmente R_m llevará asociada un error respecto a la relación isotópica real o teórica que será proporcional a la diferencia de masa entre los dos isótopos medidos.

En la medida de las relaciones isotópicas mediante ICP-MS, este efecto se puede corregir utilizando un estándar de composición conocida o certificada (material de referencia isotópico) [7] y cuando no se dispone de un estándar isotópico del elemento a analizar, el cálculo de este factor se puede realizar utilizando otro elemento de m/z similar [8]. En ambos casos esta corrección implica el cálculo del llamado factor de discriminación de masas (K) utilizando la ecuación matemática adecuada. Estas ecuaciones pueden ser lineales (Ecuación C.2), potenciales (Ecuación C.3) o exponenciales (Ecuación C.4) como se muestra a continuación:

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{medida}}}{1+K\Delta M} \quad \text{Ecuación C.2} \quad R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{medida}}}{(1+K)^{\Delta M}} \quad \text{Ecuación C.3}$$

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{medida}}}{e^{(K\Delta M)}} \quad \text{Ecuación C.4}$$

En las tres ecuaciones, R es la relación isotópica, K es el factor de discriminación de masas y ΔM es la diferencia de masa entre los isótopos.

En la presente Tesis Doctoral se utilizó *el modelo exponencial* para la corrección del factor de discriminación de masas, el cual se evaluaba diariamente, al principio y final de las medidas. De forma experimental, se midió una disolución del elemento a analizar (Cu o Ti en cada caso) de 100 ng g^{-1} con abundancias isotópicas naturales. Una vez medidos, a partir de las intensidades medidas experimentalmente (una vez corregidas con el tiempo muerto del detector y un blanco) se calcularon las relaciones isotópicas (R_{medidas}) que se compararon con las relaciones isotópicas teóricas ($R_{\text{corregida}}$), obteniéndose así el valor del factor de discriminación de masas. Una vez obtenido el valor se empleó en la corrección de todas las medidas reales de relaciones isotópicas. El factor de discriminación de masas, observado en la medida de Cu utilizando el modelo exponencial, era de -0.04 en el ICP-ORS-MS. En el caso del HR-ICP-MS el factor de discriminación de masas obtenido era tan pequeño que no alteraba en absoluto los resultados.

C.5.2 Determinación de la concentración total de Cr, Co, Mo, Mn y Ti en muestras de sangre y orina mediante calibración externa utilizando el HR-ICP-MS

La cuantificación de los contenidos metálicos totales de Cr, Co, Mo, Mn y Ti en las muestras de sangre y orina se realizó mediante calibración externa. Para ello, se construyeron rectas de calibrado con patrones acuosos de los elementos correspondientes, a los cuales se les adicionaron los mismos patrones internos adicionados a las muestras (Ga e Y). Cada calibrado constó de 9 puntos de concentración variable en función de la muestras a analizar y de las concentraciones esperadas. Con el fin de garantizar la inexistencia de efectos de memoria, así como posibles derivas de señal se midió un blanco tras cada muestra medida (HNO_3 al 2% mas adición de los patrones internos). Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos para los elementos objeto de estudio, una vez corregida la señal con el patrón interno más adecuado en cada caso, oscilaron entre 0,9997 y 1.

C.5.3 Determinación de la concentración total de Ti en suero humano mediante dilución isotópica

El análisis por dilución isotópica (IDA) es una metodología analítica de cuantificación basada en la medida de las abundancias isotópicas de un elemento en una muestra, en la cual dichas abundancias han sido previamente alteradas mediante la adición de una cantidad conocida de la disolución isotópicamente enriquecida en un determinado isótopo (trazador o spike). El elemento a analizar debe tener al menos dos isótopos estables o radiactivos de vida media larga que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante MS.

La ecuación de la dilución isotópica empleada para obtener la concentración se muestra a continuación (Ecuación C.5):

$$C_s = C_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \frac{R_m \cdot R_{sp}}{1 - R_m R_s} \quad \text{Ecuación C.5}$$

Particularmente, en el caso del Ti cada uno de los parámetros de la ecuación son los que se muestran a continuación:

- C_s y C_{sp} son las concentraciones del Ti en la muestra y en el trazador, respectivamente.
- m_s y m_{sp} son las masas tomadas de la muestra y del trazador, respectivamente.
- M_s y M_{sp} son los pesos atómicos del Ti en la muestra y en el trazador, respectivamente.
- A_{sp}^b es la abundancia isotópica del isótopo 47 en el trazador y A_s^a es la abundancia isotópica del isótopo 49 en la muestra.
- R_{sp} es la relación isotópica $^{49}\text{Ti}/^{47}\text{Ti}$ en el trazador (conocidas mediante la caracterización previa del trazador).
- R_s es la relación isotópica $^{47}\text{Ti}/^{49}\text{Ti}$ obtenida en la muestra.

- R_m es la relación isotópica obtenida al dividir la señal obtenida para el isótopo 49 entre la señal obtenida para el isótopo 47 ($^{49}\text{Ti}/^{47}\text{Ti}$) en la mezcla de la muestra y el trazador.

Como se puede observar todos los parámetros de esta ecuación son conocidos o medibles, por lo que la concentración del elemento en la muestra (C_s) se calcula simplemente a partir de la medida de la relación isotópica R_m mediante espectrometría de masas.

El primer paso para poder aplicar esta estrategia de cuantificación consiste en la caracterización de la disolución del trazador empleado. Con el fin de llevar a cabo la caracterización de la disolución enriquecida en el isótopo 47 del Ti (^{47}Ti) han de medirse tanto las abundancias de todos los isótopos de Ti en dicha disolución mediante ICP-MS, como la concentración exacta de Ti en la misma. Para ello, se empleó la dilución isotópica inversa (se denomina inversa porque la concentración desconocida era C_{sp} y no C_s como es habitual), para ello, a cierta cantidad del patrón enriquecido se le añadió una cantidad, conocida, del patrón natural certificado de Ti (Merck) y esta mezcla se introdujo en el ICP-MS, por nebulización convencional. Todas las disoluciones se prepararon en Agua Milli-Q con un 2% de ácido nítrico.

La determinación de la concentración total de Ti en suero se llevó a cabo mediante análisis de dilución isotópica. Para ello, a una alícuota del suero (600 μL), tanto de los pacientes portadores de implantes, como de las personas no expuestas (no portadoras de implantes) utilizados como controles, se les adicionó el trazador (30 μL de una disolución de ^{47}Ti de, aproximadamente, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ previamente caracterizado) y se diluyó hasta 3 mL con agua Milli-Q. Dicha mezcla se homogeneizó perfectamente con la intención de alcanzar el equilibrio isotópico previo a su análisis.

En la Tabla C.IV se recogen las abundancias isotópicas y la concentración del patrón enriquecido en el isótopo 47 del Ti (^{47}Ti), caracterizado mediante HR-ICP-MS (Thermo Fisher Element 2).

C. EXPERIMENTAL

Tabla C.IV. Abundancias isotópicas y concentraciones del Ti enriquecido isotópicamente, obtenido mediante dilución isotópica inversa

	⁴⁶ Ti	⁴⁷ Ti	⁴⁸ Ti	⁴⁹ Ti	⁵⁰ Ti
Ti natural (IUPAC)					
Abundancias Isotópicas (%)	8,25	7,44	73,72	5,41	5,18
Concentración (µg g ⁻¹)	1000				
Patrón enriquecido de ⁴⁷Ti (Spectrascan)					
Abundancias Isotópicas (%)	2,43	72,47	22,83	1,21	1,06
Concentración (µg g ⁻¹)	4,18				

Con el fin de evitar la obturación del canal central de la antorcha y garantizar la ausencia de efectos de memoria, tras cada muestra medida se introdujo agua Milli-Q durante 5 minutos y a continuación se midió el blanco (ácido nítrico al 2%) antes de proceder con la medida de la muestra siguiente.

C.5.4 Especiación elemental cuantitativa mediante estrategias de dilución isotópica

Con el fin de cuantificar las especies metálicas que han sido separadas y detectadas mediante las mencionadas “técnicas híbridas” e identificadas mediante las técnicas moleculares, también se puede hacer uso de las estrategias de dilución isotópica dando lugar a la “especiación elemental cuantitativa”. Las metodologías de dilución isotópica permitirán tanto el análisis cuantitativo de las especies metálicas de interés como la evaluación y corrección de posibles interconversiones entre las especies durante el tratamiento de las muestras. Numerosas aplicaciones ya han sido publicadas durante los últimos años [9-13]. Heumann y colaboradores [13] fueron los pioneros en establecer las bases para llevar a cabo el empleo de la dilución isotópica en especiación (mediante el acoplamiento de una técnica de separación cromatográfica al ICP-MS). En el caso de la especiación, el trazador

puede añadirse a las muestras de dos maneras: a) la adición post-columna del isótopo enriquecido del elemento a analizar y b) la adición a la muestra de la misma especie analizar pero isotópicamente marcada en el metal o metales de interés. A continuación se comenta brevemente cada una de las posibilidades.

a) Metodología para llevar a cabo el análisis mediante dilución isotópica post-columna (species-unspecific mode)

En este modo, la adición del trazador se realiza tras la completa separación de las especies a analizar en la columna analítica (método post-columna). En este caso, el trazador está normalmente en una forma química distinta a la tiene en la muestra (de ahí la terminología de dilución isotópica “inespecífica”). Aunque, quizá lo más característico de este modo es que es especialmente útil cuando las correspondientes especies isotópicamente enriquecidas no están disponibles comercialmente o no se pueden sintetizar. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que con esta modalidad cualquier pérdida que se produzca antes de la adición del trazador, como puede ser durante el tratamiento de la muestra o durante la separación cromatográfica no puede ser corregida. Es una alternativa satisfactoria para la cuantificación, teniendo siempre en cuenta que, estrictamente, el análisis cuantitativo lo es del elemento no de la especie química considerada.

Este tipo de estrategia de cuantificación se empleó en la presente Tesis Doctoral en dos estudios distintos relacionados con el análisis de metaloproteínas: 1) la cuantificación del Ti asociado a la transferrina de suero humano y 2) la cuantificación del Cu y Zn asociados a la superóxido dismutasa en eritrocitos. En ambos casos, para llevar a cabo la cuantificación del metal unido a una determinada proteína se emplea el dispositivo instrumental que se muestra en la Figura C.9, particularizado en el caso de introducir post-columna ^{65}Cu .

C. EXPERIMENTAL

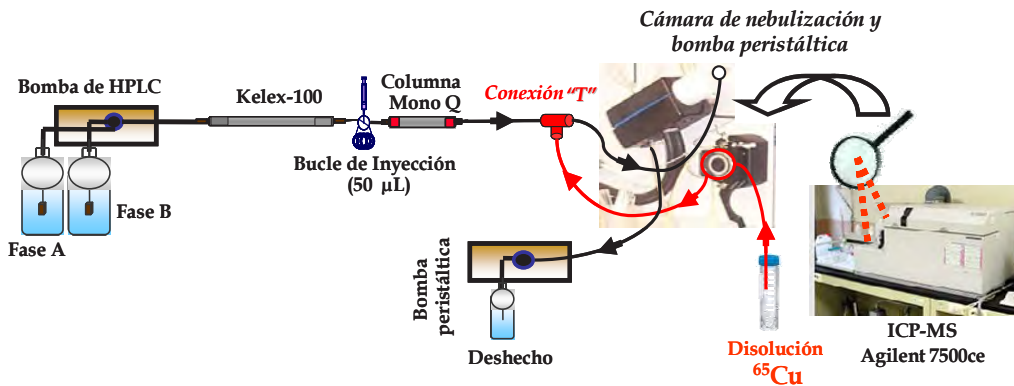


Figura C.9. Montaje instrumental empleado para llevar a cabo la cuantificación de Cu mediante dilución isotópica post-columna

Tanto en el caso de la cuantificación del Ti asociado a la Tf de suero humano como en el de la cuantificación del enzima Cu,Zn-SOD a través de la medida del Cu se empleó la adición de forma continua, a un flujo de 0,2 mL min⁻¹, de disoluciones enriquecidas de ⁴⁷Ti o de ⁶⁵Cu, respectivamente, de diferente concentración. Para ello, se intercaló una pieza de "T" entre la conexión que unía la columna cromatográfica con el ICP-MS, tras la completa separación de la especie en la muestra.

Para la introducción de la disolución de trazador se utilizó la bomba del propio equipo, ya que originaba menos pulsos que las bombas peristálticas externas y ésta bomba se calibró diariamente con el fin de conocer exactamente el flujo de la disolución del trazador añadida (f_{sp}). Para el drenaje de la cámara de nebulización se utilizó una bomba peristáltica externa.

Para llevar a cabo la cuantificación del metal mediante Dilución Isotópica post-columna se utiliza la Ecuación C.6, la cual se detalla a continuación.

$$MF_s = C_{sp} d_{sp} f_{sp} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_s} \right) \quad \text{Ecuación C.6}$$

Esta ecuación, si la comparamos con la ecuación de la dilución isotópica (Ecuación C.5) incluye una nueva variable, \mathbf{Mf}_s que es el flujo másico del elemento, debido a que el aporte del trazador se está realizando en continuo y la relación isotópica en la mezcla \mathbf{R}_m va variando y midiendo con el tiempo. Otros parámetros que no aparecían en la ecuación de la dilución isotópica son: \mathbf{d}_{sp} que es la densidad de la disolución enriquecida isotópicamente expresada en g mL^{-1} y f_{sp} que es el flujo al que se introduce dicha disolución, expresado en mL min^{-1} .

La representación del flujo másico (\mathbf{MF}_s) en función del tiempo dará el denominado cromatograma de flujo másico. Si el flujo másico viene expresado en ng min^{-1} y el tiempo en min , la integración del pico cromatográfico correspondiente a la especie a cuantificar proporcionará la masa del elemento eluida en dicho pico (en ng), por tanto la concentración en la muestra original se calculará conociendo el volumen de la muestra inyectada en el sistema cromatográfico (dependiendo del bucle de inyección utilizado).

Las abundancias y concentraciones del Cu y Zn utilizados como trazadores se muestran en la Tabla C.V y la del Ti se ha mostrado anteriormente en la Tabla C.IV. Es de destacar que en todos los estudios de especiación llevados a cabo durante la presente Tesis se utilizó una columna "scavenger" entre la bomba de HPLC, previa a la columna cromatográfica Mono Q, y la válvula de inyección, con el fin de eliminar la contaminación por iones metálicos presentes en las fases móviles y en el sistema cromatográfico empleado. Esta columna ya había sido utilizada con éxito como columna quelante de metales en trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación [14].

C. EXPERIMENTAL

Tabla C.V. Abundancias isotópicas y concentraciones del Cu y Zn enriquecidos isotópicamente obtenido mediante dilución isotópica inversa

	⁶³ Cu	⁶⁵ Cu			
Cu natural (IUPAC)					
Abundancias Isotópicas (%)	69,15	30,85			
Concentración (µg g ⁻¹)	1000				
Patrón enriquecido de ⁶⁵Cu (Spectrascan)					
Abundancias Isotópicas (%)	0,28	99,71			
Concentración (µg g ⁻¹)	604,38				
	⁶⁴ Zn	⁶⁶ Zn	⁶⁷ Zn	⁶⁸ Zn	⁷⁰ Zn
Zn natural (IUPAC)					
Abundancias Isotópicas (%)	48,26	27,95	4,10	19,02	0,6
Concentración (µg g ⁻¹)	1000				
Patrón enriquecido de ⁶⁸Zn (Spectrascan)					
Abundancias Isotópicas (%)	7,73	4,95	1,16	85,99	0,16
Concentración (µg g ⁻¹)	1009,83				

A modo de ejemplo, en la Figura C.10 se muestra el cromatograma obtenido de la separación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos tras la inyección de la muestra en el montaje instrumental previamente detallado en la Figura C.9. En dicho cromatograma se puede observar el trazador (⁶⁵Cu), en color gris mientras que el ⁶³Cu, procedente fundamentalmente del Cu presente en la muestra aparece en negro. Como se puede observar, la relación isotópica de la mezcla cambia durante la elución del pico cromatográfico, por lo que se necesita seleccionar una concentración de trazador (normalmente similar a la del máximo del pico cromatográfico) que proporcione una relación isotópica que esté en la zona óptima de la curva de magnificación del error. En el caso de

la Cu,Zn-SOD se utilizó una disolución de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de trazador de ^{65}Cu y en el caso del ^{47}Ti se usaron concentraciones de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ dependiendo del contenido total de Ti encontrado en la muestra.

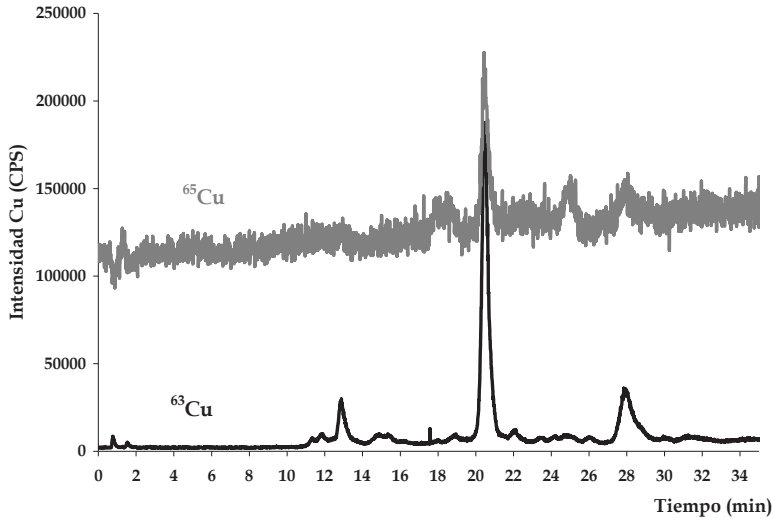


Figura C.10. Cromatograma obtenido de la separación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos mediante dilución isotópica post-columna, utilizando una disolución enriquecida en el isótopo ^{65}Cu como trazador

Para llevar a cabo la cuantificación del Cu o del Ti, respectivamente, en el pico cromatográfico es necesario convertir el cromatograma de intensidades (CPS frente a tiempo) en un cromatograma de flujo másico (ng min^{-1} frente a tiempo en minutos) mediante la aplicación de la ecuación de la dilución isotópica post-columna a cada punto del cromatograma (en cada punto tendremos una R_m que es la única incógnita de la Ecuación C.6). Los pasos a seguir son los siguientes:

- Corrección del tiempo muerto del detector en todos los puntos del cromatograma (previamente calculado).
- Filtrado de los datos del cromatograma (utilizando *moving average* para $n=5$).
- Cálculo de la relación isotópica en cada punto (R_m)
- Corrección de las relaciones por discriminación de masas.

C. EXPERIMENTAL

Una vez realizados estos cálculos, el cromatograma de flujo másico que se obtiene, en este caso para el Cu en el extracto de eritrocitos se muestra en la Figura C.11.

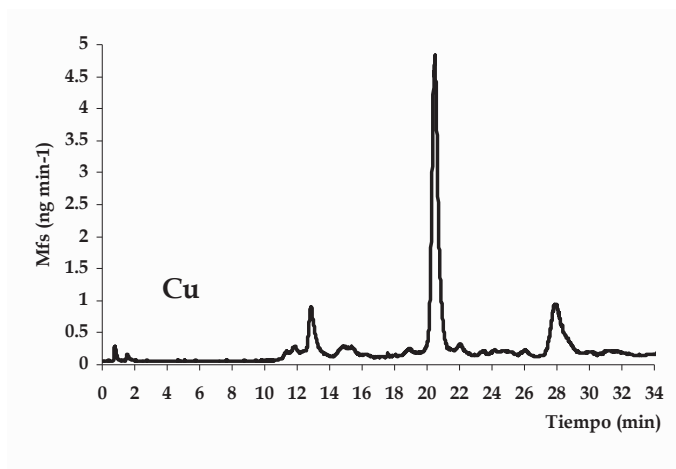


Figura C.11. Cromatograma de flujo másico obtenido de la separación del enzima Cu,Zn-SOD en eritrocitos humanos mediante dilución isotópica post-columna

La cantidad de cobre (en ng) unida al enzima Cu,Zn-SOD (elución a 21 minutos) se obtuvo integrando el pico correspondiente y la concentración de Cu en esa especie se obtuvo dividiendo los ng obtenidos de la integración del pico anterior entre el volumen de muestra inyectado (bucle de inyección de 50 μ L) en el HPLC. Puesto que en el caso de la Cu,Zn-SOD se conoce la estequiometría de 2 moles de Cu por mol de proteína, la concentración de Cu se puede convertir fácilmente en concentración de proteína.

Sin embargo, la dilución isotópica post-columna solo sirve para cuantificar las especies que eluyen de la columna. Por tanto, con el fin de evaluar la recuperación del proceso global del tratamiento de las muestras de sangre para la extracción del enzima Cu,Zn-SOD, se utilizó el método de adiciones estándar. Para ello, a diferentes alícuotas de una muestra de sangre (tras la lisis de los glóbulos rojos), se les añadieron cantidades crecientes del estándar comercial de Cu,Zn-SOD de eritrocitos humanos. A continuación, las muestras se procesaron siguiendo el protocolo que se describió anteriormente

de la presente Tesis y finalmente fueron analizadas mediante HPLC-ICP-(ORS)-MS.

La representación de la concentración obtenida de Cu frente a la esperada dio lugar a una respuesta lineal cuya pendiente resulto de 0,74, es decir la recuperación del enzima desde el principio del tratamiento es del $74 \pm 1\%$. Puesto que la recuperación de la especie a través de la columna cromatográfica resulto ser del 102%, la pérdida del enzima puede deberse a los procesos de tratamiento de muestra como son la precipitación de la hemoglobina y la preconcentración sobre filtros de centrífuga. En cualquier caso este valor fue tenido en cuenta a la hora de cuantificar este enzima.

En el caso del Ti, la estrategia es análoga a la anterior con la salvedad de que el instrumento de medida empleado fue el ICP-MS de alta resolución (HR-ICP-MS Element 2) trabajando en media resolución para evitar las interferencias poliatómicas que afectan al Ti. La recuperación del Ti a través de la columna cromatográfica resultó ser superior al 95%. La información obtenida en este caso representa la concentración del metal que está asociado a la fracción de la transferrina.

b) Metodología para llevar a cabo el análisis mediante dilución isotópica específica (species-specific mode)

En esta modalidad de cuantificación en especiación se requiere el uso de un trazador que contenga la misma especie a determinar pero enriquecida isotópicamente en uno o varios elementos detectables mediante ICP-MS. Por tanto, la composición y estructura de la especie de interés ha de ser perfectamente conocida con objeto de adquirirlas comercialmente o de sintetizarlas en caso de que no estuviesen disponibles en el mercado. Si la especie enriquecida se añade a la muestra al principio del proceso analítico, justo antes de comenzar con el tratamiento de la muestra, una vez homogeneizada la mezcla cualquier pérdida que se produzca no influirá en el resultado final. La ecuación utilizada para obtener la concentración de la

C. EXPERIMENTAL

especie a determinar es la mencionada anteriormente (Ecuación C.5) con la única salvedad de que, en este caso, R_m es la relación de áreas de pico de la especie de interés para los dos isótopos y por tanto el resultado de aplicar la ecuación C.5 es directamente la concentración de la Cu,Zn-SOD en la muestra.

En el caso de la Cu,Zn-SOD, una vez obtenido el enzima isotópicamente enriquecido (^{65}Cu , ^{68}Zn -SOD) de eritrocitos bovinos (ver sección C.4.6), se aplicó la metodología de dilución isotópica específica para la determinación de esta especie en glóbulos rojos de sangre de vaca. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura C.12 donde se puede observar una R_m de 1,14 muy distinta a la R_m del cobre natural ($R_m = 0,45$).

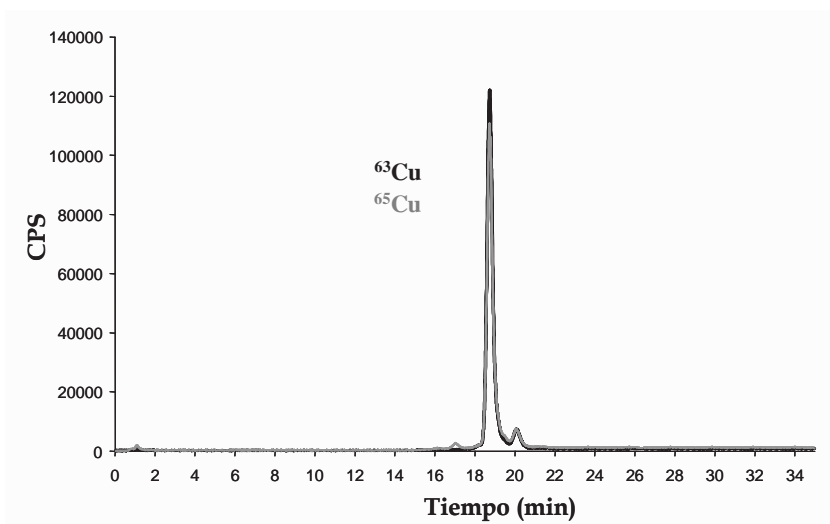


Figura C.12. Cromatograma obtenido mediante HPLC-ORS-ICP-MS de la mezcla de ^{65}Cu , ^{68}Zn -SOD isotópicamente enriquecido con la Cu,Zn-SOD extraída de los glóbulos rojos de sangre de vaca

Esta R_m se obtuvo tras integrar las áreas de cada isótopo (63 y 65) en dicha figura mediante el software *Origin 7.5* y dividir dichas áreas (63/65). El siguiente paso fue llevar a cabo la cuantificación del Cu tras aplicar la ecuación de la dilución isotópica (ecuación C.6). Finalmente, teniendo en cuenta que por cada mol de enzima se tienen 2 moles de Cu se obtuvo la concentración del enzima Cu,Zn-SOD.

Esta misma muestra se analizó mediante el modo post-columna y la concentración de cobre obtenida mediante dicha modalidad fue un 28% menor que la obtenida mediante el modo específico, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que con la primera metodología las pérdidas que pudiesen ocurrir durante el tratamiento de la muestra no son compensadas a diferencia de lo que ocurre con esta metodología.

C.5.5 Tratamiento de datos estadísticos

La integración de los picos cromatográficos de flujo másico obtenidos tras el análisis por dilución isotópica post-columna- ICP-MS, se realizó mediante el programa Origin Pro 7.5 SR0 (Microcal Software Inc. Northampton, MA, EE.UU.). Además, el análisis estadístico de los datos obtenidos en la determinación de los distintos metales liberados por los implantes en las muestras de sangre y orina, tanto de pacientes portadores de implantes como de personas no expuestas (utilizadas como controles), ha sido llevado a cabo a través del programa "Package for Social Sciences" (SPSS, SPSS Inc, Chicago, Ill, USA), versión 12.0 para Windows.

Los espectros de MALDI-TOF se procesaron con el software Voyager Data Analysis de Applied Biosystems. El tratamiento de los datos consistió en aplicar a los espectros de masas la corrección de la línea de base (base line correction), eliminar el ruido de fondo (noise removal) y realizar el smoothing.

C.6. REFERENCIAS

- [1] A. Montaser, J. A. McLean, H. Liu y J.M. Mermet. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. A. Montaser, Willey-VCH. 1 (1998) 1-31.
- [2] A. Sarmiento-González, J. Marchante-Gayón, J. Paz-Jiménez, J.M Tejerina-Lobo y A. Sanz-Medel. *ICP-MS multielemental determination of metals potentially released from dental implants and articular prosthesis in human biological fluids*. Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1001-1009.
- [3] S. Marklund y G. Marklund. *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase*. Eur. J. Biochem. 47 (1974) 469-474.
- [4] Y. Yamazaki y T. Takao. *Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-superoxide dismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry*. Anal. Chem. 80 (2008) 8246-8252.
- [5] C.L. Dietrich, A. Raab, B. Pioselli, J. Thomas-Oates y J. Feldmann. *Chemical preparation of an isotopically enriched superoxide dismutase and its characterization as a standard for species-specific isotope dilution analysis*. Anal. Chem. 79 (2007) 8381-8390.
- [6] F. Vanhaecke, G. Wannemacker, L. Monees, R. Dams, C. Latkoczy, T. Prohaska y G.J. Stingeder. *Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 567-571.
- [7] J. Ruiz Encinar, I. Leal-Granadillo, J.I. García Alonso y A. Sanz-Medel. *Isotope ratio measurements using gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry for the assessment of organolead sources*. J. Anal. At. Spectrom. 16 (2001) 475-480.
- [8] K. Hass, J. Feldmann, R. Wenrich y H.J. Stark. *Species-specific isotope-ratio measurements of volatile tin and antimony compounds using capillary GC-ICP-TOF-MS*. J. Anal. Chem. 370 (2001) 587-596.
- [9] P. Rodríguez-González. J.M. Marchante-Gayón, J.I. Gaarcía-Alonso y A. Sanz-Medel. *Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review*. Spectrochim. Acta Part B. 560 (2005) 151-207.
- [10] K.G. Heumann, S.M. Callus, G. Rädlinger y J. Vogl. *Accurate determination of element species by on-line coupling of chromatography systems with ICP-MS using Isotope dilution technique*. Spectrochim. Acta Part B. 53 (1998) 273-287.
- [11] S.J. Hill, L.J. Pitts y A.S. Fisher. *High performance liquid chromatography isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview*. Tr. AC. 19 (2000) 120-126.
- [12] J.I. Garcia Alonso, J. Ruiz Encinar, C. Sario Muñiz, J.M. Marchante Gayón y A. Sanz-Medel. *Plasma source mass spectrometry: the new millenium*. R.S.C., Cambridge. (2001) 327-346.
- [13] K.G. Heumann. *Isotope dilution ICP-MS for trace element determination and speciation*. Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 318-29.

[14] C.N. Ferrarelo, M. Montes-Bayón, J.I. García-Alonso y A. Sanz-Medel. *Comparison of metal pre-concentration on immobilized Kelex-100 and quadruple inductively coupled plasma mass spectrometric detection with direct double focusing inductively coupled plasma mass spectrometric measurements for ultratrace multi-element determinations in sea-water.* Anal. Chim. Acta. 429 (2001) 227-235.

*D. RESULTADOS Y
DISCUSIÓN*

***D.1 DETERMINACIÓN TOTAL Y ESPECIACIÓN DE
LOS PRINCIPALES METALES LIBERADOS POR LAS
PRÓTESIS DE CADERA METAL SOBRE METAL.***

Artículo científico I: *Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins.* **Journal of Analytical Atomic Spectrometry.** 24 (2009) 1037-1043.

D.1.1 Introducción

Como se ha mencionado en la introducción de la presente Memoria, el envejecimiento de la población y la mejora de las técnicas ortopédicas ha dado lugar a un incremento notable en el número de pacientes portadores de implantes metálicos. Dichos implantes, contienen elementos como cobalto, cromo, titanio etc., dependiendo de la aleación de la que se trate. A pesar del esfuerzo realizado para mejorar la durabilidad, así como la bio-compatibilidad de los materiales empleados para la fabricación de dichos implantes, el desgaste y/o corrosión de los mismos a lo largo del tiempo y la generación de productos metálicos de degradación, parece inevitable. Dada la potencial toxicidad de dichos metales una vez liberados, el control de su concentración en sangre y otros fluidos biológicos en individuos portadores resulta de gran interés actual.

En este sentido, ya son numerosas las publicaciones que han documentado un incremento de los niveles de los principales metales que componen dichos implantes en los fluidos biológicos (sangre, suero y orina) de los pacientes portadores, en comparación con los controles (personas no expuestas) [1-5]. Dichos metales liberados, tanto en forma de partículas metálicas, complejos coloidales organometálicos, iones metálicos (unidos o no a proteínas), así como sales y óxidos metálicos inorgánicos [6-8] pueden ser movilizados por diferentes mecanismos. Una vez en el torrente circulatorio pueden ser transportados y distribuidos por el cuerpo humano hacia los distintos órganos y tejidos en los cuales se podrían depositar, dando lugar a reacciones adversas. De hecho, es conocido que dichos residuos metálicos pueden generar problemas de hipersensibilidad [9], citotoxicidad [10], genotoxicidad [11] e incluso cáncer [12-14].

Entre dichos efectos perjudiciales, los que afectan al sistema inmunológico quizás sean los más estudiados (p.ej. la hipersensibilidad a metales). Las enfermedades inmunológicas son aquellas en las que las reacciones inmunitarias juegan un papel determinante. La reacción inmunitaria está

diseñada para proteger al organismo de sustancias extrañas, p.ej. de concentraciones de metales anormalmente elevadas. Los mecanismos inmunopatológicos a través de los cuales se supone que se producen las enfermedades inmunológicas, corresponden a las reacciones inmunológicas normales, las cuales se hacen dañinas para el organismo; ya sea porque son excesivas (lo que se llama hipersensibilidad), bien porque se dirigen hacia sí mismo (lo que se llama autoinmunidad) ó porque persisten más allá de lo necesario.

Dentro de los distintos tipos de hipersensibilidades (existen cinco grupos diferentes), la denominada tipo IV o hipersensibilidad “retardada” es la que se relaciona con la exposición a metales [15]. En este tipo de hipersensibilidad, los linfocitos T son sensibilizados por el antígeno (el metal o metales), produciendo linfocitos específicos del mismo (también llamados células de memoria), como se ha comentado en la Introducción de la presente memoria. Estas células poseen larga vida y por tanto, pueden ser detectadas antes de que den lugar a patologías clínicas [16]. Cuando el individuo vuelve a estar en contacto con el metal o metales, se produce una reacción de respuesta en forma de proliferación celular, la cual puede ser cuantificada. Por tanto, la medida de dicha proliferación, en individuos que posean implantes metálicos, dará idea de la posible hipersensibilización a los metales (alergia a metales), que la pudiesen haber generado, incluso pudiendo llegar a producirse un rechazo a los implantes a largo plazo [17,18].

Además, existen diversos estudios que han intentado correlacionar la concentración de elementos traza en fluidos biológicos con el aflojamiento e incluso el fallo de los implantes [3,19]. Sin embargo, todavía no se ha encontrado una relación directa entre ambos fenómenos. Este hecho puede ser debido a la diferencia en los valores de concentración obtenidos, para los distintos elementos metálicos, en los diferentes estudios publicados hasta la fecha, lo cual se ha puesto de manifiesto en la Introducción de la presente Tesis Doctoral. Por ello, sigue existiendo un gran interés en el desarrollo de nuevas

estrategias analíticas que permitan la cuantificación precisa y exacta de dichos metales en los distintos fluidos biológicos. La problemática de este tipo de análisis es compleja, debido por un lado, a la complejidad de la matriz de dichos fluidos biológicos y por otra a la baja concentración de los elementos metálicos a determinar. Los últimos resultados ponen de manifiesto que, hoy en día, la técnica que ofrece las mejores prestaciones para abordar este tipo de problemática es el ICP-MS de doble enfoque [20].

Por otro lado, una vez que estos metales se liberan de los implantes, serán transportados a través del organismo (probablemente asociados a biomoléculas) y por tanto, será necesario conocer las distintas especies metálicas en las que se encuentra distribuido cada uno de dichos metales, puesto que este tipo de asociación condicionará su biodisponibilidad. Es por tanto aconsejable, además de llevar a cabo la determinación total del contenido de estos elementos, llevar a cabo *análisis de especiación elemental* de los mismos. Con este propósito, la mejor estrategia será recurrir a metodologías integradas de espectrometría de masas elemental (o inorgánica) y molecular. Con el objetivo de que nos proporcionen; por un lado información cualitativa y cuantitativa de la presencia del metal en estudio en una determinada biomolécula(s); y por otro la naturaleza y estructura de dicha biomolécula(s). La especiación elemental inorgánica emplea fundamentalmente las “técnicas híbridas” o acopladas, que consisten en el acoplamiento de una técnica de separación poderosa, capaz de separar las distintas especies en estudio, con un detector sensible y “específico” del metal. Y entre todas ellas parece ser que la técnica que está dando mejores resultados es el acoplamiento entre el HPLC y el ICP-MS [21]. En cuanto a la identificación de las especies, la fuente MALDI acoplada a un TOF proporciona buenas características tanto para la determinación del peso molecular de una proteína, como de su identificación a través de la caracterización de sus péptidos (mapeo peptídico) como se documentó en la parte Experimental de la presente Tesis.

D.1.2 Objetivo general y objetivos parciales

A la vista de lo anteriormente expuesto el objetivo general del presente capítulo fue: la *evaluación del potencial analítico de la técnica de ICP-MS para la determinación total y la especiación de los principales metales liberados por las prótesis de cadera Metal/Metal*.

Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de la metodología desarrollada previamente en nuestro grupo de investigación [20] para la cuantificación de los principales elementos metálicos liberados por las prótesis M/M de nueva generación (Cr, Co, Mo, Mn y Ti) en sangre y orina, mediante ICP-MS de alta resolución (HR-ICP-MS). Dicha cuantificación se llevará a cabo mediante calibración externa. Se requiere la utilización de este equipo debido a sus ventajas respecto al resto de equipos de ICP-MS, en cuanto a la eliminación de interferencias poliatómicas espectrales que afectan a dichos metales (Tabla C.I de la presente Memoria).
- Validación de dicha metodología mediante el análisis de dos materiales de referencia: Seronorm™ Trace Element Whole Blood (Ref. 9067) y Seronorm™ Trace Element Urine (Ref. 201205). En dichos materiales de referencia los metales están presentes en niveles de concentración similares a los publicados en la bibliografía para pacientes sin implantes (controles).
- Aplicación de la metodología optimizada a muestras de sangre y orina tanto de pacientes portadores de prótesis M/M como de personas sin prótesis, utilizados como controles. Debe mencionarse que todos los pacientes evaluados poseían las prótesis en perfecto estado, y que ninguna de ellas presentaba síntomas de aflojamiento.
- Desarrollo de una metodología para la separación y detección *in vivo* de las proteínas séricas transportadoras de los metales liberados por

dichas prótesis M/M (Cr, Co y Mn). La separación de las mismas se llevará a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la detección del metal asociado a ellas una vez realizada la separación, se efectuará mediante el uso del ICP-MS provisto de celda de colisión, con el fin de eliminar las interferencias espectrales que afectan a dichos metales.

- Confirmación de la identidad estructural de las proteínas séricas que enlacen a dichos metales de interés (Cr, Co y Mn), mediante el empleo de técnicas moleculares (MALDI-TOF-MS).
- Estudio de la posible hipersensibilidad a metales (hipersensibilidad de tipo IV), desarrollada por parte de los individuos. Este estudio se realizará en aquellos pacientes en los que se hayan observado niveles elevados de los principales metales liberados por los implantes dentales. Dichos análisis se llevarán a cabo mediante el empleo del test MELISA (en el instituto SABATER, Barcelona).

D.1.3 Optimización de la celda de colisión/reacción: tipo y flujo de gas

El ICP-MS utilizado para la determinación del Cr, Co y Mn asociado a diferentes proteínas séricas fue el ICP-MS de tipo cuadrupolo, Thermo Fisher X Series II, el cual como se mencionó previamente está provisto de una celda de colisión/reacción que puede ser presurizada con diferentes gases, con el fin de minimizar las interferencias poliatómicas. Para la eliminación de estas interferencias espectrales se procedió a la optimización de la celda; optimización tanto del gas utilizado para presurizar la celda, como el flujo del mismo.

Con el fin de simular las mismas condiciones cromatográficas que en el análisis real, se preparó un suero sintético humano, que fue utilizado como matriz, cuyo contenido y concentraciones fueron: NaCl (3700 mg L⁻¹ de Ca, 2400 mg L⁻¹ Na), NaNO₃ (880 mg L⁻¹ Na), CaCl₂ (97mg L⁻¹ Ca), Cisteína HCl H₂O (1200 mg L⁻¹ S) y HNO₃ Suprapur (0,14 M). Y a continuación se preparó un estándar de Cr, Co, Mn y Ti en dicha matriz, obteniendo una concentración final de 1 ppb.

Finalmente, se inyectaron en el ICP-DRC-MS seleccionando como gases He e H₂ y variando los flujos desde 0 a 5 mL min⁻¹ hasta obtener las condiciones de gas de celda y flujo en los que se obtiene el menor límite de detección estimado (LDE). Para intensidades por debajo de 10⁴ cuentas s⁻¹ la desviación de estándar del blanco se puede aproximar a la estadística de conteo, por tanto el LDE se puede expresar como:

$$\text{LDE} = \frac{3\sqrt{B}}{S}$$

Donde **LDE** es el límite de detección estimado en ng g⁻¹, **B** es la señal del blanco en cuentas s⁻¹ y **S** es la sensibilidad neta en cuentas por segundo (cps).

Aunque el estudio se realizó para todos los elementos y con ambos gases, los mejores resultados se obtuvieron utilizando como gas de colisión He.

A modo de ejemplo, en la Figura D.1.1 se muestra la optimización de la celda con He para el Cr (el Co y Mn presentaron un comportamiento similar). En dicha gráfica se representó la influencia de este gas sobre la intensidad del isótopo *m/z* 52 del cromo, más abundante y más interferido por la contribución de la interferencia poliatómica ⁴⁰Ar¹²C (traza negra), la influencia del gas sobre el fondo espectral (traza gris) y el límite de detección estimado (LDE) para este isótopo (traza roja).

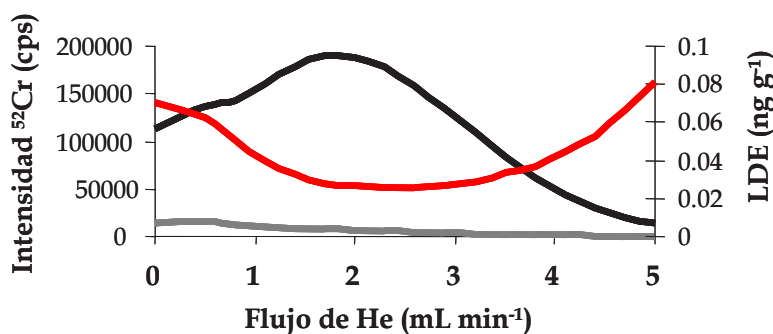


Figura D.1.1 Curvas resultantes de la optimización del flujo de He en la celda para el isótopo ⁵²Cr ([Cr] = 1 μg L⁻¹). Trazo negro (analito), traza gris (fondo) y traza roja (LDE)

D.1 CAPÍTULO I

Una vez analizada la gráfica se optó por presurizar la celda con 2 mL min^{-1} de He para todos los análisis posteriores de especiación, ya que daba lugar al menor LDE. Resultados análogos se encontraron en el caso del Co y Mn.

Así mismo se optimizaron los voltajes de las lentes "cell exit", "hexapole bias" y "QP bias", los cuales deben modificarse al operar con la celda de colisión/reacción presurizada con gas. Cuando la celda de colisión/reacción está presurizada con gas como el He el potencial del "hexapole bias" y "QP" bias se deben fijar a unos valores en torno a -18 V y -12 V respectivamente (y no en torno a -6 V o -3 V respectivamente cuando la celda no está presurizada con gas), con el fin de lograr un incremento de la señal analítica y una disminución del fondo espectral.

Los resultados y discusión derivados de este primer capítulo se muestran en el artículo científico I recogido en la sección D.1.4.

D.1.4 Artículo científico I: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*.
24 (2009) 1037-1043

Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins†

Yoana Nuevo Ordóñez,^a Maria Montes-Bayón,^a Elisa Blanco-González,^a José Paz-Jiménez,^b Jose Maria Tejerina-Lobo,^c Jose Miguel Peña-López^c and Alfredo Sanz-Medel^{*a}

Received 13th November 2008, Accepted 11th June 2009

First published as an Advance Article on the web 23rd June 2009

DOI: 10.1039/b820339c

A study on the level of metals released to body fluids from patients carrying metal-on-metal (based on Co–Cr alloys) total hip prosthesis and titanium alloys dental implants has been conducted. In the first part, total elemental determination of Co, Cr, Ti, Mo and Mn was done in whole blood and urine for both, control individuals and hip arthroplasty patients. Additionally, the work was extended to patients who carried dental implants. The samples, either acid digested (blood) or just diluted (urine) were analyzed using a double focusing inductively coupled plasma mass spectrometer (DF-ICP-MS). Both strategies are validated using the corresponding certified reference materials. The findings revealed an increased concentration of Cr and Ti and, to a lower extent, Co and Mn in the blood and urine of the patients. The second part of the work tries to explore the possible association of the released metals to human serum proteins. For this purpose, speciation of the above mentioned metals is accomplished using liquid chromatography (anion exchange) with ICP-MS detection. Such studies, firstly conducted in incubated standards and then in fresh serum from the patients, showed the elution of Mn associated to transferrin. Co eluted associated to albumin and Cr could not be detected. Spiking experiments showed that Cr(III) is clearly associated to transferrin and supports the theory that Cr is eliminated from the prosthesis as Cr(VI) that shows no interaction with the studied serum proteins.

Introduction

Total hip replacement surgery has increased enormously during the last decades and can be considered, nowadays, as a routine operation conducted in 0.16–0.2% of the population.¹ In total hip arthroplasty, the natural hip joint is replaced by an artificial one consisting of a femoral component (usually a polished metal ball mounted on a metal stem) and an acetabular component with a socket in which the metallic ball sits and swivels as the patient walks.² In the interest of implant longevity, several factors have to be considered in order to minimize the production of wear debris by the bearing surfaces, particularly the design and manufacture of the hip replacements and the materials employed. The metal-on-metal (M/M) total hip replacements, where the femoral and acetabular components are made of cobalt–chromium alloys, were widely used during the 60's. However, such materials were replaced in the 70's by the metal-on-polyethylene bearings, in which a metal femoral ball articulates on a polyethylene socket, due to observed high loosening rates and concerns about biological reactions of the metallic components of the M/M prosthesis.³ Curiously enough then, M/M

replacements were re-introduced by the late 80's once the polyethylene wear debris was suspicious of initiating undesirable biological reactions, such as osteolysis, that might lead to final failure of the implant.⁴ These second-generation metal-on-metal hip arthroplasties have been now in clinical use for more than a decade. However, initial concerns about the metal release from these prostheses are still a major drawback of their use. In this regard, several studies are available in the literature today about the levels of metals released from the M/M hip replacements in body fluids such as blood,⁵ serum⁶ or urine.⁷

Such studies have shown a wide range of metal levels from patient to patient. In general terms, Co and Cr levels in body fluids were found at increased levels in patients carrying M/M bearing (as compared to control individuals and patients with metal-on-polyethylene prosthesis).³ Indeed, those levels changed dramatically with the time elapsed from the surgery and the activity of the individual;⁸ but even four years after the arthroplasty, the patients have shown to contain whole blood concentrations of Cr and Co markedly above the immediate post-operative levels.⁵ Because it is not possible to measure radiographically wear in contemporary M/M hip systems, surrogate markers of bearing surface performance have been sought. In this regard, blood and/or urine concentrations of Co and Cr have been proposed as potential indicators of implant performance including bearing surface wear.

Once the metals get released from the prostheses, their transport, absorption, excretion and deposition in tissues is going to be strongly dependent on the type of biological binders to which they are associated.⁹ The association of the released metals to proteins, for instance, might increase the corrosion rate at the

^aDepartment of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, C/Julían Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: asm@uniovi.es; Fax: +34 985103474; Tel: +34 985103474

^bDepartment of Surgery, Faculty of Medicine, University of Oviedo, C/Julían Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain

^cDepartment of Stomatology, School of Stomatology, University of Oviedo, C/José Serrano, 33006 Oviedo, Spain

† This article is dedicated to Professor Jean-Michel Mermet, in recognition of his contributions to the field of atomic spectrometry.

implant/biology interface by increasing the dissolution of the surface passive (oxide) film formed on metallic materials especially of Cr and Co.¹ However, this topic has been very seldom tackled in the existing literature about M/M hip replacements¹⁰ and should be considered in more detail for a better understanding of the long-term toxic effects related to metal ions released by M/M arthroplasties. Some initial studies¹¹ revealed that the main components of the M/M alloys, Cr and Co, exhibit similar affinity for serum proteins, while such affinity is slightly different in the case of Ni. These interactions can be studied in detail by using hyphenated strategies that combine a powerful separation technique of the sought species (chromatographic-based) with sensitive and selective detectors of the metals (such as inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS).¹² ICP-MS offers excellent analytical performance characteristics for trace element determinations (total concentration)^{13,14} and also for speciation problems. In particular, different publications have demonstrated the almost ideal features of this type of detection for monitoring trace elements associated to human serum proteins.^{12,15}

Thus, in this work, we have used ICP-MS to illustrate, first, the total elemental concentration of the metals released by the prosthesis into the blood and urine of the patients with hip replacement (as compared to control individuals). Then, those elements of relative elevated concentration levels in the blood samples are studied by typical speciation strategies (HPLC-ICP-MS) in order to have a glimpse of their biological ligands.

Experimental

Instrumentation

For the total elemental determinations, a double focusing ICP-MS (DF-ICP-MS) instrument, ELEMENT II from Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany), was used. In the case of the speciation studies, the instrument used was a hexapole reaction system ICP-MS (ORS-ICP-MS) Thermo Fisher X SERIES^{II}. This hexapole is enclosed in a cell that can be pressurized with different gases (*e.g.*, H₂, He) in order to overcome polyatomic interferences. When the cell is not gas-pressurized, the hexapole works only as an ion guide lens. Both instruments were equipped with a Meinhard concentric glass nebuliser and with nickel sampler and skimmer cones. Details of the operation instrumental conditions and measurement parameters are given in Table 1.

A Milestone Ethos 1 microwave oven (Bergamo, Italy) equipped with a rotor for six PTFE vessels was used for digestion of human blood samples.

The high performance liquid chromatographic (HPLC) system used consisted of a dual piston HPLC pump (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) equipped with a sampler injection valve, Rheodyne, Model 7125 (Cotati, CA, USA) fitted with a 100 µL loop. Separations of human serum proteins were performed on an anion-exchange column Mono QTM 5/50 GL (Pharmacia, GE Healthcare, Spain). Chromatograms were obtained using a diode array detector (model 1100, Agilent Technologies, Waldbron, Germany). A scavenger column (25 × 0.5 mm id) packed with Kelex-100 impregnated silica C₁₈ material (20 µm particle size) was placed between the

Table 1 DF-ICP-MS, ORS-ICP-MS and MALDI-TOF operating conditions

DF-ICP-MS	
Instrument	Thermo Fischer ELEMENT II
Rf power	1275 W
Sample uptake flow rate	0.1 mL min ⁻¹
Plasma gas flow rate	15.99 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.80 L min ⁻¹
Nebuliser gas flow rate	0.96 L min ⁻¹
Resolution	3000
<i>m/z</i> monitored	⁴⁷ Ti, ⁴⁹ Ti, ⁵² Cr, ⁵³ Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co, ⁹⁵ Mo, ⁹⁸ Mo
Acquisition mode	Scan
Mass window	125%
Sample per peak	10
Time per sample	0.009 s
Search window	150%
Integration window	200%
Number of scans	3
ORS-ICP-MS	
Instrument	Thermo Fisher X SERIES ^{II}
Rf power	1300 W
Plasma gas flow rate	13.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.70 L min ⁻¹
Nebuliser gas flow rate	0.92 L min ⁻¹
<i>m/z</i> monitored	⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co
Collision cell parameters	
Hexapole bias	-9 V
QP bias	-7 V
Collision He gas flow	2 mL min ⁻¹
MALDI-TOF	
Instrument	Voyager-DETM STR Biospectrometry TM
Scan type	Positive
Instrument mode	Linear
External calibration	10 µM of bovine serum albumin
Matrix	Sinapinic Acid
Laser	2800 V
Spectrum acquisition	
Shoots	150
Scan range	500-4000
Acceleration voltage	25 000 V

pump and the injection valve to remove the metals of the HPLC buffers.

Reagents and materials

All calibration standard solutions were prepared from 1000 µg mL⁻¹ single element standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany) by dilution with Milli-Q water. Analytical reagent grade nitric acid 65% (w/v), additionally cleaned by sub-boiling distillation and hydrogen peroxide Suprapur 30% (w/v) (both from Merck), was used for the microwave digestion of the human whole blood samples. Two different reference materials were used in this study: Seronorm Trace Elements Whole Blood (Level 1, Ref 9067) and Seronorm Trace Elements Urine (Level 1, Ref. 201205), both from Seronorm (Nycomed AS, Oslo, Norway). These reference materials were kept in the refrigerator at 4 °C until analysis and were reconstituted following the procedures given by the manufacturer. Ultrapure deionized water

(≥ 18 M Ω) was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All plastic containers were soaked in 10% (v/v) sub-boiling HNO₃ at least for 24 h and then rinsed copiously with Milli-Q water prior to use. All kinds of glassware were avoided to prevent metal contamination.

Blood and urine collection

The study group was made up of 15 patients (age 57.3 ± 17.2 yr, range 30–87), consisting of nine males (age 50.6 ± 17.9 yr, range 37–76) and six females (66.3 ± 20.3 yr, range 30–86) all of them with cementless M/M BiHapro total hip prosthesis (BiHapro-Biomet, Warsaw, Indiana, USA). The control group contained 10 subjects consisting of five females (age range 51–90) and five males (age range 50–85). Additionally, three patients carrying titanium-based dental implants that had undergone implant failure and showed metal hypersensitivity¹⁶ were also analyzed for total metal content in blood.

For this purpose, five millilitres heparinized vacutainer tubes (Greiner bio-one, Madrid, Spain) for trace elements were used for blood collection. To keep metal contamination under control, 10 mL of blood were drawn from each subject using a plastic cannula in 2 tubes. The first 5 mL were discarded. To obtain the serum, the blood was centrifuged at 1500 rpm after coagulation and the serum was introduced into a 1 mL vial (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) decontaminated by the same procedure used for all plastic containers.

Morning urine samples were collected in polypropylene bottles (Soria Genlab, Madrid, Spain) that had been decontaminated using the procedure described above. To avoid the risk of metal adsorption on the surface of the plastic container, 1% (v/v) of sub-boiled nitric acid was added to the samples immediately after collection.

Samples of blood and urine were collected from all 15 patients with implants and from the 10 control subjects. All biological samples were stored at -20 °C until analysis.

Sample preparation and analysis

Urine samples were prepared by dilution 1 : 10 with ultrapure water. For whole blood analysis, aliquots of 1 mL were placed into the digestion Teflon vessels and mixed with 6 mL of sub-boiling nitric acid diluted (1 : 3) with Milli-Q water and 1 mL of high-purity hydrogen peroxide. After digestion and cooling, the samples were transferred into pre-cleaned polyethylene bottles and finally diluted 1 : 20 with Milli-Q water.

For speciation studies, the mobile phases contained: (A) 0.05 mol L⁻¹ TRIS-acetic acid buffer (pH 7.4) and (B) A + 1.5 mol L⁻¹ ammonium acetate and the separation of serum proteins was achieved using an ammonium acetate gradient of up to 50% B in 30 minutes at a flow of 1 mL min⁻¹. The injected volume was 100 μ L. The eluate from the column was passed through a UV detector, set at 280 nm, for protein monitoring and to an ORS-ICP-MS detector for metal detection using the operating conditions given in Table 1. The serum samples were diluted 1 : 1 (v/v) with buffer A and then they were filtered (0.22 μ m) before analysis. The spiked serum samples and standards were prepared incubating them with 60 ng mL⁻¹ of Mn(II) (from Mn(NO₃)₂),

Cr(III) (from CrCl₃·6H₂O), Cr(VI) (from Na₂CrO₄) and Co(II) (from Co(NO₃)₂), respectively. Then, those spiked samples were diluted 1 : 1 (v/v) with buffer A and filtered (0.22 μ m) before analysis.

Results and discussion

Determination of trace elements in blood and urine samples

The first aim of the work was the optimization and validation of an analytical strategy to allow the determination of the elements of interest (mainly Co and Cr but also Mo, Mn and Ti) in blood and urine samples of patients with M/M hip prosthesis. Thus, by following similar studies conducted in our research group,¹³ the blood samples were previously digested in a microwave oven and the urine samples were just diluted 1 : 10 with Milli-Q. In order to avoid polyatomic interferences, the samples were analyzed by DF-ICP-MS which can also provide adequate detection limits.¹³

By using the instrumental conditions detailed in Table 1, it was possible to achieve limits of detection ranging from 1 to 5 ng L⁻¹ (using the IUPAC criterion and 2% sub-boiling nitric acid as blank solution) for all the elements of interest with precisions in terms of %RSD of about 2–4%. Such features allowed the validation of our methods for the desired elements in a reference material of urine (Seronorm™ Level 1). The obtained results for such validation are summarized in the first column of Table 2. Of all the elements analyzed, only Ti and Mo are slightly out of the mean value (unfortunately, the standard deviations of the mean values in the reference material are not provided). The values obtained for the rest of the elements fit very well with the reference values. In the case of blood samples, it was possible to obtain a method detection limit ranging from 1 to 200 ng L⁻¹ (in this case, the used blank solution contained sub-boiling HNO₃ and H₂O₂). Similarly to the urine samples, our method was validated by analyzing a blood reference material containing the sought elements at the concentration levels expected in our control blood samples. The second column of Table 2 shows the obtained results for the reference material. In this case, all the elements (including Ti and Mo) show concentrations that are in good agreement with those provided with the reference material.

Once both sample types developed methodologies were validated, the analysis of the blood and urine of the patients with M/M hip prostheses was conducted. The obtained results for urine samples can be observed in Fig. 1 plotted as box diagrams independently for Cr, Co, Mo, Mn and Ti. On each diagram, the concentrations found in control individuals and in patients with M/M bearings (male and female, independently) are plotted in the form of rectangles whose upper and lower sides are given by the upper and lower quartile of the data distribution, respectively. The rectangles are divided into two parts by the value of the median, thus 50% of the data are above the median and 50% are below. The error bars at the edges of the rectangle represent the highest and lowest concentration encountered that are significant (this means values within 1.5 times the total length of the rectangle). The values considered as “abnormal” (within 1.5 to 3 times the total length of the rectangle) are represented with a small circle.

The box diagrams on Fig. 1 provide a visual idea of the concentration ranges in urine samples for Cr, Co, Mn, Mo and Ti

Table 2 Results obtained in the analysis of the two certified reference materials (Seronom Trace Elements Urine, Level 1, Ref. 201205 and Seronom Trace Elements Whole Blood, Level 1, Ref 9067) with the proposed methodologies

Element	Certified value urine/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Found value urine/ $\mu\text{g L}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 3$)	Certified value blood/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Found value blood/ $\mu\text{g L}^{-1}$ (mean \pm SD, $n = 3$)
Cr	0.56	0.56 ± 0.02	0.6	0.63 ± 0.03
Co	0.28	0.28 ± 0.01	0.15	0.16 ± 0.02
Mo	61.4	58.6 ± 0.3	0.5	0.4 ± 0.1
Mn	1.1	1.1 ± 0.01	10.6	10.6 ± 0.1
Ti	4.6	3.5 ± 0.2	2.3	2.1 ± 0.3

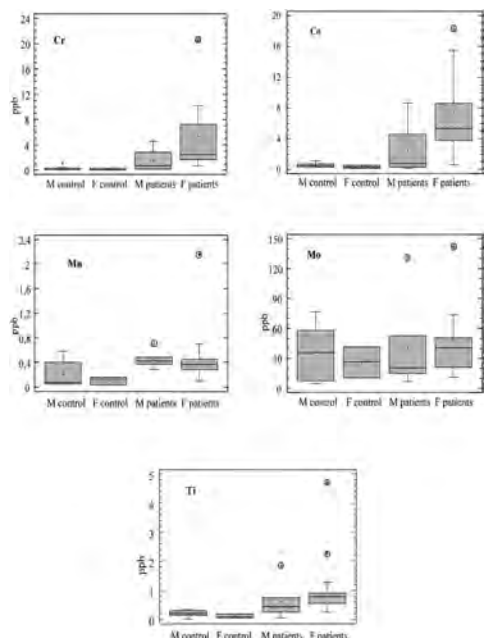


Fig. 1 Box plots showing the observed distribution of Cr, Co, Mn, Mo and Ti in the analyzed urine samples of both male (M) and female (F) control and patient groups.

in both, control individuals and patients carrying M/M total hip replacements. As can be observed for Cr, although the dispersion of the data is quite high in the case of male patients, there is an important difference respect to the control individuals (there is not overlap between the two boxes) that occurs in the case of females as well. The control individuals showed concentrations (both male and female) below 0.3 ng mL^{-1} . Similar results can be observed also in the case of Co. For Mn and Mo, the boxes on Fig. 1 overlap almost completely showing that there are not significant differences in the concentration of these metals in control individuals and patients. Finally, in the case of Ti, there are some small differences in concentration between control and patients, especially in the case of female samples.

The analysis of these elements in circulating blood was also studied for the monitoring of possible losses of metals from the prosthesis. In this regard, Fig. 2 shows the results obtained for all the analyzed samples. In this case, it is also remarkable the low dispersion of the results obtained for Cr (mean about 0.4 ng mL^{-1}) and Co (mean about 0.8 ng mL^{-1}) in the control samples,

also similar to those reported by previous studies.¹⁷ Only in the case of Cr and Ti, (see Fig. 2) the patients have shown concentration values statistically significant with respect to those observed for the control individuals. As can be seen, these differences are especially important in the case of Ti in both, male and female patients. This is important since the prosthesis are composed of a cobalt–chromium alloy acetabular component and also a cobalt–chromium femoral head but mounted on a metal stem (placed inside the femur) made of titanium. Therefore, the liberation of metals could be primarily due to corrosion of the prosthesis by the biological fluids rather by direct friction of the fitting parts.

Total metal determination in implanted patients and hypersensitivity assays.

The determination of the metals released by titanium-based dental implants was also accomplished in a limited number of

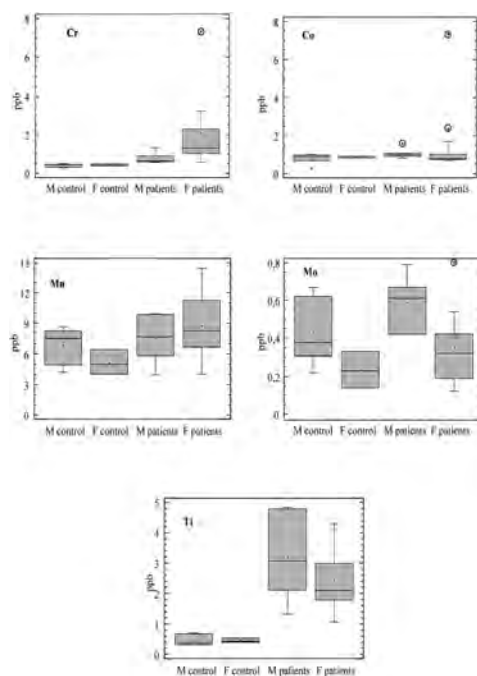


Fig. 2 Box plots showing the distribution of Cr, Co, Mn, Mo and Ti in the analyzed blood samples of both male (M) and female (F) control and patient groups.

blood samples from patients who showed rejection to the implants. Although reported success rates for dental implants are high, failures that require immediate implant removal do occur. Therefore, we studied the monitoring of implant components into blood to help on the diagnosis of the failure. Additionally, these patients were evaluated for metal sensitivity through the MELISA® assay. This is a type of lymphocyte proliferation assay used as a diagnostic tool in the evaluation of metal exposure in humans. Metal-induced allergy in humans is caused by the contact of the metal with the surface of memory lymphocytes. Upon re-exposure to the same metal (*in vivo*), the lymphocytes show an increased proliferation that reveals hypersensitivity to that metal.¹⁶ The measurement of such proliferation gives an indication about previous exposure to the metal even when it is not detectable at present.

The results obtained for the three patients analyzed are given in Fig. 3. As can be observed, all the patients carrying titanium alloy dental implants showed higher levels of this metal in the blood. However, only one of them gave positive results on the hypersensitivity test for this metal. The level of Cr, Co, Mn and Mo were similar or even lower than these obtained for the control individuals. Therefore, Ti biocompatibility should be revised since a number of cosmetics, together with prosthesis and dental implants carry this metal which is, in principle, completely inert.

Speciation of the released metals in serum samples of patients with M/M hip prosthesis

In general, cobalt–chromium alloys are reasonably inert in the body, especially over short time intervals. As shown previously, however, despite the *in vitro* evidence of good resistance to corrosion, Co and Cr can be released from M/M prosthesis and this release can cause health concerns. It is known that Cr(vi) is a potential carcinogenic in humans and there are studies proving that an increase in tumour incidence has been detected when Cr(vi) is present in the body.¹⁸ Similarly, on the bases of its mutagenicity, Co can be also considered a potential carcinogen

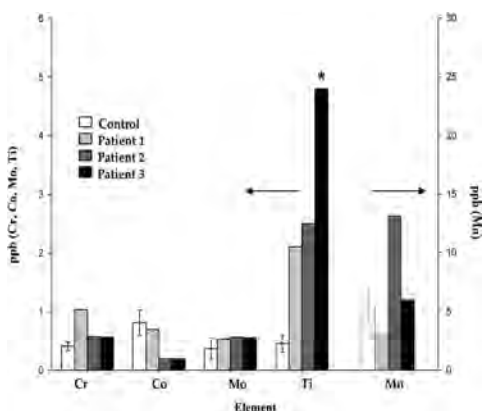


Fig. 3 Concentration of Cr, Co, Mo, Ti and Mn in the analyzed blood samples of three patients with titanium-based dental implants. The asterisk indicates positive results on the hypersensitivity test for Ti.

to humans. *In vitro* studies have also demonstrated that the presence of these two metals did reduce cell viability in osteogenic bone marrow cells.¹⁹ However, very little is known about the transport of these metals in the body once they are released from the prosthesis. In order to evaluate metal transport in the body by possible association of Co, Cr and Mn to human serum proteins in the blood samples, initial speciation studies were accomplished for samples with the highest detected concentrations of these metals. It is noteworthy that all the HPLC-ORS-ICP-MS chromatograms were obtained by using a scavenger column between the pump and the injection valve to avoid metal contamination²⁰ and all the chromatograms presented are blank (gradient) subtracted.

Fig. 4 shows the separation of the most abundant human proteins (immunoglobulin G (IgG), transferrin (Tf), albumin (Alb) and ceruloplasmin (Cer)) in a control human serum sample by anion-exchange HPLC with UV detection (280 nm) (Fig. 4A) and with ICP-MS detection (Fig. 4B) monitoring Fe, Cu and Zn. The proteins have been identified by matching their retention times with the corresponding standards and the presence of the essential metals in a given fraction is an additional proof (*e.g.*, Fe in transferrin or Cu in ceruloplasmin). The samples from the patients were analyzed using the same chromatographic

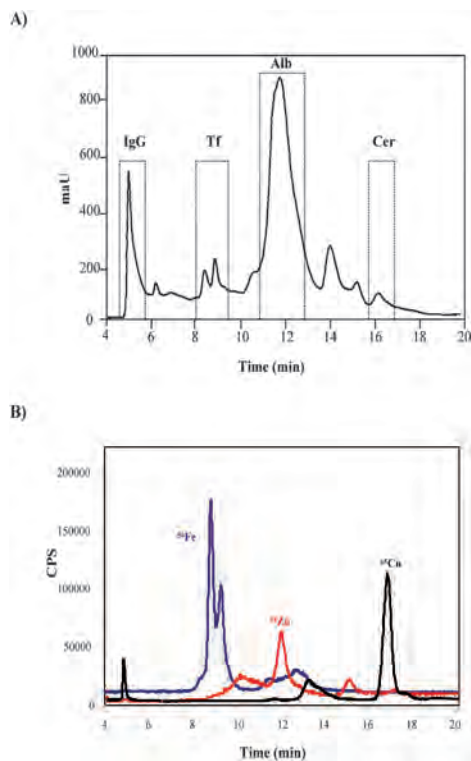


Fig. 4 Chromatographic profile of a serum sample from a control individual. (A) UV detection (280 nm), immunoglobulin G (IgG), transferrin (Tf), albumin (Alb), and ceruloplasmin (Cer); (B) ICP-MS detection monitoring Fe, Cu and Zn. Chromatographic conditions detailed in the text.

conditions. Thus, Fig. 5A shows the results for the HPLC-ORS-ICP-MS elution profile of ^{55}Mn from a serum sample corresponding to a patient with a concentration of Mn in whole blood of 8.3 ng mL^{-1} , as compared with that of a control individual containing 5.3 ng mL^{-1} . It is possible to observe that Mn shows several peaks: (i) a first fraction present at the void volume (probably as unretained Mn^{2+}); (ii) a second fraction at 9 minutes (coeluting with the Tf peak as shown in Fig. 4A); and (iii) a third fraction at 11 minutes that can be observed in all the chromatograms and that could be ascribed to anionic species of Mn with, for instance, citrate (LD about 1 ng mL^{-1}). Similar results have been documented by other authors²¹ and were confirmed here by spiking the control serum with 30 ng mL^{-1} of Mn(II) as Mn-citrate. As can be observed in the spiked serum sample of Fig. 5A, there is a clear preference of Mn(II) for transferrin and the column recoveries were above 90% in all cases. In order to verify this finding, the same solution of Mn-citrate was incubated with a standard of human serum transferrin and the results showed a single peak at about 11 minutes which did not match, specifically, with the protein chromatographic profile (see Fig. 5A). This could be probably ascribed to the formation of some anionic species of Mn, such as citrate, showing important retention in the column. In contrast, for the real serum sample, the interaction is with Tf, most likely due to the presence of

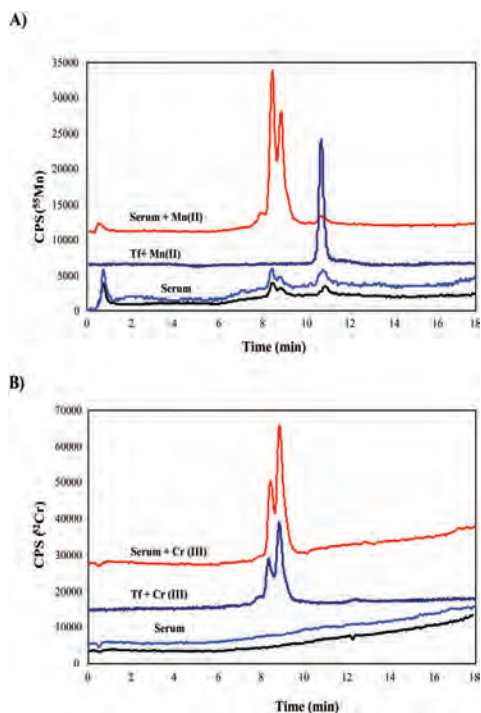


Fig. 5 Chromatographic profile obtained by HPLC-ICP-MS for: (A) Mn in serum from a patient, serum from a control individual, control serum incubated with Mn(II) and standard transferrin incubated with Mn(II); (B) ^{52}Cr in serum from a patient, serum from a control individual control serum incubated with Cr(III) and standard transferrin incubated with Cr(III).

a third binding partner naturally present there (a synergistic ion that has proved to be also necessary in the binding of other metals to Tf, such as bicarbonate for Fe-Tf or Al-Tf complexes).

The speciation studies for Cr turned out to be slightly different. Although Cr, as Cr(III), seems to be associated to transferrin,²² results in the patient sample whose blood contained about 2 ng mL^{-1} of total Cr were negative (undetectable) with our HPLC-ORS-ICP-MS set-up. Fig. 5B shows the chromatographic profiles of control serum and patient serum together with the serum and a transferrin standard both incubated with 30 ng mL^{-1} of Cr(III). As can be observed, the Cr(III) elutes at the same retention time (9 min) as the transferrin peak (see Fig. 4A), in agreement with previous observations in our group.¹⁵ Contrary to the Mn profile, the transferrin standard incubated with Cr(III) showed very similar results to the incubated serum and the column recovery experiments revealed that >80% of the injected Cr eluted from the system. However, similar incubation experiments taken with Cr(VI) (at 30 ng mL^{-1}) instead did not provide detectable signals for Cr in our HPLC-ICP-MS experiments (LD 0.7 ng mL^{-1}). This result tends to support the idea of Cr released from the prosthesis as Cr(VI), potentially more toxic than the Cr(III), and that it is not bound to the serum components. Such Cr(VI) might be associated to the cellular components of blood (red blood cells, lymphocytes, etc.), since the total elemental concentration in whole blood is significantly high and it can not be detected in plasma. In fact, Cr is well known to generate DNA adducts and to diminish DNA synthesis so is expected to be found in the nucleus of cells such lymphocytes rather than in plasma.²³

Finally, the speciation of the Co present in human serum was similarly accomplished. Fig. 6 shows the HPLC-ICP-MS Co elution profile for control serum and serum from a patient with hip prosthesis (total Co content in whole blood 1.8 ng mL^{-1}). Fig. 6 also shows the Co elution profile for a control serum spiked with 30 ng mL^{-1} of Co(II). As can be observed, both control and patient serum showed a Co peak around 14 min that was also detectable in the blank gradient; however, in the case of the patient, an additional Co-containing peak appears at 12.5 min. This peak eluting at 12.5 min seems to correspond to the association of Co to albumin. This is in agreement with recent

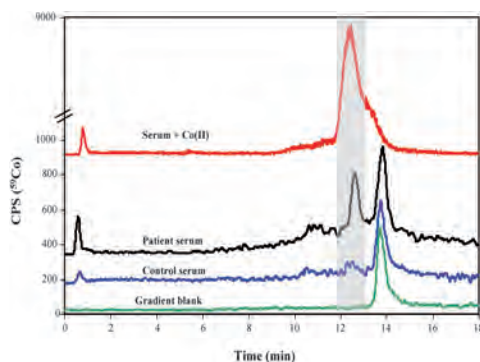


Fig. 6 Chromatographic profile obtained by HPLC-ICP-MS for ^{59}Co in serum from a patient, serum from a control individual, control serum incubated with Co(II) and blank gradient.

reports²⁴ that revealed very strong binding of Co to the N-terminus of albumin by ESI-MS. In fact, a species of albumin that is missing the first 2 N-terminal aminoacid residues did not form this adduct and the binding seems independent of the oxidation status of the most available cysteine residues.²⁴ The spiking experiments in serum provided similar results (see Fig. 6) to those described before for the patient showing a main Co peak at 12.5 minutes. However, the incubation of Co(II) with an albumin standard did not revealed any specific binding of the metal (data not showed). Therefore, it seems clear that the other serum components play a crucial role in the association of metals to proteins that can not be studied in protein standard models.

Finally, Ti speciation was conducted in the serum samples of the patients and also in the control individuals. According to existing literature,^{25,26} transferrin seems to be the main binder of Ti(IV) in human serum. However, the reported data have been obtained *in vitro* using “spiked” Ti(IV) serum samples. Unfortunately, our attempts to apply the developed HPLC-ORS-ICP-MS speciation methodology to Ti speciation failed to provide accurate results due to the presence of spectral interferences (namely, SO⁺).

Conclusions

A sensitive strategy for the total determination of trace elements potentially released from M/M total hip prosthesis to the biological fluids blood and urine has been developed and validated by means of DF-ICP-MS. The methodology has proved to be sensitive enough to precisely and accurately determine Co, Cr, Mn, Mo and Ti in two reference materials (at the level expected in the samples). Multi-elemental determinations in real samples have been accomplished in several samples of patients carrying such prosthesis and the levels compared to those of control individuals by means of box diagrams. Significant differences have been found for Cr and Ti, both in blood and in urine samples. Differences were also found in patients carrying titanium-based dental implants. Further on, speciation studies have been conducted in those samples where the level of Cr, Co and Mn was slightly higher than in control individuals. These results revealed the association of Mn to transferrin and of Co to albumin and the almost complete absence of Cr in the chromatograms. It is speculated that Cr might be released from the prosthesis as Cr(VI) and so it can not be detected under the proposed HPLC-ICP-MS experimental conditions.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Thermo Fischer Scientific for the loan of the X-2 Series instrument. Financial support

from Socinser 21 S.A. (Asturias) and FICYT, Project PC06-035 (Principado de Asturias, Spain) is gratefully acknowledged.

References

- 1 A. Sargeant and T. Goswami, *Mat. Design*, 2007, **28**, 155–171.
- 2 J. W. Nicholson, *The chemistry of metal and dental materials*, Ed. RSC, RSC Monographs, Cambridge, 2002.
- 3 J. H. Dumbleton and M. T. Manley, *J. Arthroplasty*, 2005, **20**, 174–187.
- 4 H. A. McKellop, *Biomaterials*, 2007, **28**, 5049–5057.
- 5 C. Lhotka, T. Szekeres, I. Steffan, K. Zhuber and K. Zweymüller, *J. Orthop. Res.*, 2003, **21**, 189–195.
- 6 I. Milosev, V. Pisot and P. Campbell, *J. Orthop. Res.*, 2005, **23**, 526–535.
- 7 A. K. Skipor, P. A. Campbell, L. M. Patterson, H. C. Anstutz, T. P. Schmalzried and J. J. Jacobs, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2002, **13**, 1227–1234.
- 8 C. Heisel, M. Silva, A. K. Skipor, J. J. Jacobs and T. P. Schmalzried, *J. Bone Jt. Surg., Am. Vol.*, 2005, **87**, 781–787.
- 9 A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón and M. L. Fernández-Sánchez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 236–247.
- 10 N. J. Hallab, J. J. Jacobs, A. Skipor, J. Black, K. Mikecz and J. O. Galante, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **49**, 353–361.
- 11 J. Yang and J. Black, *Biomaterials*, 1994, **15**, 262–268.
- 12 R. Lobinski, D. Schaumlöffel and J. Szpunar, *Mass Spectrom. Rev.*, 2006, **25**, 255–289.
- 13 A. Sarmiento, J. Marchante Gayón, J. M. Tejerina Lobo, J. Paz Jiménez and A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 2583–2589.
- 14 A. Sarmiento, J. Marchante Gayón, J. M. Tejerina Lobo, J. Paz Jiménez and A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **382**, 1001–1009.
- 15 M. Montes-Bayón, A. B. Soldado Cabezuolo, E. Blanco González, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 947–951.
- 16 K. Muller and E. Valentine-Thon, *Neuroendocrinol. Lett.*, 2006, **27**, 31–35.
- 17 C. Lhotka, T. Szekeres, I. Steffan, K. Zhuber and K. Zweymüller, *J. Orthop. Res.*, 2003, **21**, 189–195.
- 18 *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: List of IARC evaluation*, IARC, Lyon, 1996.
- 19 H. Thomas, G. C. Carvalho, M. H. Fernandes, A. P. Freire and L. M. Abrantes, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1996, **7**, 291.
- 20 A. B. Soldado, E. Blanco-Gonzalez and A. Sanz-medel, *Analyst*, 1997, **122**, 573–577.
- 21 B. Michalke, A. Berthele, P. Mistriotis, M. Oehsenkühn-Petropoulou and S. Halbach, *J. Trace El. Biol. Med.*, 2007, **21**(S1), 4–9.
- 22 F. Borguet, R. Cornelis, J. Delanghe, M.-C. Lambert and N. Lameire, *Clin. Chim. Acta*, 1995, **238**, 71–84.
- 23 J. Y. Wang, D. T. Tsukayama, B. H. Wicklund and R. B. Gustillo, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996, **32**, 655.
- 24 D. Bar-Or, L. T. Rael, R. Bar-Or, D. S. Slone, C. W. Mains, N. K. R. Rao and C. G. Curtis, *Clin. Chim. Acta*, 2008, **387**, 120–127.
- 25 A. D. Tinoco and A. M. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 11218–11219.
- 26 A. D. Tinoco, E. V. Eames and A. M. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2262–2270.

D.1.5 Referencias

- [1] M.T. Clarke, P.T.H. Lee, A. Aora y R.N. Villar. *Levels of metal ions after small-and-large-diameter metal-on-metal hip arthroplasty*. J. Bone Joint Surg.(Br). 85 (2003) 913-920.
- [2] I. Iavicoli, G. Falcone, M. ALessaandrelli, R. Cresti, V. De Santis, S. Salvatori, A. Alimonti y G. Carelli. *The release of metals from metal-on-metal surface arthroplasty of the hip*. J. Trace Elem. Med. Biol. 20 (2006) 25-31.
- [3] P. Sauvé, J. Mountney, T. Khan, J. De Beer, B. Higgins y M. Grover. *Metal ion levels after metal-on-metal ring total hip replacement a 30-year follow-up study*. J. Bone Joint Surg. 89 (2007) 586-590.
- [4] C. Anderson, S.J. MacDonald, S. Sritulanondha, A. Thompson, D. Naudie y A. Charles. *Metal ion levels after metal-on-metal total hip arthroplasty: a randomized trial*. Clin. Orthop. Relat. Res. 467 (2009) 101-111.
- [5] T.D. Richardson, S.J. Pineda, K.B. Streng, T.A. Van Fleet, M. MacGregor, J.C. Milbrandt, J.A. Espinosa y P. Freitag. *Serum titanium levels after instrumented spinal arthrodesis*. Spine. 33 (2008) 792-796
- [6] I. Catelas, P.A. Campbell, J.D. Bobyn, J.B. Medley y O.L. Huk. *Wear particles from metal-on-metal total hip replacements: effects of implant design and implantation time*. Proc. Inst. Mech. Eng. 220 (2006) 195-208.
- [7] T. Wright y S.B. Goodman. *Implant wear in total joint replacement: clinical and biologic issues, material and design considerations*. J. Am. Acad. Orthop. Surg. 2 (2001) 176-185.
- [8] D.R. Haynes, S.D. Rogers, M.J. Pearcy y D.W. Howie. *The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles*. J. Bone Joint Surg. 75 (1993) 825-834.
- [9] N. Hallab, K. Merritt y J.J. Jacobs. *Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants*. J. Bone Joint Surg. (Am). 83 (2001) 428-436.
- [10] L. Savarino, D. Granchi, G. Ciapetti, E. Cenni, A. Nardi Pantoli y R. Rotini. *Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: a comparison with metal-on-metal polyethylene bearings*. J. Biomed. Mater. Res. 63 (2002) 467-474.
- [11] E. Dunstan, D. Ladon, P. Whittingham-Jones, R. Carrington y T.W.R. Briggs. *Chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients with metal-on-metal hip bearings*. J. Bone Joint Surg. (Am). 90 (2008) 517-522.
- [12] A. Schuh, G. Zeiler, U. Holzwarth y T. Aigner. *Malignant fibrous histiocytoma at the site of a total hip arthroplasty*. Clin. Orthop. Relat. Res. 425 (2004) 218-522.
- [13] H. Pandit, S. Glyn-Jones y P. McLardy-Smith. *Pseudotumors associated with metal-on-metal hip resurfacing*. J. Bone Joint Surg. (Br). 90 (2008) 847-851.
- [14] T. Visuri, P. Pulkkinen y P. Paavolainen. *Malignant tumors at the site of total hip prosthesis. Analytic review of 46 cases*. J. Arthroplasty. 21 (2006) 311-323
- [15] L. Büdinger y M. Hertl. *Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview*. Allergy. 55 (2000) 108-115.

- [16] V. Stejskal. *Human Hapten-specific lymphocytes: biomarkers of allergy in man.* Drug Inf. J. 31 (1997) 1379-1382.
- [17] Y.S. Park, Y.W. Moon, S.J. Lim, J.M. Yang, G. Ahn y Y.L. Choi. *Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement.* J. Bone Joint Surg. (Am). 87 (2005) 1515-1521.
- [18] P.A. Revell. *The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses.* J. R. Soc. Interface. 5 (2008) 1263-1278.
- [19] A. Grübl, M. Marker, W. Brodner, A. Giurea, G. Heinze, V. Meisinger, H. Zehetgruber y R. Kotz. *Long-term follow-up of metal-on-metal total hip replacement.* J. Bone Joint Surg. 88 (2007) 1003-1005.
- [20] A. Sarmiento-González, J.M. Marchante-Gayón, J.M Tejerina-Lobo, J.Paz-Jiménez and A. Sanz-Medel. *ICP-MS multielemental determination of metals potentially released from dental implants and articular prostheses in human biological fluids.* Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1001-1009.
- [21] M. Montes-Bayón, K. DeNicola y J. A. Caruso. *Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry.* J. Chromatograph. A. 1000 (2003) 457-476.

D.2 EVALUACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE TITANIO Y SU TRANSPORTE EN EL SUERO DE PACIENTES PORTADORES DE IMPLANTES DE OSTEOSÍNTESIS INTRAMEDULARES Y EXTRAMEDULARES.

Artículo científico II: *Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels.* **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** DOI 10.1007/s00216-011-5232-8.

Artículo científico III: *Titanium binding patterns to human transferrin in unspiked serum samples: preferential binding sites and effect of sialic acids.* **Metallomics.** In press.

D.2.1 Introducción

La liberación de elementos metálicos, particularmente Ti, procedentes de implantes de cadera y dentales (como se mostró en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral), ha hecho surgir la pregunta de si dicha liberación ocurriría en otros implantes metálicos como son los clavos de osteosíntesis, utilizados con frecuencia para fijar las fracturas de huesos largos (fémur, tibia y húmero). Este tipo de fracturas son muy comunes; tanto en individuos jóvenes, tras sufrir accidentes de tráfico o lesiones deportivas, como en gente mayor, con problemas de osteoporosis [1,2]. Tanto los implantes de osteosíntesis intramedulares como los extramedulares, así como los tornillos utilizados para fijar estos últimos están hechos de aleaciones cuyo metal principal es el Ti. Se elige este elemento por ser altamente resistente a la corrosión y por ser considerado el elemento biocompatible por excelencia. Gran parte de estas propiedades se deben a la formación de la capa de óxido (TiO_2) sobre su superficie [3], que lo protege. Sin embargo, además de su bien conocida escasa resistencia a la fricción [4], actualmente también se ha puesto en entredicho su resistencia ante la corrosión [5].

Por ello, la comunidad científica internacional ha comenzado a investigar en profundidad acerca de la biocompatibilidad real del Ti, la posible liberación de éste, así como las consecuencias biológicas de dicha liberación, desde muy diversas disciplinas científicas (medicina, química, ciencias de los materiales, bioquímica, etc.).

Para estudiar la liberación de Ti en individuos portadores de diferentes implantes, contruidos a base de aleaciones de este metal es necesario, en primer lugar, establecer los niveles de concentración en la población no portadora de implantes metálicos, la cual se puede encontrar expuesta a otras fuentes del mismo (p.ej. algunos productos cosméticos y/o de higiene personal). En este sentido, se debe prestar especial atención a los problemas de contaminación, durante la manipulación de las muestras y al uso de

instrumentación analítica inadecuada, p.ej. el empleo del horno de grafito, el cual no permiten alcanzar los límites de detección necesarios para determinar este elemento en los individuos control o el empleo del ICP-MS de tipo cuadrupolo, que no posee la capacidad para eliminar las interferencias poliatómicas que afectan a la medida del Ti en los fluidos biológicos. De hecho, en muchos de los trabajos publicados hasta la fecha se han documentado niveles de hasta $114 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ti en suero [6].

Por ello, es imprescindible el uso de estrategias adecuadas para su medida, con el fin de obtener los niveles basales de este elemento en la población sana y así poder compararlos con los niveles obtenidos en los pacientes portadores de implantes (intentando correlacionar, de este modo, un posible incremento de Ti con una posible patología). Dicha instrumentación no solamente debe poseer una elevada sensibilidad (teniendo en cuenta la baja concentración a la que se encuentra en los fluidos biológicos, una vez liberado de los implantes) sino también una selectividad adecuada (debido a la complejidad de la matriz), con el fin de discriminar dicho metal de las interferencias poliatómicas que le afectan (ver la Tabla C.I en el Experimental de la presente Tesis Doctoral).

Este metal, una vez liberado de los implantes parece que se excreta muy poco por la orina [7], sin embargo su ruta metabólica es aún desconocida. Por tanto, como se comentó anteriormente, para avanzar en el conocimiento de los mecanismos que sigue el Ti en su distribución sistémica por el organismo, resulta imprescindible llevar a cabo estudios de especiación cualitativa y cuantitativa. Este segundo aspecto es complejo, particularmente, debido al desconocimiento del tipo de biomolécula a la que se asocia el Ti y como consecuencia, la ausencia del estándar correspondiente de forma comercial.

Estudios recientes realizados *in vitro* han puesto de manifiesto que la principal proteína transportadora de Ti en el suero es la transferrina (Tf) [6,8,9], con una constante de afinidad superior a la del complejo Fe-Tf. Sin embargo, todos estos estudios se habían realizado tras la adición de Ti al suero, por lo que

previamente a la presente Tesis, no se habían llevado a cabo estudios a nivel basal *in vivo*.

La transferrina, es una proteína globular constituida por una única cadena polipeptídica de 679 aminoácidos y cada molécula de transferrina consta de dos lóbulos independientes y simétricos denominados dominios N-terminal (residuos 1-336) y C-terminal (residuos 337-679), en los cuales se encuentran los dos centros de unión a los metales. Se puede ver ilustrado un dibujo de la proteína en la D.2.1 [10].

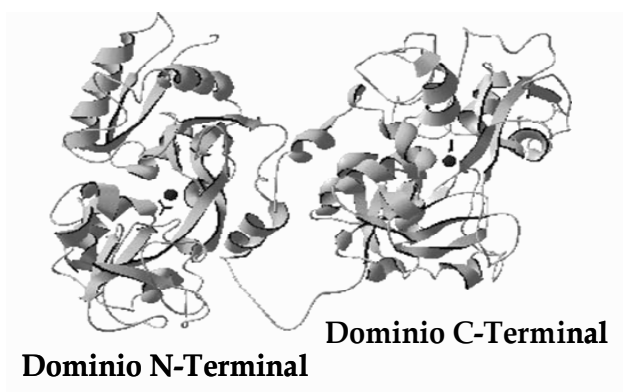


Figura D.2.1. Estructura de la transferrina diférrica (saturada) mostrándose los dos dominios correspondientes al C- y al N- terminales, respectivamente

En el suero de un individuo sano, el hierro se encuentra presente a concentraciones entre $0,1-0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la Tf a niveles de 3 mg mL^{-1} , por tanto, bajo condiciones fisiológicas, la Tf de suero humano presenta un grado de saturación de hierro aproximadamente del 30% [11]. Esto implica que aun habrá sitios disponibles para la asociación con otros metales, p.ej. el Ti. El complejo formado tendrá una menor o mayor constante dependiendo del metal de que se trate y del ión sinérgico que se necesite para completar la esfera de coordinación. Algunos metales también transportados por esta proteína son Al^{3+} y Cr^{3+} [12], Bi^{3+} [13], Ga^{3+} [14], así como In^{3+} y Tl^{3+} [15]. Las diferencias estructurales entre los dos dominios (N-terminal y C-terminal) hacen que la unión de los metales en cada uno de ellos no sea idéntica. Así, en el suero se

pueden distinguir y aislar las cuatro isoformas de la Tf en función de su contenido en hierro:

- Apo-transferrina (Apo-Tf): Tf libre de Fe.
- Fe_{1N}-Tf: Tf monoférrica con el hierro enlazado al nitrógeno terminal.
- Fe_{1C}-Tf: Tf monoférrica con el hierro enlazado al carbono terminal.
- Fe₂-Tf: Tf diférrica, también llamada holotransferrina.

Además, la transferrina es una glicoproteína; es decir, contiene dos cadenas de oligosacáridos idénticas en el lóbulo del C terminadas, en algunos casos, con moléculas de ácido acetyl neuramínico (ácido siálico) [16]. El contenido de ácidos siálicos puede variar de 0 a 8, dando lugar a las distintas sialoformas de la Tf. Dichas sialoformas difieren en su pI en 0,1 unidades de pH por cada residuo de ácido siálico unido a la cadena glucídica. Los puntos isoeléctricos de estas isoformas varían entre 5 y 6 y presentan pesos moleculares entre 75,37 y 79,81 KDa. Las sialoformas más comunes se pueden ver recogidas en la Figura D.2.2. [17].

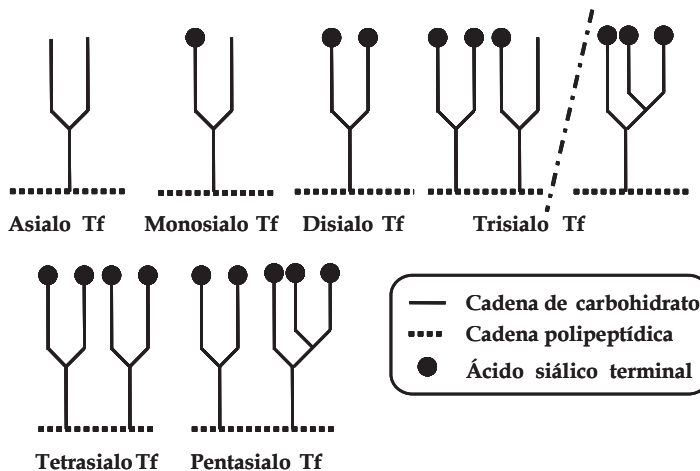


Figura D.2.2. Sialoformas más comunes de la transferrina

La sialoforma más abundante en el suero humano es la tetrasialo Tf, la cual posee dos cadenas de heterosacáridos idénticos y cada una con 2 ácidos

siálicos. Las sialoformas asialo (ningún residuo sialo), monosialo, disialo y trisialo-Tf son minoritarias y en conjunto se las denomina transferrinas deficientes en carbohidratos (CDT). Su presencia, en concentraciones elevadas es hoy en día un biomarcador altamente específico para el diagnóstico del alcoholismo crónico, defectos congénitos de glicosilación (CDG) y pérdida de líquido cefaloraquídeo (LCR, con una alta proporción de asialo-Tf) [18].

D.2.2 Objetivo general y objetivos parciales

Según lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este segundo capítulo fue: *la evaluación de la liberación de Ti y su transporte en el suero de pacientes portadores de implantes de osteosíntesis intramedulares y extramedulares.*

Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de una metodología para la determinación de Ti en suero humano mediante análisis de dilución isotópica (IDA) con detección por ICP-MS de alta resolución (HR-ICP-MS).
- Validación de la metodología mediante el análisis de un material de referencia certificado en Ti por SERONORM. La concentración de Ti en dicho suero de referencia es menor de $2 \mu\text{g L}^{-1}$, lo cual garantiza poder utilizar dicha metodología en las personas sanas (controles) en las cuales se espera obtener bajos niveles de titanio.
- Aplicación de la metodología desarrollada para la obtención de la concentración de Ti en el suero de personas sanas (controles) y en el suero de pacientes portadores de implantes de osteosíntesis (tanto intramedulares como extramedulares).
- Separación y detección de las proteínas séricas que transportan al Ti en suero mediante el empleo de las llamadas “técnicas híbridas”, en particular mediante el acoplamiento entre el HPLC y el HR-ICP-MS.

- Puesta a punto de un método para la cuantificación del Ti enlazado a dichas proteínas séricas en suero humano, mediante técnicas de dilución isotópica en el modo post-columna (modo no específico).
- Validación de la metodología de especiación desarrollada mediante el análisis de un material de referencia de suero certificado en Ti por SERONORM (Seronorm™ Trace Element Serum (Ref. 201405)).
- Aplicación de la metodología desarrollada a la cuantificación del Ti asociado a la(s) proteína(s) que transporte(n) a dicho metal en el suero en pacientes e individuos control.
- Estudio *in vivo* del enlace del Ti con la transferrina, para elucidar si este se forma preferentemente en el lóbulo del N o de C así como el efecto de los ácidos siálicos presentes en la proteína transferrina sobre dicho enlace. Dicho estudio se realizará a los niveles de Ti presente en el suero de los pacientes portadores de implantes (sin adición alguna de Ti).

Los resultados y discusión derivados de este segundo capítulo se recogen en los artículos científicos II y III que se muestran en las secciones D.2.3 y D.2.4, respectivamente.

D.2.3 Artículo científico II: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
DOI 10.1007/s00216-011-5232-8.

Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels

Yoana Nuevo-Ordóñez · M. Montes-Bayón · E. Blanco-González · J. Paz-Aparicio · J. Diáñez Raimundez · J. M. Tejerina · M. A. Peña · A. Sanz-Medel

Received: 7 April 2011 / Revised: 24 June 2011 / Accepted: 4 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Increased concentrations of circulating metal-degradation products derived from the use of Ti orthopaedic implants may have deleterious biological effects over the long term. Therefore, there is an increasing need to establish the basal level of Ti in the serum of the population (exposed and non-exposed) with appropriate highly sensitive techniques and strategies. With this aim, we have developed a quantitative strategy for the determination of total Ti concentration in human serum samples by isotope dilution analysis using a double-focussing inductively coupled plasma mass spectrometer. Minimizing sample handling and therefore contamination issues, we obtained detection limits of about $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$

Ti working at medium resolution ($m/\Delta m$ 4000). Such extremely good sensitivity permitted us to establish the range of Ti concentration in serum of 40 control individuals (mean $0.26 \mu\text{g L}^{-1}$) and also to compare it with the level in exposed patients with different Ti metal implants. On the other hand, Ti transport “in vivo” studies have been enabled by online coupling of liquid chromatography (anion-exchange) separation and double-focussing inductively coupled plasma mass spectrometry for sensitive detection of Ti. The development of a postcolumn isotope dilution strategy permitted quantitative characterization of the Ti-transporting biomolecules in human serum. The results for unspiked serum revealed that 99.8% of the Ti present in this fluid is bound to the protein transferrin, with column recoveries greater than 95%.

Keywords Titanium · Double-focussing inductively coupled plasma mass spectrometry · Intramedullary nails · Speciation

Published in the special issue *Plasma Spectrochemistry* with guest editors Juan Castillo and Martín Resano.

Y. Nuevo-Ordóñez · M. Montes-Bayón (✉) ·
E. Blanco-González · A. Sanz-Medel (✉)
Department of Physical and Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry, University of Oviedo,
C/Julian Clavería 8,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: montesmaria@uniovi.es
e-mail: asm@uniovi.es

J. Paz-Aparicio · J. D. Raimundez
Department of Surgery, Faculty of Medicine,
University of Oviedo,
C/ Julián Clavería 6,
33006 Oviedo, Spain

J. M. Tejerina · M. A. Peña
Department of Stomatology, School of Stomatology,
University of Oviedo,
C/ Catedrático José Serrano s/n,
33009 Oviedo, Spain

Introduction

Titanium (Ti) is a light and corrosion-resistant metal that either pure or alloyed has been successfully employed in orthopaedic and dental implants [1]. Among other fractures, fractures of the upper part of the femur (termed hip or proximal femoral fractures) may be surgically fixed using Ti implants. For this purpose, it is common to use the so-called intramedullary nail, which consists of a metal rod inserted from the upper end of the femur into the inner cavity (medulla) of the bone and held in place with screws [2]. The rod and the screws are made of pure Ti or Ti alloys because of their previously mentioned advantageous mechanical properties. Alternatively, bone fractures

can also be treated with external fixation devices made of Ti. These external fixation devices have less invasive implantation, owing to only the screws being in contact with the bone, and they also have less contact with the bloodstream. Nevertheless, the stability of the fracture with these external devices is worse, so the recovery of the patient is slower and the risk of infection is higher because they will not give rise to closed fractures. Similarly, Ti is one of the main components of metal prostheses involved in total joint arthroplasty [3], in instrumental arthrodesis of spinal segments [4] and also for implants in dentistry [5]. Although Ti was considered as a “biologically inert” element, recent studies have revealed that Ti-based implants undergo corrosion and wear, generating metallic debris that can exist in several forms, including organo-metallic complexes, free metallic ion and inorganic metal oxides (sometimes as TiO₂ nanoparticles). In fact, prosthesis-derived metal wear products are found extensively within the synovial fluid and periprosthetic tissues of arthroplasty patients [6]. These Ti-containing species circulate in the body fluids [7], increasing the levels of this element in serum and urine of patients after total hip and knee arthroplasty [8, 9].

Besides its orthopaedic use, Ti in the form of TiO₂ nanoparticles has been widely used as a white pigment in paint, food colorant, ultraviolet blocker in cosmetics and disinfectant of wastewater. In 2006, the International Agency for Research on Cancer classified pigment-grade TiO₂ as a group 2B carcinogen (possibly carcinogenic to humans) although in 1999 Ti metal implants (alloys) were considered as a group 3 carcinogen, not classifiable as to their carcinogenicity to humans. Biodistribution experiments have indicated that these TiO₂ particles can be transported (mainly in the bloodstream) to other tissues and organs after uptake by the gastrointestinal tract, producing hepatic injury and renal lesions [10]. However, very little is known about Ti toxicity regarding the identity of the species released [TiO₂ nanoparticles or Ti(IV) ions] and their concentration. Therefore, the strict control of the Ti levels in the biological fluids of the exposed population is of general interest, in order to evaluate possible pathological conditions associated with concentration increments. For such a purpose, the first step should be the establishment of Ti concentrations in non-exposed individuals that permit one to mark a threshold between natural Ti concentration variations and levels of exposure. In this regard, initial published literature [11] referred to Ti concentrations in human blood serum of about 2.4 μM (or 114 μg L⁻¹). Such elevated values could be ascribed to the lack of sensitive and selective analytical techniques to conduct such determinations or to the potential contamination risks during sample handling. The recent use of more sensitive and selective instrumentation such as

double-focussing (DF) inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS) has permitted the determination of Ti levels below 1 μg L⁻¹ in body fluids of patients with metal implants [12, 13], demonstrating that use of other instruments, such as the quadrupole ICP-MS, even fitted with a collision/reaction cell to overcome polyatomic interferences, is not adequate.

If Ti is released from implants, the next concern is its transport, distribution and accumulation. It seems that in the bloodstream Ti binds to human serum transferrin (Tf) and to a much lower extent with human serum albumin [11]. However, most studies investigating these properties dealt with Ti-spiked fluids, which might not reveal the natural physiological circumstances. Tf is an 80-kDa bilobal glycoprotein with two similar metal binding sites that coordinate metal ions typically in a pseudo-octahedral geometry with one aspartate, one histidine and two tyrosinate residues and a bidentate synergistic anion (usually bicarbonate). Since only about 30% of the binding sites of human serum Tf are occupied by Fe(III), it could be expected that the vacant sites could bind other metal ions. Tinoco and Valentine [14] demonstrated (in vitro) that Tf can bind Ti(IV) with high affinity (log *K*=26) by conducting titration of Tf with titanium(IV) citrate solution. Other authors have also shown the ability of Ti (IV) from the anticancer titanocene drug to bind to Tf in the form of Ti₂Tf, which could act as a mediator for Ti delivery to tumour cells [15]. However, both publications refer to the formation of Ti₂Tf complexes that are unlikely to be formed in vivo in exposed patients owing to low Ti(IV) concentrations with respect to the rather high Tf content in serum (about 3 mg mL⁻¹). In fact, the speciation of Ti at basal levels in the serum of control and exposed individuals has not been conducted.

For this purpose, the work described here has two specific aims. Firstly, we aimed at developing a quantification method for Ti in human serum by DF-ICP-MS [based on isotope dilution analysis (IDA) by using isotopically enriched ⁴⁷Ti] in order to establish natural variations of Ti levels in unexposed individuals and to be able to distinguish those values from the values for exposed patients after surgical implantation. Secondly, we aimed at developing a quantitative Ti speciation method to address the concentration of Ti bound to the different human serum biomolecules, based on using an anion-exchange chromatographic system coupled to the DF-ICP-MS system. For this purpose, a sample preconcentration strategy was designed and the postcolumn addition of the ⁴⁷Ti spike was used for quantification of the Ti species being eluted. Methodological accuracy and precision in total Ti analysis as well as in its speciation in serum were evaluated by using a serum reference material, certified for the total Ti content.

Experimental

Instrumentation

An ELEMENT II (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) DF-ICP-MS instrument was used for the total elemental determination and speciation. The instrument was equipped with a Meinhard concentric glass nebulizer and with nickel sampler and skimmer cones.

For separation of the human serum proteins, we used a high-performance liquid chromatography (HPLC) set-up consisting of a dual-piston HPLC pump (LC-10 AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) and a model 7125 sampler injection valve (Rheodyne, Cotati, CA, USA) fitted with a 50- μ L loop. Separations of human serum proteins were performed on a Mono Q HR 5/50 GL (Pharmacia, GE Healthcare, Spain) anion-exchange column.

The identification of the isolated proteins was conducted using a matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) MS system. The instrument used in the study was a Voyager-DETM STR biospectrometry workstation (Applied Biosystems, Langen, Germany) equipped with a nitrogen pulsed laser (337 nm) and operating in positive mode. Sample preparation for MALDI-TOF-MS measurements was performed on a stainless steel hydrophobic target (Voyager 96 \times 2 sample plate, part no. V700813) using the dried droplet technique.

Reagents, materials and samples

Ultrapure water (18.2 M Ω cm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Acetonitrile was of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany). Acetic acid and formic acid were of analytical reagent grade quality from Merck. Trypsin (200 μ g mL⁻¹) was prepared by dissolving the corresponding solid in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8. A solution of 6 M urea (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) in 100 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris; Merck, Darmstadt, Germany) was also prepared. DL-dithiothreitol and iodoacetamide were purchased from Sigma. The reference material used was Seronorm trace elements serum level 1 (reference 201405) (Nycomed, Oslo, Norway). This certified reference material was kept in a refrigerator at 4 °C until analysis and was reconstituted following the procedure given by the manufacturer.

Mobile phases for HPLC containing 50 mM Tris/acetic acid (Merck), pH 7.4 (buffer A) and buffer A plus 1.5 M ammonium acetate (Merck) (buffer B) were prepared by dilution of the solid salts with the 18 M Ω cm distilled deionized water (Millipore, Bedford, MA, USA). A Ti standard solution [1000 μ g g⁻¹ Ti as (NH₄)₂TiF₆] with natural abundances of 7.44% ⁴⁷Ti, 73.72% ⁴⁸Ti and 5.41% ⁴⁹Ti was obtained from Merck. The isotopically enriched

⁴⁷Ti (4.18 \pm 0.02 ng g⁻¹) with relative abundances of 72.466% ⁴⁷Ti, 22.832% ⁴⁸Ti and 1.216% ⁴⁹Ti was obtained from Spectrascan (Teknolab, Drobak, Norway) as ⁴⁷TiO₂ and solubilized in 5% HF.

Amicon Ultra cut-off membrane filters (30 kDa) were obtained from Millipore Iberica (Madrid, Spain). A Sequazyme peptide mass standard kit (calibration mixture) was used for MALDI mass calibration. The mixtures were composed of bradykinin (1060.57 gmol⁻¹), angiotensin (1296.69 gmol⁻¹), renin (1759 gmol⁻¹) and ACTH (2465.20 gmol⁻¹). The matrix used was α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) (5 mg mL⁻¹ dissolved in 100 μ L 1% trifluoroacetic acid and to 1 mL with 50% acetonitrile). ZipTip pipette tips were obtained from Millipore (Billerica, MA, USA). Human serum samples from healthy volunteers and patients after surgical implantation were kindly provided by Hospital Central of Asturias (Spain). Use of glassware was avoided to prevent metal contamination.

Procedures

Serum collection

Serum from healthy individuals (40 subjects) and patients (37 subjects) with Ti implants was used. The analysed samples corresponded to three different groups of patients with intramedullary implants in the tibia (15 patients), femur (eight patients) and humerus (eight patients with a Ti humeral nail) and a fourth group with an external fixation implant (named Philos) for the proximal humerus with angular stability (six patients).

The nails for the humerus, tibia and femur belong to a family named T2™ nails (Stryker Ibérica, Madrid, Spain) and they are made of Ti₆Al₄V alloy. The Philos external fixation device is made of a different Ti alloy (Ti/6% Al/7% Nb) and is manufactured by Synthes (Solothurn, Switzerland).

The serum samples from the patients with these implants for 6 months, 2 years and 5 years were analysed. The samples were collected in 5-mL Vacutainer tubes (Greiner Bio-One, Madrid, Spain) for trace elements. The precautions taken to avoid any metal contamination during blood extraction have been described elsewhere [12] and those procedures were followed here. Briefly, blood samples were withdrawn from a forearm vein using a stainless-steel needle surrounded by an inert plastic cannula. Blood was drawn into standard plastic syringes. The first 5 mL of blood extracted from each patient was used to rinse the system and was then discarded. The second 5 mL was transferred to blood-collection tubes conditioned with lithium heparin (Vacurette) and used to conduct the analysis. Immediately after collection, the blood samples were separated into serum and red blood cells by centrifugation

at 3000g for 15 min. Serum samples obtained in this way were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Sample preparation

Serum samples used to determine the total concentration of Ti were prepared following the method used in previous studies conducted in our group [16]. The serum was diluted before analysis as follows: 600 μL of serum was mixed with 30 μL of the spike solution (11.5 ng mL^{-1} Ti isotopically enriched with the isotope ^{47}Ti) and diluted to a final volume of 3 mL with ultrapure water. For speciation studies, the samples that exhibited total Ti concentration below 2 ng mL^{-1} were concentrated by using ultracentrifugation devices (30 kDa) by reducing the sample volume from 0.5 mL to approximately 0.2 mL (checked by weight after every step). Such a strategy was applied to the certified serum as well (1.4 ng mL^{-1} Ti) to address possible losses during sample handling. The samples were weighed before and after treatment to ensure final preconcentration factors. Those samples that contained Ti levels above 2 ng mL^{-1} were directly analysed in the HPLC-DF-ICP-MS set-up since the limits of detection achievable permitted the direct monitoring of Ti bound to proteins. No spiking of the samples was conducted at any point of this study.

Postcolumn IDA method

For postcolumn IDA, the solution eluted from the column was mixed with the ^{47}Ti spike solution (previously characterized for concentration and isotope abundances) pumped at 0.2 mL min^{-1} using a peristaltic pump. For the quantification, the isotope ratio ($^{47}\text{Ti}/^{49}\text{Ti}$ and $^{47}\text{Ti}/^{48}\text{Ti}$) was taken at each point of the chromatogram. The signal of ^{48}Ti was also used for quantification purposes, owing to the presence of an isobar interference from ^{48}Ca (0.187%) at the void volume. The method is based on previous work in the field [17] demonstrating that, once both solutions have been introduced into the ICP and ionized, by just measuring that isotope ratio of Ti in the peak of interest and applying the isotope dilution equation, one can obtain the mass flow chromatogram of Ti (ng Ti min^{-1}). The area of a given peak obtained by integration will give the Ti concentration in that peak [17].

Since the eluate from the column was also passed through a UV detector, set at 280 nm, for protein monitoring, the content of metal bound to a given protein can be assessed. The final operating conditions used are given in Table 1.

Tryptic digestion of the collected fraction

The protein fraction in which Ti is eluted was collected several times. Then, the concentration of the fraction was

achieved with 30-kDa cut-off membranes and finally the tryptic digestion was performed. For this purpose, 50 μL of the previous sample was mixed with 50 μL of urea (12 M in 100 mM Tris) and 5 μL of DL-dithiothreitol (200 mM) as a reducing agent and the mixture was allowed to react 1 h at room temperature. Then, 20 μL of iodoacetamide as an alkylating reagent was added, after 1 h at room temperature 775 μL of water was added to reduce the concentration of urea and finally 100 μL of trypsin was added to achieve the digestion of the protein and was allowed to react for 18 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The pH was brought down to 5 by adding 2 μL of glacial acetic acid. Finally, the peptides were purified using ZipTip pipette tips (10- μL pipette tip with a microvolume bed of chromatography medium fixed at its end). Peptides from acidic buffer were captured on the ZipTip resin, washed and then eluted at basic pH.

MALDI-TOF analysis of the collected fraction

The characterization of the Ti-containing fraction was done by peptide mass fingerprint. In brief, an adequate protein fraction was digested and desalted (with ZipTip) and an aliquot of this solution was mixed with saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, as the MALDI matrix, which was required for the desorption of the peptide molecules. Finally, the mixture was put on the target and dried at room temperature before MALDI-TOF-MS measurements. The same protocol was previously applied with a calibration peptide mixture (instead of the sample) to calibrate the MALDI-TOF-MS system. The results obtained proved unequivocally that the protein that exhibited Ti coelution is Tf, with 96% sequence coverage due to protein scores greater than 56 which are significant ($p < 0.05$).

Results and discussion

Total determination of Ti in serum samples by IDA-ICP-MS

The first aim of the work was the optimization and validation of an analytical strategy to allow the reliable determination of Ti in serum samples of controls and patients after surgical implantation of intramedullary nail devices to treat fractures. Total Ti determination was achieved by IDA using the isotopically enriched ^{47}Ti (isotopic abundance $72.47 \pm 0.03\%$). Its abundance differs greatly from that of natural ^{47}Ti ($7.44 \pm 0.03\%$), allowing its direct use in the IDA experiments. The total Ti concentration in the isotopically enriched solution was obtained by reverse IDA using a natural Ti ICP standard and was $4.18 \pm 0.02\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=5$).

The instrumental limits of detection were estimated to be around $0.05\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Ti (using the IUPAC criteria and 2%

D.2 CAPÍTULO II

Titanium release in serum by intramedullary Ti nails

Table 1 High-performance liquid chromatography instrumental conditions

Column	Mono Q HR 5/5 (50 mm×5-mm internal diameter, 10-mm particle size)	
Injector loop	50 μ L	
Flow rate	1 mL min ⁻¹	
Buffers	A: 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane/acetic acid (pH 7.4) B: A + 1.5 M ammonium acetate (pH 7.4)	
Gradient	Time (min)	Buffer B(%)
	0	0
	15	50
Detection	UVabsorption at 280 nm	

subboiling nitric acid as a blank solution) and the precision (repeatability) in terms of relative standard deviation was about 3% (n=5) at the level of 1 μ g L⁻¹. The determination of Ti in a serum reference material containing a low concentration of this metal (Seronorm trace elements serum level 1) was conducted to address the accuracy and precision of the IDA method in the serum matrix. The result obtained for such analysis was 1.3±0.2 μ g L⁻¹ Ti (three different serum aliquots), which shows good agreement with the value provided by the certification institution (mean of 1.4 μ g L⁻¹ Ti, ranging from 0.8 to 2 μ g L⁻¹).

Therefore, the serum samples were processed according to the above-described procedure and were analysed by DF-ICP-MS. The results obtained are shown in Fig. 1, where the Ti concentrations in the serum of control individuals (n=40) and implanted patients (separated according to the different types of implants) are shown (Fig. 1a). First, the relatively low dispersion of the data corresponding to the control individuals (Fig. 1b), with a mean value of 0.26±0.07 μ g L⁻¹ Ti (40 different individuals), is noteworthy. The repeatability for three independent replicates of the same sample (including addition of the spike, dilution and measurement) ranged from 5 to 10%. Such results permitted us to observe significant differences in the Ti concentration for all the patients with implants with respect to the control samples. Similar differences have been observed between control individuals (mean 0.7 μ g L⁻¹) and patients with instrumented spinal arthrodeses (2.4 μ g L⁻¹), also by using DF-ICP-MS [11]. However, the use of other types of mass analysers such as those containing collision/reaction cells provided Ti concentrations in serum of control individuals as high as 150 μ g L⁻¹ [18]. Unfortunately, such instruments might not be adequate for removal of all the polyatomic interferences coming from the matrix of the serum, although the sensitivity in laboratory solutions can be comparable.

Additionally, in the view of the results in Fig. 1a, several conclusions can be drawn. First, intramedullary nails (femoral, tibial or humeral) release more Ti into the bloodstream than superficial designs (Philos). This release does not seem to be time-dependent, as observed in Fig. 1b, where the results for different patients with different

exposure times are shown for the T2 tibial nail group. Thus, Ti release might occur owing mainly to shedding of the metallic implants by the blood component, apart from possible mechanical wear (since intramedullary nails are placed in highly irrigated areas) or passive dissolution processes [19]. However, we have no evidence that one of these mechanisms occurs preferentially to the rest. Such an observation agrees with the fact that similar Ti concentrations in serum have been found in patients with metal-on-metal total hip arthroplasty (where the prostheses are made of CoCrMo alloys and only the femoral stems are made of Ti alloys) [20] and with Ti–polyethylene total hip arthroplasty [12]. In both cases, the Ti release into the bloodstream was very similar (ranging from 1.5 to 2.5 μ g L⁻¹), pointing to the presence in both cases of the Ti stem, which is placed in a highly irrigated area, as the main source of circulating Ti(IV).

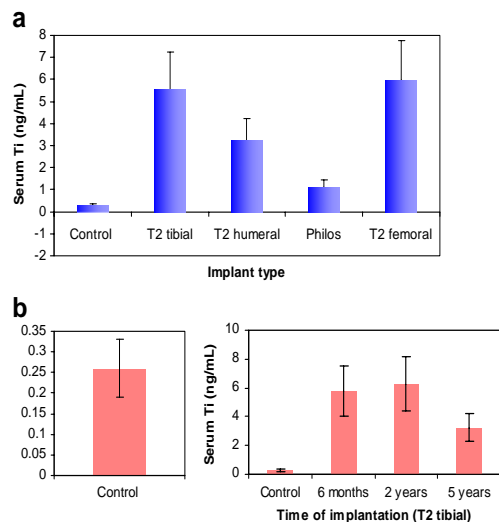


Fig. 1 Ti concentration in the serum **a** of patients with different types of intramedullary Ti nails and control individuals and **b** at different time points after implantation for a T2 tibial nail and magnification of the Ti levels in control individuals (n=40). The number of patients is given “Serum collection”

The concentrations observed here in patients with intramedullary nails, higher than those in patients with total hip arthroplasty, could be justified by the fact that in fracture fixation devices (such as intramedullary nails) the metal degradation may be facilitated by movement and micro-motion of the implant and fretting corrosion between the nail-locking screw interface [19]. These findings are most relevant to the orthopaedic community since fixation devices of this type are commonly employed in younger patients and the extent and effect of long-term exposure to low Ti concentration are still unknown.

Quantitative studies of Ti transport in serum samples

After proving a noticeable increase in total Ti concentration in the serum of patients with intramedullary nails with respect to controls, we next studied the transport of the released Ti into the bloodstream. Very little is known about the transport of Ti in the body and its effects. Therefore, the first goal was to identify the transporting protein/s for this metal in human serum in unspiked samples. Previous studies in our group were conducted in spiked samples obtained by incubation of titanium citrate with serum samples and revealed that Tf was the main binder biomolecule of Ti in serum. Curiously enough, however, Ti-Tf decomposition was observed with different chromatographic columns (only 40% of the injected Ti was recovered in some cases) [21]. In that work it was suggested that Ti(IV) hydrolysis and precipitation (as inactive titanium oxide species) could take place inside the chromatographic column. Thus, in this work we evaluated the possibility of assessing Ti natural speciation in serum. Therefore, the development of adequate preconcentration procedures was necessary to achieve detectable levels of Ti by HPLC-DF-ICP-MS when natural levels were directly undetectable.

In this vein, our first speciation studies were conducted with the serum samples of those patients exhibiting higher Ti concentrations (up to 6–7 $\mu\text{g L}^{-1}$). The best chromatographic conditions for the separation of the serum proteins were studied in a previous publication [21] and are summarized in Table 1. Figure 2 shows the chromatographic profile of a serum containing 6.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ti obtained by HPLC (anion exchange) using UV-vis (280 nm) (Fig. 2a) and DF-ICP-MS (Fig. 2b) detection. In Fig. 2b, the profile corresponding to ^{34}S shows a remarkable similarity to that observed for UV-vis detection (Fig. 2a), serving as an additional confirmation of the presence of the proteins bound to a given metal (Ti in this case) just by using ICP-MS. This latter chromatogram shows the presence of a single Ti peak at about 7 min, which corresponds to one of the Tf forms and no binding of Ti to albumin is observed. The profile of ^{49}Ti (data not shown) is very similar since both isotopes show comparable isotopic abundances.

However, the most abundant Ti isotope (73.72% ^{48}Ti versus 7.44% ^{47}Ti) is affected by the isobaric interference of the ^{48}Ca isotope. Fortunately, in our experiment Ca is eluted at the void volume of the column, as can be seen in Fig. 3, where the ^{44}Ca isotope is also monitored, so Ti measurements should also be possible using ^{48}Ti . In fact, the trace of m/z 48 in Fig. 3 shows, together with the large peak at the void volume, a species at 7 min (negligible signal at m/z 44) which must be due to the binding of Ti to the same Tf form. Calculated isotope ratios in this chromatogram (as peak areas) are summarized in Table 2 and are compared with the theoretical values. There is good agreement even with the ^{48}Ti isotope. For this reason, Ti concentration calculations were conducted using both isotopes.

Ti species quantification in human serum of the patients with intramedullary nail implants was achieved by post-column IDA-ICP-MS. For this purpose, solutions containing either 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (for the quantifications using the ^{49}Ti

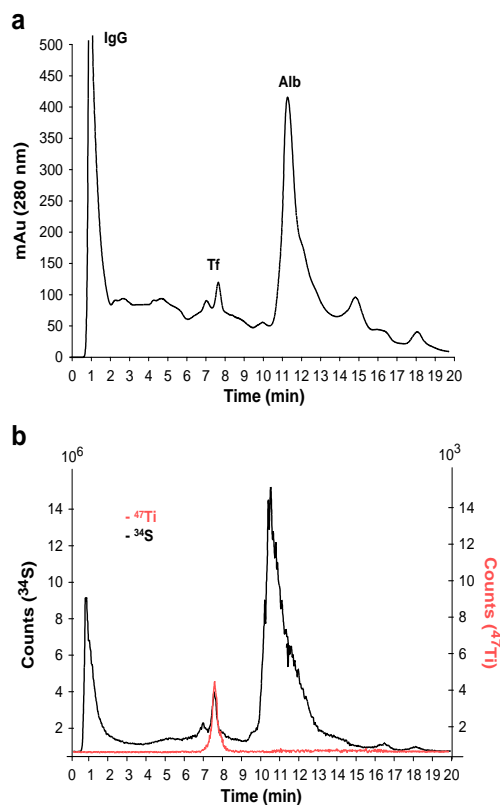


Fig. 2 Chromatographic profile of a serum sample from a patient with a T2 tibial nail using **a** UV detection (280 nm) of the proteins, immunoglobulin G (*IgG*), transferrin (*Tf*) and albumin (*Alb*) and **b** inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection monitoring ^{47}Ti and ^{34}S . The chromatographic conditions are detailed in the text

Titanium release in serum by intramedullary Ti nails

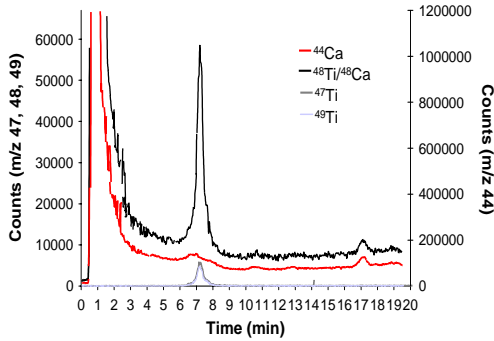


Fig. 3 Chromatographic profile of a serum sample from a patient obtained by ICP-MS detection monitoring ⁴⁷Ti, ⁴⁸Ti, ⁴⁹Ti and ⁴⁴Ca. The chromatographic conditions are detailed in the text

isotope) or 1.5 µg L⁻¹ (for the quantification using the ⁴⁸Ti isotope) of isotopically enriched Ti (⁴⁷Ti, 72.47%) were used. As commonly performed, these solutions were continuously pumped by an arm of a T-piece and mixed with the eluent coming from the chromatographic column, to quantify the Ti through ⁴⁹Ti and ⁴⁸Ti, respectively, as reported in previous publications [22]. After the isotope ratio has been calculated at each point of the chromatogram and the online isotope dilution equation has been applied, it is possible to calculate the total Ti bound to the different species in the chromatogram. In this case, the quantitative speciation results obtained for some of the analysed samples that exhibited higher Ti concentrations (from 4.2 to 10.7 µg L⁻¹) are shown in Table 3. These results reveal, first, that the Ti in serum is quantitatively bound to Tf and, second, that this binding (in vivo) is strong enough to be preserved during the chromatographic separation.

In the serum samples with low Ti content (below 2 µg L⁻¹) the speciation of Ti was achieved by using the same chromatographic system but after preconcentration of the serum proteins by filtration through 30-kDa cut-off membranes. One of the most important limitations of such preconcentration devices is the possible losses of proteins by adsorption into the ultracentrifugation membranes. Therefore, initial preconcentration studies were conducted using the certified reference material (Seronom trace elements serum level 1). The chromatogram obtained by this method to quantify the Ti through ⁴⁹Ti (by adding 0.1 µg L⁻¹ ⁴⁷Ti

Table 2 Calculated Ti isotope ratios (as peak area of the species eluted at 7 min) in the chromatogram in Fig. 3 are shown in comparison with the theoretical ratios

Ratio	Theoretical ratio	Experimental ratio (peak area)
⁴⁷ Ti/ ⁴⁸ Ti	0.1	0.09±0.02
⁴⁹ Ti/ ⁴⁷ Ti	0.76	0.78±0.03
⁴⁹ Ti/ ⁴⁸ Ti	0.08	0.07±0.01

Table 3 Ti concentrations obtained in the peak corresponding to the human serum transferrin [obtained by post-column isotope dilution analysis (IDA)] in comparison with the total Ti concentrations obtained in the serum by direct IDA

Samples	Ti (µg L ⁻¹) by postcolumn IDA	Concentration (µg L ⁻¹) by total determination
Patient 1	10.7±0.5	11.1±0.09
Patient 2	7.0±0.5	7.3±0.1
Patient 3	10.5±0.5	10.7±0.1
Patient 4*	4.2±0.4	4.1±0.2
Patient 5*	2.6±0.3	2.5±0.1
Patient 6	1.2±0.3	1.4±0.1
SRM ^a	1.6±0.3	1.4 (0.8–2)
SRM ^b	1.7±0.3	1.4 (0.8–2)

N=3 independent aliquots

*Preconcentrated samples

SRM standard reference material

^aUsing the isotopes ⁴⁹Ti and ⁴⁷Ti

^bUsing the isotopes ⁴⁸Ti and ⁴⁷Ti

spike) is shown in Fig. 4. The chromatogram in Fig. 4 reveals an adequate profile even at such low concentrations for both isotopes, with a remarkably low background signal. The preconcentration factor (approximately twofold) obtained by using the ultracentrifugation devices seems to be enough to achieve reliable and quantifiable signals with the HPLC-DF-ICP-MS system used.

In terms of the Ti found in the preconcentrated sample, the results obtained (shown in the case of using the ⁴⁹Ti and ⁴⁸Ti isotopes) are also summarized in Table 3. There is good agreement between the Ti concentration given by the manufacturer and the concentration of Ti found associated with Tf fractions. Since quantitative Ti recoveries are obtained after the whole treatment, there is no evidence of

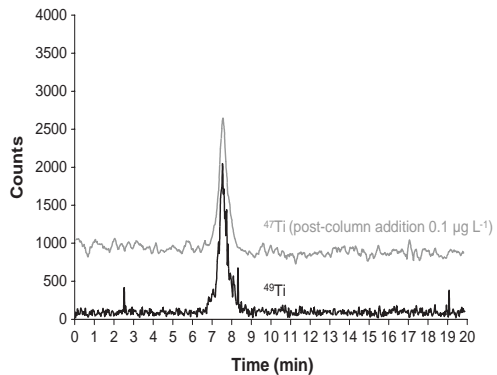


Fig. 4 Ti chromatographic profile obtained for a serum reference material (Seronom trace elements serum level 1) after preconcentration using ultracentrifugation devices by postcolumn isotope dilution analysis–high-resolution ICP-MS (postcolumn addition of 0.1 µg L⁻¹ ⁴⁷Ti)

the lability of the Ti–Tf complex in vivo. It must be stressed that the certified serum is supplied with the lipids removed, and to obtain good quantitative data this step must be conducted before the analysis to avoid problems in the ultracentrifugation step in samples with Ti levels below $2 \mu\text{g L}^{-1}$. The Ti concentration obtained in two samples using the preconcentration step is also shown in Table 3.

Finally, it is important to note that the unambiguous identification of Tf in the Ti-containing fraction was achieved by monitoring other trace elements that typically bind to Tf (e.g. Fe, data not shown) and by MALDI-TOF (as described in “Procedures”).

Conclusions

Quantitative strategies based on IDA for total Ti determination and speciation have been developed. The detection limits obtained with DF-ICP-MS have allowed the determination of total Ti in serum of control individuals, which was around $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (with low dispersion among samples). The simplicity of the method based on IDA and the accuracy and precision of the results obtained should encourage the use of the proposed strategy on a routine basis. The application of such a method to the determination of Ti in serum of patients with different types of bone fixation devices (intramedullary nails and external fixation) has shown significant differences among implant types and with respect to those of the controls. It seems that systemic dissemination of Ti ions is not limited to hip arthroplasty but also extends to other implants in vivo. This might be a reason of concern in the case of intramedullary nails, which are often used in younger patients.

The quantitative speciation of the Ti released by such intramedullary nails has been conducted in vivo, for the first time, without spiking the samples. It has been observed that Ti is uniquely bound to Tf in serum and that on the basis of anion-exchange chromatography this binding is stable under the separation conditions used. Thus, the postcolumn IDA strategy developed revealed quantitative Ti recoveries in the Tf fraction of the serum samples. Furthermore, the preconcentration method developed using ultracentrifugation devices has proved to be suitable for the quantitative speciation of serum samples with low Ti content. Even in the reference material (where the sample was treated for removal of lipids and freeze-dried) the results show that Ti is quantitatively bound to Tf and that

the binding is preserved during sample preparation (which is in agreement with the reported high stability constant of the Ti–Tf complex).

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the Regional Government of Asturias (FICYT) for financial support through the projects PC06-035 and PC10-27.

References

- Nicholson JW (2002) The chemistry of medical and dental materials. RSC monographs. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Lascombes P, Haumont T, Journeau P (2006) *J Ped Orthop* 26:827–834
- Jacobs JJ, Skipor AK, Urban RM, Galante JO (1991) *J Bone Joint Surg (Am)* 73:1475–1486
- Wang JC, Yu WD, Sandhu HS, Betts F, Bhuta S, Delamarter RB (1999) *Spine* 24:899–903
- Hjalmarsson L, Smedberg JI, W ennerberg A (2011) *J Oral Rehab* 38:61–71
- Keegan GM, Learmonth ID, Case CP (2007) *J Bone Joint Surg (Br)* 89B:567–573
- Brien WW, Salvati EA, Betts F, Bullough P, Wright T, Rimnac C, Buly R, Garvin K (1992) *Clin Orthop* 276:66–74
- Jacobs JJ, Skipor AK, Campbell PA, Hallab NJ, Urban RM, Amstutz HC (2004) *J Arthroplasty* 19:S59–S65
- Dustan E, Sanghrajka AP, Tilley S, Unwin P, Blunn G, Cannon SR, Briggs TWR (2005) *J Bone Joint Surg (Br)* 87:628–631
- Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G (2009) *J App Toxicol* 29:330–337
- Tinoco AD, Earnes EV, Valentine AM (2008) *J Am Chem Soc* 130:2262–2270
- Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz Jiménez J, Sanz-Medel A (2008) *Anal Bioanal Chem* 391:2583–2589
- Richardson TD, Pineda SJ, Strenge KB, Van Fleet TA, McGregor M, Milbrandt JC, Espinosa JA, Freitag P (2008) *Spine* 33:792–796
- Tinoco AD, Valentine AM (2005) *J Am Chem Soc* 127:11218–11219
- Guo M, Sun H, McArdle HJ, Gambling L, Sadler PJ (2000) *Biochemistry* 39:10023–10033
- Sariego Mu niz C, Marchante Gay on JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A (1999) *J Anal At Spectrom* 14:193–198
- Rottmann L, Heumann KG (1994) *Fresenius J Anal Chem* 350:221–227
- McGarry S, Morgan SJ, Grosskreuz RM, Williams AE, Smith WR (2008) *J Trauma* 64:430–433
- Patton MS, Lyon TDB, Ashcroft GP (2008) *Acta Orthop* 79:820–825
- Nuevo-Ordóñez Y, Montes-Bayón M, Blanco-González E, Paz-Jiménez J, Tejerina-Lobo JM, Pena-López M, Sanz-Medel A (2009) *J Anal At Spectrom* 24:1037–1043
- Sarmiento A, Marchante Gayon J, Ruiz Encinar J, Sanz-Medel A (2008) *Anal Chem* 80:8702–8711
- Del Castillo ME, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A (2006) *Anal Chem* 82:8218–8226

D.2.4 Artículo científico III: *Metallomics*. In press.

Metallomics

RSC Publishing **Metallomics**

**TITANIUM BINDING TO TRANSFERRIN IN HUMAN SERUM:
PREFERENTIAL BINDING SITES AND GLYCOSILATION
EFFECTS.**

Journal:	<i>Metallomics</i>
Manuscript ID:	MT-ART-07-2011-000109
Article Type:	Paper
Date Submitted by the Author:	20-Jul-2011
Complete List of Authors:	Nuevo Ordoñez, Yoana; University of Oviedo, Physical and Analytical Chemistry Montes-Bayon, Maria; University of Oviedo, Department of Physical and Analytical Chemistry Blanco González, Elisa; University of Oviedo, Physical and Analytical Chemistry Sanz-Medel, Alfredo; University of Chemistry

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

ABSTRACT

Serum transferrin (Tf) is an iron binding glycoprotein that plays a central role in the metabolism of this essential metal but it also binds other metal ions. Four main transferrin forms containing different iron binding states can be distinguished in serum samples: monoferric (C-site or N-site), holotransferrin (with two Fe atoms) and apotransferrin (with no metal). Recently, it has been reported that Tf binds also Ti even more tightly than does Fe in Ti(IV) spiked solutions. However, very limited work has been done on the Ti binding to Tf at physiological concentrations in patients carrying intramedullary Ti nails. Here we report the chemical association of Ti to Tf “in vivo” under different chromatographic conditions by elemental mass spectrometry using double focusing inductively coupled plasma (DF-ICP-MS) as detector. For the separation of the Ti/Fe-Tf forms different gradient conditions have been explored. The observed results reveal that human serum Ti (from patients carrying intramedullary Ti nails) is uniquely associated to the N-lobe of Tf. The investigation of the influence of sialic acid in the carbohydrate chain of human serum Tf, studied by incubating the protein with neuraminidase (sialidase) to obtain the monosialylated species revealed that the binding affinity of Ti was similar for monosialo-Tf and for native-Tf and occurs in the N-lobe. These results suggest that the species $\text{Fe}_C\text{Ti}_N\text{-Tf}$ might provide a route for Ti entry into cells via the transferrin receptors after the release of the metal from its implants.

Key-words: titanium, transferrin, binding states, serum, sialic acids, HPLC-DF-ICP-MS.

INTRODUCTION

Human serum transferrin (Tf) is a globular glycoprotein containing two lobes for metal binding, at the N-lobe and C-lobe respectively. This protein coordinates metal ions typically in a pseudo octahedral geometry with one aspartate, one histidine and two tyrosinate residues and a bidentate synergistic anion (usually bicarbonate).¹ Iron(III) is the principal metal ion transported by Tf in human serum.² However, the relative concentration of Fe (about $1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in respect to the total Tf concentration (3 mg mL^{-1}) in this biological fluid is low, and therefore, under normal conditions Fe does not fully load all the metal binding sites of the protein. In other words, about 65% of Tf sites are still available for metal binding. Thus, other metal ions can be also associated to Tf in human serum with different stability constants that depend on the type of metal and on the synergistic anion.³ Elements such as aluminium(III), vanadium(III) and (IV),⁴ manganese(II)⁵ and more recently titanium(IV)⁶ have proved to bind to serum Tf. In fact, recent publications reported a strong interaction between Ti(IV) and Tf with even higher stability constant than Fe(III) and Tf ($\log K$ 26 versus 21).^{7,8} Furthermore, our recent quantitative speciation studies corroborate that when Ti is present in serum as consequence of metal wear from Ti implants, this metal is uniquely associated to Tf.⁹

Despite the fact that the amino acid sequence of the two lobes for metal binding in Tf is very similar, the affinity of the different metal ions for each of them does not seem to be identical.¹⁰ Thus, Maitani et al.¹¹ reported that the preferential binding site of Fe(III) and Al(III) is the N-lobe, in the presence of bicarbonate as the synergistic anion. The same authors showed that V(III) seems to be present as $V_C\text{-Tf}$ and as $V_2\text{-Tf}$.¹² Regarding the Ti binding sites, the results obtained so far are not conclusive. Experiments conducted in spiked solutions revealed different preferential binding sites depending on the Ti source (as titanocene or as Ti citrate complex).⁷ The study of the Ti

binding sites in Tf conducted in vitro by two-dimensional [^1H , ^{13}C] NMR and using titanocenes as Ti source showed that Ti(IV) loads the C-lobe first, followed by the N-lobe, and exhibits binding to specific Fe(III) sites, yielding to Tf conformational changes similar to those induced by Fe(III).¹³ Moreover, Fe(III) has been found to displace Ti(IV) rapidly from the C-lobe of $\text{Ti}_2\text{-Tf}$ (<5 min) but only slowly (days) from the N-lobe. Contradictorily, the loading of Tf with an in situ generated Ti(IV) citrate complex show that the C-lobe binds Ti(IV) more tightly than the N-lobe.⁷ In any case, very little is known about chemical features of the Ti association to the different Tf lobes in normal human serum. One of the intrinsic difficulties associated with that study is the low concentration of this element in real serum samples (<0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ in control individuals and up to 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ in exposed patients).⁹ Considering those extremely low Ti concentration levels, the formation of $\text{Ti}_2\text{-Tf}$ is very unlikely to occur under physiological conditions and, therefore, spiking experiments carried out so far seem to be inadequate for real life quantitative speciation studies of this element.

On the other hand, Tf is a glycoprotein that presents heterogeneity in terms of the N-glycans composition located in the C-terminal lobe. Such glycans form antennary structures composed by mannose, galactose, N-acetylglucosamine and terminated with N-acetyl neuraminic acid, also called sialic acid. The structures of Tf in human serum of healthy individuals are classified regarding the content on sialic acids molecules. Thus, 75% of the Tf present in serum is in the form of tetrasialo Tf, 15% as pentasialo and 5% as trisialo. Some authors have postulated that the presence of the glycan structures might affect the metal binding efficiency, particularly in the case of Fe.¹⁴ However, our recent experiments revealed that all the Tf sialoforms in human serum are saturated with Fe at the same extent ($28 \pm 4\%$).¹⁵ Thus it appears that, the glycans structure seems to

play a minor role in the interaction of Fe with Tf. However, this does not seem to be the case with other metals (e.g. Al).¹⁶

Thus, the aim of this work was to try to study in more detail the chemical association of Ti to Tf lobes in unspiked serum samples from patients carrying Ti metallic implants (to compare results with those of the corresponding Fe profiles). Considering that $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ is the species that binds to the cellular receptors and iron binds tightly to the N-lobe (with the accompanying closure of the cleft), it could be possible that Ti replaces Fe from the C-lobe (which remains in the open conformation) or even displaces Fe from the N-lobe. Thus, the formation of species like $\text{Fe}_\text{N}\text{Ti}_\text{C}\text{-Tf}$ or $\text{Fe}_\text{C}\text{Ti}_\text{N}\text{-Tf}$ could be a likely route for Ti(IV) entering the cells via Tf receptors.¹⁷ This factor can be of major importance, considering that the presence of Ti inside the cell might induce oxidative stress and could interrupt important phosphorylation cascades (due to its binding with the phosphate groups in proteins).¹⁸

EXPERIMENTAL

Instrumentation.

A double focusing-sector field ICP-MS (DF-ICP-MS) instrument, ELEMENT II (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) was used. The instrument was equipped with a Meinhard concentric glass nebuliser and with nickel sampler and skimmer cones.

For separation of the human serum proteins, a high performance liquid chromatography (HPLC) set-up was used consisting of a dual piston HPLC pump (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan) and a sampler injection valve, Rheodyne, Model 7125 (Cotati, CA, USA) fitted with a 50 μL loop. Separations of human serum proteins were performed on an anion exchange column Mono Q HR 5/50 GL (Pharmacia, GE Healthcare, Spain).

The identification of the isolated proteins was conducted using a MALDI-TOF-MS system. The instrument used in the study was a Voyager-DETM STR Biospectrometry Workstation (Applied Bio-systems, Langen, Germany) equipped with a nitrogen pulsed laser (337 nm) and operating in positive mode. Sample preparation for MALDI-TOF-MS measurements was performed on a stainless steel hydrophobic target (Voyager 96 × 2 sample plate P/N V700813) using the dried droplet technique.

Reagents, Materials and Samples

Human serum transferrin (Tf) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water (18.2 MΩ cm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Acetonitrile was of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany). Acetic and formic acids were of analytical reagent grade quality from Merck.

Mobile phases for HPLC containing (A) 0.050 mM tris(hydroxymethyl) amino methane/acetic acid (Merck), pH 7.4 and (B) A + 0.250 M ammonium acetate (Merck) were prepared by dilution of the solid salts with the 18 MΩ cm distilled deionized water (Millipore, Bedford, MA). Serum samples from control individual and patients carrying artificial Ti nails were provided by the University Hospital of Asturias. Total Ti was first determined in the samples by Isotope Dilution Analysis using a DC-ICP-MS. Total Ti was first determined in the samples by isotope dilution ICP-MS as described elsewhere. In brief, 600 μL of serum were mixed with 30 μL of the spike solution (11.5 ng mL⁻¹ isotopically enriched ⁴⁷Ti) and diluted to a final volume of 3 mL with ultrapure water for further quantification. Proteomics Grade α (2→3, 6, 8) neuraminidase from *Clostridium perfringens* (N2876-10U) was purchased from Sigma-Aldrich.

Sample preparation for MALDI-TOF measurements was performed on a stainless steel hydrophobic target using the dried-droplet technique. For that, an aliquot

(0.5 μL) of the sample solution and an equal aliquot of the matrix solution were mixed on the target in the given order and dried at room temperature. The matrix solution used was prepared by dissolving 5 mg of sinapinic acid (Sigma) in 1 mL of 30% acetonitrile, 0.1% TFA. Experimental conditions are given in Table 1.

Procedures

Removal of sialic acids.

Neuraminidase is a highly purified enzyme from *Arthrobacter ureafaciens* that releases $\alpha(2\rightarrow3)$, $\alpha(2\rightarrow6)$, $\alpha(2\rightarrow8)$ and $\alpha(2\rightarrow9)$ linked sialic acids. A standard of apo-human serum Tf (3 mg) was prepared in the reaction buffer (50 mM sodium phosphate, pH 6.0, 3 mL). In the case of serum 500 μL of sample, either from control individuals or from patients carrying Ti nails were diluted in the reaction buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0, 500 μL), mixed with neuraminidase solution (0.1U) and incubated for 24h at 37°C. The aliquots were desalted by using a membrane of dialysis (3 KDa) against Milli Q 1h at room temperature. Finally, they were analysed by HPLC with UV detection at 280 nm.

Iron saturation.

For iron loading of transferrin, 3 mg of the Tf standard was diluted in 1 mL of 25 mM Tris-acetic acid buffer (pH 7.4) and incubated with 25 μL of different concentration Fe(III) solutions (as FeCl_3) and 25 μL of a 500 mM sodium bicarbonate solution for 1h at room temperature. Aliquots of the apo Tf standard (1 mg mL^{-1}), after sialic acid removal, were also incubated with different concentrations of Fe(III) following the same procedure. Such samples loaded with iron were subsequently filtered through 0.22 μm syringe filters and injected in the HPLC system.

RESULTS AND DISCUSSION

Fe and Ti chromatographic profiles in serum under different conditions

In order to address the question of the presence of Ti in particular lobe of Tf at physiological conditions, a first series of experiments were conducted. We first investigated the separation of the Tf forms at different Fe loading concentrations in a standard solution and then in real human serum. For this purpose, we used previously optimized chromatographic conditions⁹. Figure 1 shows the obtained result corresponding to a standard of human serum Tf (3 mg mL^{-1}) with two different Fe concentrations added (no addition, $1.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ and $14 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) by HPLC-ICP-MS monitoring ^{34}S from the protein (Fig. 1A) and ^{57}Fe (Fig. 1B). In both figures, the two main species that can be distinguished elute at 6.8 and 7.5 min respectively and change their relative intensities upon Fe addition. In view of these results, we can conclude that the apo-form (free of Fe) elutes at 7.5 minutes while the species with two Fe atoms, also called holo-Tf comes out at 6.8 min, in agreement with the change on the isoelectric point observed upon Fe saturation. Similar results were obtained in serum upon saturation with Fe. But for the monoferric forms (with the metal either in the N-lobe or in the C-lobe) neither of different sialoforms of Tf can be separated under the current chromatographic conditions.

The separation of the serum proteins from a control individual and from a patient carrying an intramedullary femoral fixation nail revealed similar results, as can be seen in Figure 2. In this case, the chromatographic profiles for ^{34}S , ^{57}Fe and ^{47}Ti are depicted in two columns corresponding to the control (left panel) and the patient (right panel). As can be seen, Fe elutes in both cases at 6.8 and at 7.5 minutes respectively as in the case of the standard of Fig. 1 when is partially saturated (at 1 mg mL^{-1} Fe). Additionally, a small peak at about 10 minutes is due to some Fe carried by albumin. The titanium trace

from the serum sample of the patient (containing 6.8 ng mL^{-1} Ti) revealed a single signal at about 7.5 minutes coeluting with the Fe and S traces. Similarly, the sample from the control individual (0.5 ng mL^{-1} Ti) showed a chromatographic peak at 7.5 minutes with much lower intensity but at the same retention time, confirming the presence of Ti in the transferrin fraction.

However, under these chromatographic conditions it is not possible to address the retention time of the different mono-metallated species (C- or N-) since the differences in the isoelectric points with respect to the apo- and saturated forms are too small. Therefore, the gradient and the mobile phases were modified according to Maitani et al.¹¹ to achieve the separation of four Tf species using the same chromatographic column. The new buffer and the new gradient used (Gradient 2) are given in Table 1. According to the pI values for tetrasialo Tf with different Fe content, the elution order should be holo<Fe-C<Fe-N<Apo in agreement to their migration by isoelectric focusing. However, some authors have reported¹⁹ that possible conformational changes occur due to metal binding that might affect the protein surface charge and therefore, affect the elution profile in anion exchange chromatography. Thus, by using the elution gradient 2 it was possible to obtain the chromatographic profiles for S, Fe and Ti in serum that can be seen in Figure 3.

By comparison with previously published results¹¹, the four peaks in Fig. 3 were assigned to the following species, Fe_C-Tf (34.5 min), Fe₂-Tf (40 min), apo-Tf (54 min) and Fe_N-Tf (61 min). In terms of species abundance, the apo-Tf seems to be the most abundant species followed by the Fe_C-Tf and Fe_N-Tf, with similar abundances in respect to each other (in S and in Fe). The less abundant form of all is the Fe₂-Tf (40 min), whose ratio S/Fe confirms its holo-structure. The small Fe peaks at 15 and 67 min were ascribed to Fe bound to individual sialoforms of Tf with smaller and larger number of

sialic acid molecules (this will be discussed in the following section). It is noteworthy (see Fig. 3) that Ti elutes in a single peak at similar retention time (60.5 min) as $\text{Fe}_N\text{-Tf}$, so this species should be $\text{Ti}_N\text{-Tf}$. The slight shift in the observed retention time of Ti in respect to Fe could be rationalized considering small conformational changes on the $\text{metal}_N\text{-Tf}$ species with Fe(III) with respect to the corresponding species with Ti (most likely Ti(IV)). None of the other Tf peaks showed any associated Ti. Thus, the preferential binding site of Ti in Tf seems to be the N-lobe, as in the case of V(IV) and Al(III).⁴ These results might indicate that the final species, present in serum coming from Ti wear from implants that finally binds to Tf is not a Ti citrate complex previously formed in serum, due to the relatively high concentration of the citrate plasma (approx 19 mg/L), that is reported to be stable in vitro at pH 6-9.7. Since the in vitro experiments revealed that Ti binding constant to Tf is higher in the C-lobe using Ti-citrate for Ti delivery and we have not detected any Ti in the C-lobe, we have concluded that the complex with citrate might not be the way of delivery in serum. It is noteworthy at this point to stress that the measured column recovery for both, Ti and Fe, has proved to be above 95%, a very important aspect looking for quantitative speciation purposes.

Effect of the sialic acid residues

The heterogeneity in the carbohydrate content of transferrin is used as an indicator for diagnosis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes and for chronic alcohol consumption.²⁰ However, in the case of studying preferential metal binding sites, the presence of carbohydrate variations can be relatively small since the most abundant species (>75%) is the so-called tetrasialo transferrin. In any case, the existence of carboxylic acids in sialic acid molecules may influence protein conformation and

change the binding affinity of metals, thereby influencing the principal function of Tf. Therefore, we investigated whether the presence of sialic acids affected the binding of Ti to Tf. For this purpose, sialic acid removal was done by incubation of the sample (a Tf standard and the serum samples) with the enzyme neuraminidase as described in the procedures section. Figure 4 shows the results obtained by HPLC-UV-VIS (280 nm) of a standard of apo-Tf before and after treatment with neuraminidase (Fig. 4A). As can be seen, there is a shift on the retention time (from 7.5 to 5 minutes) due to the removal of the sialic acids, as this fact reduces the negative charge of the protein. The MALDI-TOF analysis of both species is shown in Figure 4B where it is possible to see the mass difference (Δm 929) of the Tf standard before (m/z 79566) and after treatment (m/z 78637) with the enzyme. This corresponds to the loss of three sialic acids (m/z 292 each one) from the Tf molecule. This confirms, as previously reported,^{21,14} that under the reaction conditions used here it is not possible to remove completely the four sialic acids and the resulting molecule corresponds to the monosialilated form (theoretical m/z 78697).

Saturation experiments with Fe of this monoasialo-Tf molecule were investigated by HPLC-ICP-MS again using Gradient 1. Upon Fe addition, the ³⁴S trace of monosialo transferrin (1 mg mL^{-1}) eluting at 5 minutes gradually decreases while a new species eluting at 2 minutes increases proportionally (Figure 5A). At saturation conditions (14 mg mL^{-1} Fe), the signal at 5 minutes is almost negligible while only the species eluting at 2 minutes can be observed (similar results were obtained by Fe monitoring, data not shown). Thus, by following the elution order of Fig. 3, holo (Fe_2 -monosialo-Tf) and Fe_C -monosialo-Tf are eluting in the peak at 2 minutes while the apo-form and the Fe_N -monosialo-Tf come out at about 5 minutes (see the slight time shift between the apo- and the semi-saturated species due to differences in the charge).

The removal of the sialic acids was also conducted in a real life serum sample from a patient (Ti concentration above 5 ng mL^{-1}). The obtained chromatographic profile can be observed in Figure 5B. Also, Ti, Fe and S coelute in the fraction between 4 and 6 min (ascribed to the metal_N-monosialo-Tf) but with a small shift in the Ti retention profile with respect to the Fe one. This slight shift could be explained in light of ternary complex formation: if Ti is present in serum as a charged complex (e.g. HTiO_3^- which is known to be soluble at alkaline pH values) once bound to Tf it would reduce the charge of the whole Ti-Tf complex increasing the retention time observed in the anion exchanger in respect to Fe(III). In fact, similar shifts have been observed in the case of V(IV) and have been ascribed to the presence of this metal in the form of vanadyl ions (VO^{2+}) providing a more negative charge of the complex than the corresponding complex with V(III).⁴

In any case, the association of Ti to the N-lobe of Tf in unspiked serum samples seems to be confirmed by these results in agreement to previously published data conducted by adding Ti as titanocene.¹³ Those authors revealed an initial Ti association to the C-lobe but prone to be displaced by Fe, but the most stable species was Ti (most likely in the +4 charge) bound to Tf into the N-lobe, as we have detected *in vivo*. Thus, the species $\text{Fe}_C\text{Ti}_N\text{-TF}$ might provide a route for Ti transport and entry into cells via the transferring receptors.

CONCLUSIONS

Our studies here corroborate our initial findings that Ti is uniquely associated to Tf in human serum at physiological levels in implanted individuals.⁹ Moreover, such binding is stable under our chromatographic conditions using an anion exchange chromatography before ICP-MS initial detection. Additionally, by using adequate

conditions the presence of Ti in the N-lobe of Tf could be assessed in agreement with previous results reporting the formation of a more stable structure with Ti in this metal site of the protein. Our HPLC-ICP-MS speciation experiments reveal some shift in the retention time between Ti and Fe complexes of the N-lobe in desialidated. Such a finding indicates that the coordination sphere of the two species might be different. It appears that Ti might be present in a more charged anionic species (e.g. HTiO_3^- which is known to be soluble at physiological pH) since it shows slightly larger retention times. Considering the current importance of using Ti for implants further experiments to identify the structure of the species can be anticipated. This is particular relevant since Ti is expected to be released from metallic implants as TiO_2 , as reported by other authors.²²

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to gratefully acknowledge the Regional Government of Asturias (FICYT) for financial support through the projects PC06-035 and PC10-27.

REFERENCES

- ¹ Gumerov, D.R., Mason, A.B., Kaltashov, I.A. *Biochemistry* **2003**, 42, 5421-5428.
- ² P. F. Lindley, in *Handbook of Metalloproteins*, ed. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos and K. Weighardt, Wiley, Chichester, **2001**, vol. 2, pp. 793-811.
- ³ Li, H., Sadler, P.J., Sun, H., *Eur. J. Biochem.*, **1996**, 242, 387-393.
- ⁴ Nagaoka, M. H., Yamazaki, T., Maitani, T. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **2002**, 296, 1207-1214.
- ⁵ Nuevo Ordoñez, Y., Montes-Bayon, M., Blanco-Gonzalez, E., Paz-Jimenez, J., Tejerina-Lobo, J. M., Peña-Lopez, J. M., Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2009**, 24, 1037-1043.
- ⁶ Tinoco A.D., Earnes, E. V., Valentine A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 2262-2270.

-
- ⁷ Tinoco A.D., Valentine A.M. (2005) *J Am Chem Soc* 127: 11218-19.
- ⁸ Sarmiento A., Marchante Gayon J., Ruiz Encinar J., Sanz-Medel A., *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8702-11
- ⁹ Nuevo-Ordóñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Paz-Aparicio, J., Diáñez Raimundez, J Tejerina, J.M., Peña M. A., Sanz-Medel, A., *Anal- Bioanal. Chem.*, in press.
- ¹⁰ MacGillivray, R.T., Mendez, E., Shewale, J. G., Sinha, S.K., Lineback-Zins, J., Brew, K. J. *Biol. Chem.*, **1983**, 258, 3543-3553.
- ¹¹ Nagaoka, M. H., Maitani, T. *Analyst*, **2000**, 125, 1962-1965.
- ¹² Nagaoka, M. H., Akiyama, H. and Maitani, T., *Analyst*, **2004**, 129, 51-54.
- ¹³ Guo, M., Sun, H., McArdle, H.J., Gambling, L. and Sadler, P. J., *Biochemistry*, **2000**, 39, 10023-10033.
- ¹⁴ Van Campenhout, A., Van Campenhout, C., Lagrou, A. R., Manuel-Y-Keenoy, B., *Clinical Chemistry*, **2004**, 50, 1640-1649.
- ¹⁵ Del Castillo, E., Montes-Bayón, M., Bettmer, J., Sanz-Medel, A. *Analyst*, **2008**, 133, 379-384.
- ¹⁶ Nagaoka, M. H., Maitani, T. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 1887-1894.
- ¹⁷ Zak, O., Trinder, D. and Aisen, P. J. *Biol. Chem.*, **1994**, 269, 7110-7114
- ¹⁸ Xue, C., Wu, J., Lan, F., Liu, W., Yang, X., Zeng, F., Xu, H., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2010**, 10, 8500-8507.
- ¹⁹ Harada, K., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Nakayama, M., Matsunaga, T., Uji, Y., Sugiuchi, H., Okabe, H., *J. Chrom. B*, **2002**, 767, 45-51.
- ²⁰ Helander, A., Bergstrom, J., Freeze, H. H. *Clin. Chem.*, **2004**, 50, 954-958.
- ²¹ Del Castillo, E., Montes-Bayón, M., Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, **2006**,
- ²² Keegan, G.M., Learmonth, I.D., Case C.P., *J Bone J Surg (Br)*, **2007**, 89-B:567-73.

Table 1. Instrumental operating conditions for HPLC separation of transferrin forms.

<i>HPLC conditions</i>		
Column	Mono Q HR 5/5 (5 mm id, 10 mm particle size)	
Inyector loop	50 μ L	
Flow rate	1 mL min ⁻¹	
Gradient 1	time (min)	B%
	0	0
	15	50
Gradient 2	time (min)	B%
	0	0
	7	12
	20	12
	40	22
	55	22
	60	40
	70	60
75	100	
Buffers	Gradient 1	
	A) 0.005 M Tris-acetic acid (pH 7.4) B) A + 1.5 M ammonium acetate (pH 7.4)	
	Gradient 2	
	A) 0.005 M Tris-acetic acid (pH 7.4) B) A + 0.25 M ammonium acetate (pH 7.4)	
<i>DC-ICP-MS conditions</i>		
Instrument	Thermo Element 2	
Forward Power	1350	
Resolving power (m/ Δ m)	4000	
Isotopes measured	⁴⁷ Ti, ⁴⁸ Ti, ⁴⁹ Ti, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ³² S, ³⁴ S	
<i>MALDI-TOF conditions</i>		
Instrument	Voyager-DETM STR Biospectrometry	
Scan type	Positive	
Instrument mode	Lineal	
External calibration	Bovine serum albimin + Transferrin (1 mg mL ⁻¹)	
Matrix	Sinapinic acid	
Acelerating voltage	25000V	
Laser	2700V	
Shoots by spectrum	100	
Scan range (m/z)	20000-100000	

Figure Captions

Figure 1. Separation of a standard of human serum transferrin (3 mg mL^{-1}) (grey trace) and the same standard incubated with different Fe(III) solutions containing $1.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (black trace) and $14 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Fe (red trace) respectively by HPLC-DF-ICP-MS monitoring ^{34}S (panel A) and ^{57}Fe (panel B). Black and red traces are off-axis for clarity

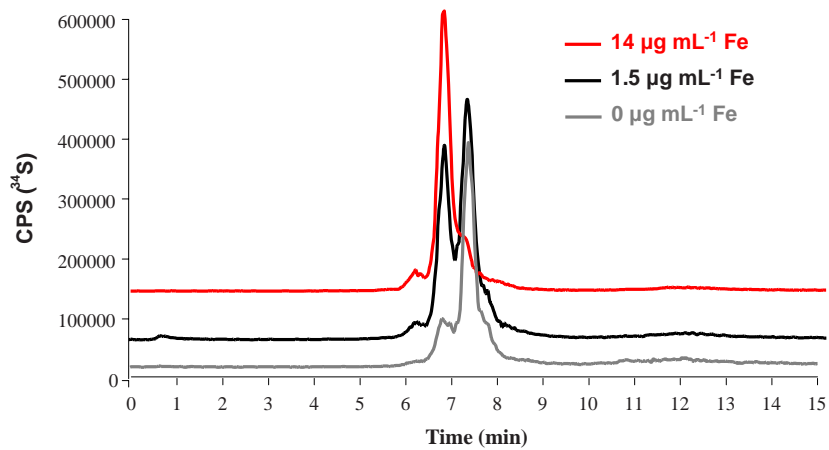
Figure 2. Chromatographic profiles of sulphur (red trace), iron (black trace) and titanium (blue trace) of two serum samples from a control individual (panel A) and from a patient carrying Ti a Ti intramedullary nail (panel B) obtained with the chromatographic conditions of gradient 1 (see Table 1).

Figure 3. Chromatographic profiles obtained by HPLC-DF-ICP-MS of sulphur (red trace), iron (black trace) and titanium (blue trace) of a serum sample from a patient carrying a Ti intramedullary nail obtained with the chromatographic conditions of gradient 2 (see Table 1).

Figure 4. Evaluation of the procedure for sialic acid removal of a standard of human serum transferrin (1 mg mL^{-1}) by monitoring the apo-protein before and after treatment using (A) HPLC-UV (280 nm) and (B) MALDI-TOF (in grey the oligosaccharide chain structures with □ N-acetyl glucosamine, ○ mannose, ■ galactose, ◇, sialic acid).

Figure 5. Chromatographic profiles obtained by HPLC-DF-ICP-MS of (A) a standard of human serum transferrin (1 mg mL^{-1}) after desialidation and further incubation with different solutions containing no Fe (grey trace), $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (black trace) and $14 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ Fe (red trace) respectively monitoring ^{34}S and (B) a desialidated serum sample of a patient carrying Ti intramedullary nail showing sulphur (red trace, off axis for clarity), iron (black trace) and titanium (blue trace).

A)



B)

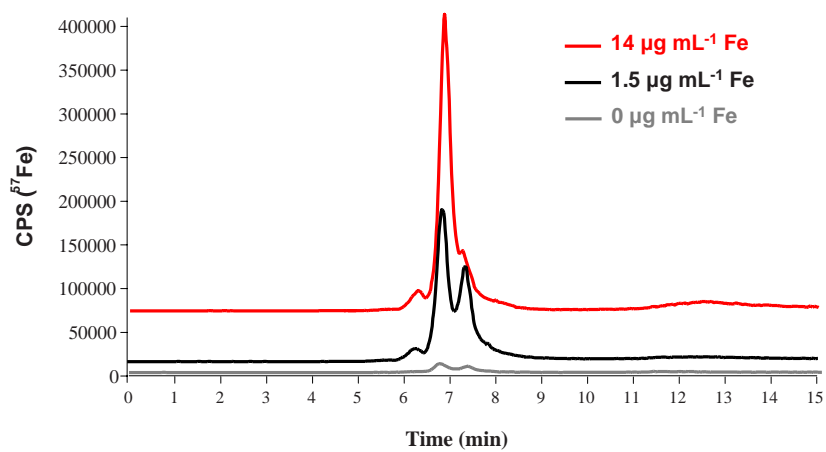


Figure 1

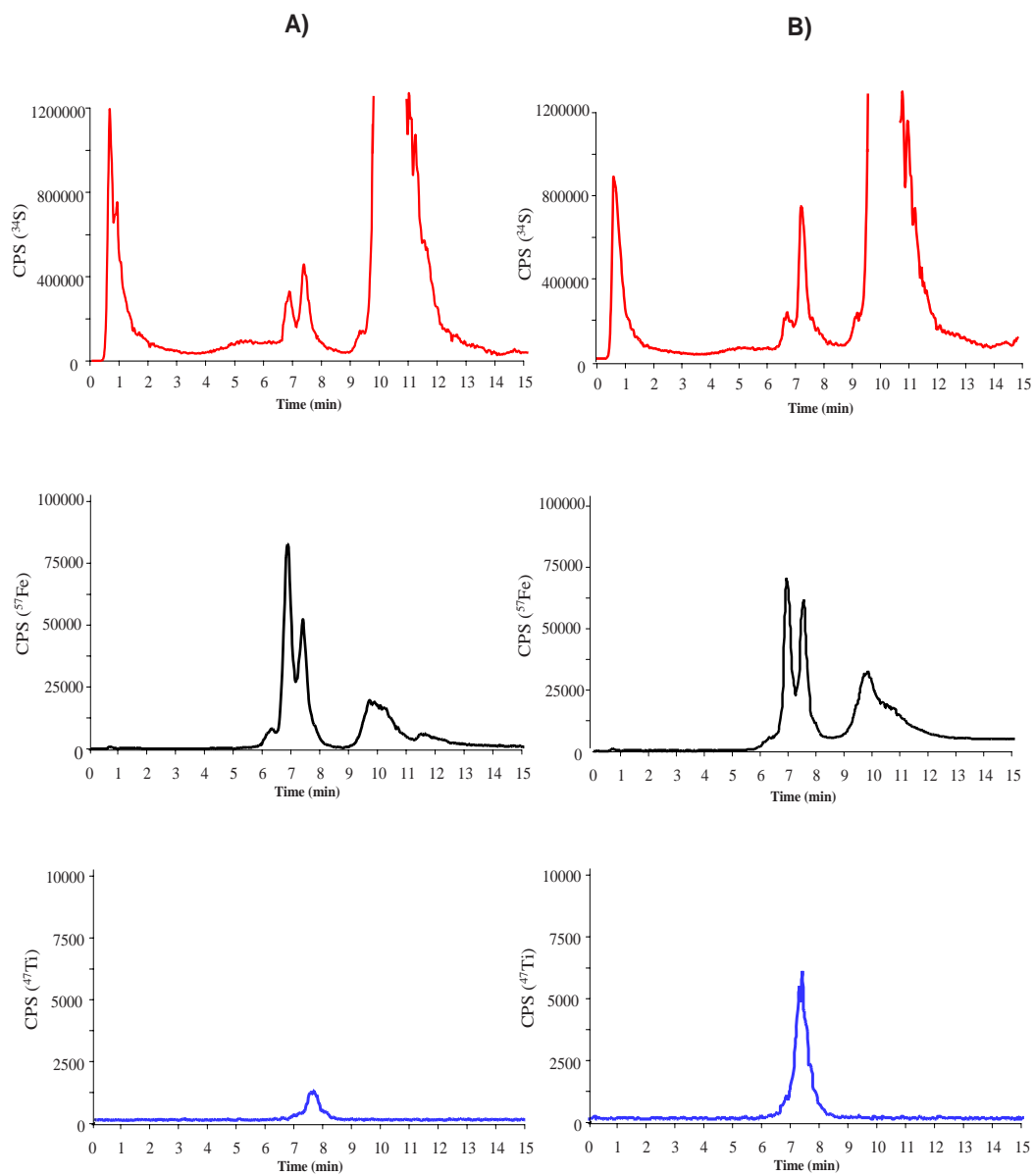


Figure 2

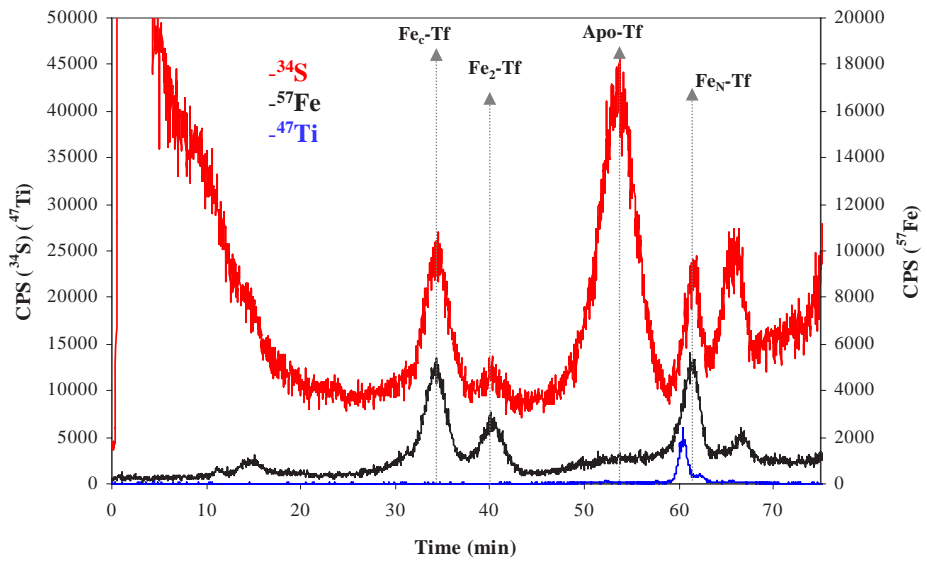
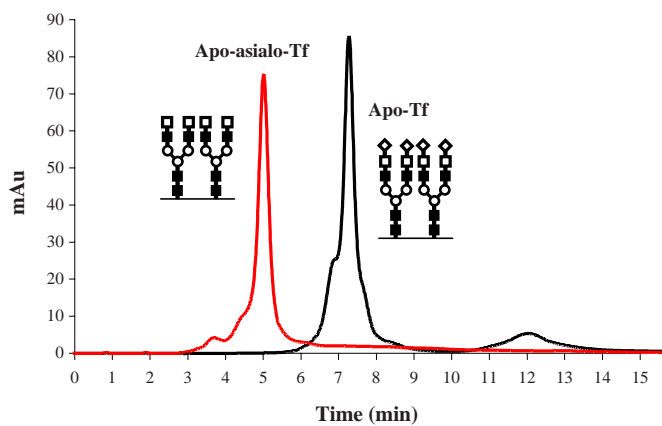


Figure 3

A)



B)

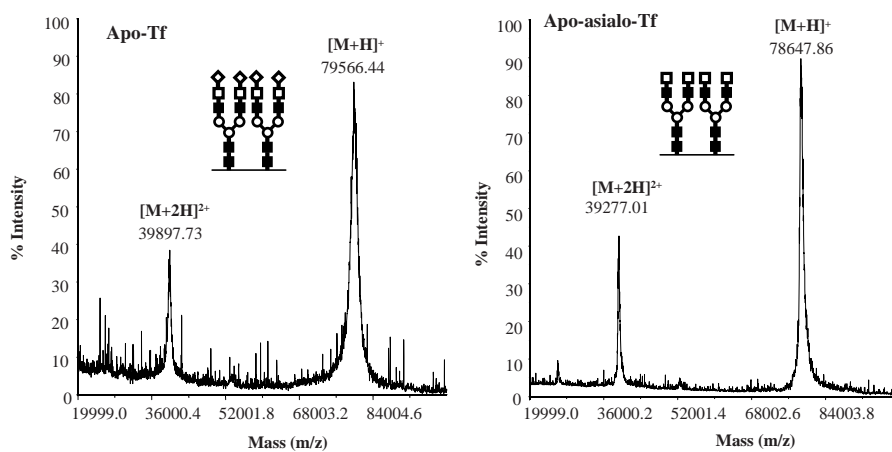
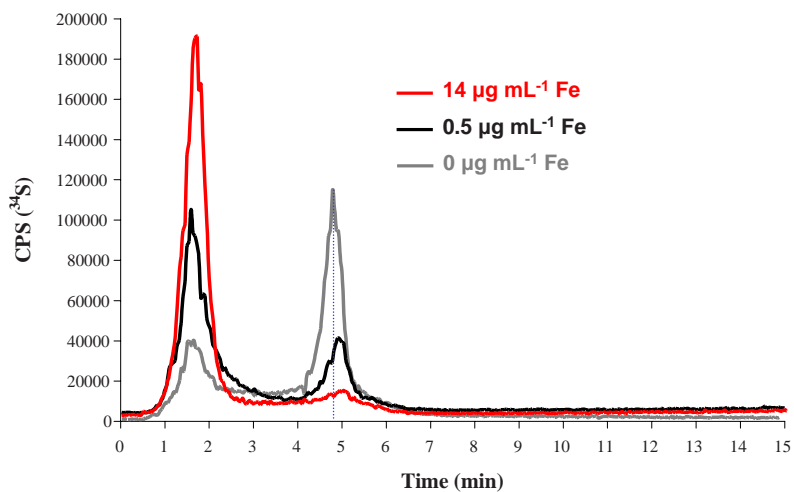


Figure 4

A)



B)

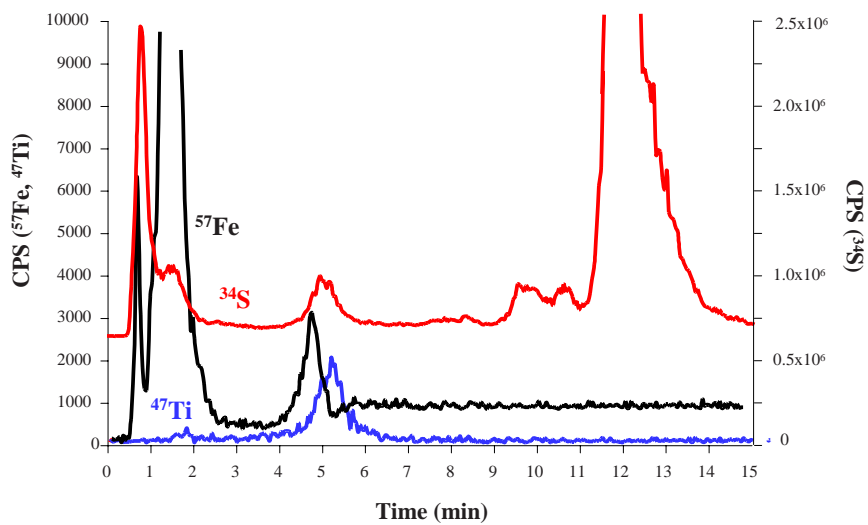


Figure 5

D.2.5 Referencias

- [1] M. Maier. *Elastic stable intramedullary nailing of femur fractures in children*. Oper. Orthop. Traumatol. 20 (2008) 364-372.
- [2] N. Charles y M.D. Cornell. *Internal Fracture Fixation in Patients with osteoporosis*. J. Am. Aca. Orthop. Surg. 11 (2003) 109-119.
- [3] E.J. Nelly. *Electrochemical behavior of titanium*. Mod. Aspect. Electrochem. 14 (1982) 319-424
- [4] R.L. Buly, M.H. Huo, E. Salvati, W. Brien y M. Bansal. *Titanium wear debris in failed cemented total hip arthroplasty. An analysis of 71 cases*. J. Arthroplasty. 7 (1992) 315-323.
- [5] T. Hanawa. *Metal ion release from metal implants*. Mater. Sci. Eng. 24 (2004) 745-752.
- [6] A.D. Tinoco, E.V. Eames y A.M. Valentine. *Reconsideration of Serum Ti (IV) transport: albumin and transferrin trafficking of Ti (IV) and its complexes*. J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 2262-70.
- [7] J.J. Jacobs, C. Silverton y N.J. Hallab. *Metal release and excretion from cementless titanium alloy total knee replacements*. Clin. Orthop. 358 (1999) 173-180.
- [8] A. Sarmiento-González, J.Ruiz Encinar, A. M Cantarero-Roldán, J.M. Marchante-Gayón y A. Sanz-Medel. *HPLC-ICP-MS and stable isotope labeled approaches to assess quantitatively Ti (IV) uptake by transferrin in human blood serum*. Anal. Chem. 80 (2008) 8702-11
- [9] A.D. Tinoco y A.M. Valentine. *Ti (IV) Binds to Human Serum Transferrin More Tightly Than Does Fe (III)*. J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 11218-11219.
- [10] S. Bailey, R.W. Evans, R.C. Garratt, B. Gorinsky, S. Hasnain, C. Horsburgh, H. Jhoti, P.F. Lindley, A. Mydin, R. Sarra y J.L. Watson. *Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution*. Biochemistry. 27 (1988) 5804-5812.
- [11] S. Caroli, A. Alimoni, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte y N. Violane. *The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review*. Crit. Rev. Anal. Chem. 24 (1994) 363-398.
- [12] A.A. Moshtaghi, M. Ani y M.R. Bazrafshan. *Comparative binding study of aluminium and chromium to human transferrin*. Biol. Trace Element. Res. 32 (1992) 39-46.
- [13] R. Ge y H. Sun. *Bioinorganic chemistry of bismuth and antimony: Target sites of metallo drugs*. Acc. Chem. Res. 40 (2007) 267-274.
- [14] W.R. Harris y V.L. Pecararo. *Thermodynamic binding constant for gallium transferrin*. Biochemistry. 22 (1983) 292-299.
- [15] W.R Harris y L. Messori. *Comparative study of aluminium (III), gallium (III), indium (III) and thallium (III) binding to human serum transferrin*. Coord. Chem. Rev. 228 (2002) 237-262.
- [16] G. De Jong y H.G. Van Eijk. *Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients*. Electrophoresis. 9 (1988) 589-598.

- [17] J. M. Lacey, H. R. Bergen, M.J. Magera, S. Naylor y J. F. O'Brien. *Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry*. Clin. Chem. 47 (2001) 513-518.
- [18] M.E. Del Castillo-Busto, J. Mejía, M. Montes-Bayón y A. Sanz-Medel. *Diophantine analysis complements electrospray-Q-TOF data for structure elucidation of transferrin glycoforms used for clinical diagnosis in human serum and cerebrospinal fluid*. Proteomics. 9 (2009) 1109-1113.

D.3 EFECTOS DE LOS METALES LIBERADOS POR LOS IMPLANTES EN EL ORGANISMO: CAMBIOS EN LOS NIVELES DE Cu,Zn-SOD COMO RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO.

Artículo científico IV: *Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in red blood cells by HPLC-ICP-MS.* **Analytical Chemistry.** 82 (2010) 2387-2394.

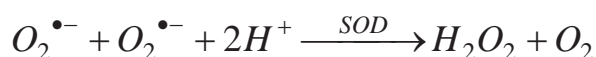
Artículo científico V: *Species Specific isotope dilution versus internal standardization strategies for the accurate determination of Cu,Zn-Superoxide Dismutase in red blood cells.* **Journal of Analytical Atomic Spectrometry.** 26 (2011) 150-155.

D.3.1 Introducción

Una vez que el implante es introducido en el organismo vivo, será inmediatamente reconocido por el sistema inmunológico como un agente extraño, propiciando que los macrófagos se adhieran a la superficie del material [1] y generando algunos tipos de especies reactivas de oxígeno [2]. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas o fragmentos moleculares altamente reactivos, debido en la mayoría de los casos a que poseen uno o más electrones desapareados. Entre ellas, se puede considerar que el *radical anión superóxido* y los productos que derivan de él (el radical hidroxilo, los peróxidos, etc.), pueden iniciar una cadena de reacciones que den lugar a daños celulares tan importantes como la oxidación; de las bases del DNA, de los aminoácidos de las proteínas, de las membranas lipídicas y de otros componentes celulares esenciales [3-8].

Estas ROS se están continuamente produciendo de forma natural, debido al metabolismo celular y son esenciales para el control fisiológico del funcionamiento de la célula [9]. Sin embargo, debido a su elevada reactividad su concentración tiene que mantenerse en un determinado nivel de concentración para no producir daño celular (balance) [10]. Esto ha llevado a los organismos aerobios a desarrollar un importante sistema antioxidante enzimático de eliminación del exceso de dichas ROS, que constituye la primera línea de defensa antioxidante del organismo [11-13].

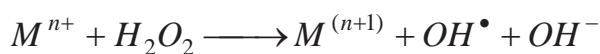
Entre los distintos enzimas antioxidantes cabe destacar al enzima Cu,Zn-superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), el cual cataliza la reacción de destrucción del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, según la siguiente reacción [14]:



Este peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado podrá ser destruido a continuación por las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa [15] (ver Figura A.17 de la Introducción de la presente Tesis).

Además, como se vio en la Introducción de la presente Memoria, todos los metales y aleaciones metálicas con las que se fabrican los implantes ortopédicos y dentales, una vez introducidas en el organismo (y en contacto con los tejidos vivos y los fluidos biológicos), se degradan (como consecuencia de la corrosión y/o el desgaste) en mayor o menor extensión, liberando residuos metálicos. De ahí, la presencia de niveles superiores de los metales presentes en los materiales de los implantes (Cr, Co, Ti) en los fluidos biológicos de los pacientes portadores de éstos (sangre, suero, orina, etc.) [16-18].

Estos metales, podrán actuar como catalizadores de las reacciones por las que el O_2 se transforma en alguna de las ROS. De hecho, los principales metales liberados por los implantes ortopédicos y dentales (Cr, Co y Ti) son metales redox que pueden generar dichas especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción de Fenton [19] y Haber Weiss [20] ocasionando daños en el ADN [21].



La pérdida del balance de óxido-reducción a favor de las ROS, es decir, cuando se produce un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas de oxígeno y la capacidad de detoxificación por parte de los antioxidantes (como la Cu,Zn-SOD) lleva a una situación conocida como *estrés oxidativo* [3,22]. El estrés oxidativo se ha relacionado con numerosas patologías clínicas como son la aterosclerosis, cáncer, enfermedades del sistema nervioso central (Alzheimer, Parkinson), enfermedades autoinmunes y envejecimiento, entre otras [23-25].

Por tanto, es de gran importancia e interés actual poder establecer si existen cambios en el estrés oxidativo debido a la presencia de implantes metálicos. Para ello, es necesario disponer de métodos analíticos fiables, sensibles, selectivos y reproducibles que permitan medir la concentración de las ROS ó la concentración de sustancias indicadoras de los daños originados por las ROS.

Puesto que la medida directa de las ROS resulta extremadamente difícil debido a su gran reactividad (tiempo de vida muy corto), es frecuente llevar a cabo la medida indirecta del efecto de las ROS en los organismos vivos mediante el empleo de *biomarcadores de estrés oxidativo*. Los biomarcadores pueden definirse como biomoléculas que reflejan los cambios medibles en sistemas biológicos ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos que están relacionados con la exposición o los efectos a un material o factor tóxico (en este caso, las ROS).

Los biomarcadores de estrés oxidativo pueden ser clasificados en dos grupos:

- a) Los sub-productos o productos finales del daño oxidativo (que se generan por daño en las biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN).
- b) Los cambios en las sustancias antioxidantes (enzimáticas y no-enzimáticas).

En nuestro caso, hemos centrado el estudio en los posibles cambios de los enzimas antioxidantes, particularmente de la enzima Cu,Zn-SOD. El principal problema para la determinación de este enzima, es que aunque existen métodos para su determinación absoluta (métodos inmuno químicos, p.ej. ELISA) [26,27], los métodos mas comúnmente utilizados son los ensayos que miden la actividad enzimática (métodos relativos) [28-32], los cuales dependen estrechamente del método utilizado y además, están afectados por numerosas interferencias. Por ello, sigue siendo de primordial importancia llevar a cabo el desarrollo de métodos analíticos que permitan la cuantificación

absoluta de este tipo de antioxidantes y que además nos proporcionen idea de la actividad enzimática de la misma.

D.3.2 Objetivo general y objetivos parciales

De este modo el objetivo general de este capítulo fue: *el estudio de los efectos que producen los metales liberados por las prótesis e implantes en el organismo: cambios en los niveles de Cu,Zn-Superóxido Dismutasa como respuesta al estrés oxidativo*. La primera parte del estudio se centró en el desarrollo de métodos de cuantificación exactos y precisos del enzima Cu,Zn-superóxido dismutasa (**Cu,Zn-SOD**) en eritrocitos humanos a través de estrategias de dilución isotópica.

Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de un protocolo de tratamiento de muestra para la extracción del enzima SOD de los glóbulos rojos a partir de sangre de pacientes portadores de implantes y de controles.
- Desarrollo de un protocolo de tratamiento de las muestras de sangre (tanto de pacientes portadores de implantes metálicos, como en individuos desprovistos de implantes; controles), para la extracción de la enzima Cu,Zn-SOD.
- Desarrollo de un método de cuantificación de los elementos traza (Cu y Zn) asociados a este enzima, mediante análisis de dilución isotópica (IDA) post-columna, a través de la adición de una disolución enriquecida isotópicamente en los isótopos menos abundantes de estos elementos (^{65}Cu y ^{68}Zn), previamente caracterizados, y con detección ICP-MS.
- Establecer la correlación entre la concentración de Cu presente en el enzima (centro catalítico del enzima) con la actividad de la misma, para obtener mediante una sola medida (la de Cu mediante ICP-MS)

no solamente la concentración total del enzima si no también su actividad. Aplicación a muestras reales.

- Desarrollo de un método de cuantificación basado en la adición específica de Cu,Zn-SOD isotópicamente enriquecido: síntesis del compuesto y caracterización mediante técnicas moleculares (MALDI-TOF-MS) y elementales HPLC-ICP-MS.
- Aplicación del método basado en IDA específica a muestras reales y comparación de ambas estrategias.

Los resultados y discusión derivados de este segundo capítulo se recogen en los artículos científicos IV y V detallados en la sección D.3.3 y D.3.4.

D.3.3 Artículo científico IV: *Analytical Chemistry*. 82 (2010) 2387-2394

Quantitative Analysis and Simultaneous Activity Measurements of Cu, Zn-Superoxide Dismutase in Red Blood Cells by HPLC–ICPMS

Y. Nuevo Ordoñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González,* and A. Sanz-Medel*

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

The interest on accurate and precise determination of metalloproteins such as Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) involved in the redox balance of living cells is increasing. For this purpose, analytical strategies that provide absolute protein concentration measurements have to be developed. The determination of Cu, Zn-SOD through the measurement of the Cu associated to the protein, which provides its enzymatic activity, by liquid chromatography with online inductively coupled plasma mass spectrometric (ICPMS) detection is described here. Postcolumn isotope dilution analysis (IDA) of Cu has been applied for quantification after evaluation of the column recovery for the total Cu and also Cu-SOD that turned out to be quantitative. When the concentration results obtained via IDA using high-performance liquid chromatography (HPLC)–ICPMS are plotted versus the activity measurements (using the spectrophotometric pyrogallol autoxidation method) a good correlation curve is obtained. Such results permit us, from ICPMS measurements, to obtain simultaneously the Cu, Zn-SOD absolute concentration as well as its enzymatic activity by interpolation in the previously obtained curve. This possibility was explored in real samples (red blood cells of control individuals and patients with metallic total hip arthroplasty) obtaining a good match between direct enzymatic activity measurements and those obtained by interpolation in the correlation curve. The actual protein identification in the red blood cell extract was conducted by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and two matrixes were compared in order to preserve as much as possible the protein–metal interactions during the MALDI process. Interestingly, using a solution containing trihydroxyacetophenone in citrate buffer permitted us to observe some metal–protein interactions in the MS spectrum of the intact Cu, Zn-SOD from red blood cells.

Oxidative stress is a deleterious process that can be an important mediator of damage to cell structures, including lipids of biological membranes, proteins, and DNA. It generally occurs when there is an imbalance between the production of free radicals and their neutralization by the natural antioxidant defense in the

organisms.¹ Free radicals can be defined as very reactive molecules or molecular fragments containing one or more unpaired electrons in atomic or molecular orbitals. They are produced in the body as byproducts of normal metabolism and as a result of exposure to radiation and some environmental pollutants including pesticides, asbestos, etc.^{2,3} Additionally, an important production of free radicals, according to the Fenton reaction, may occur when metals like iron, copper, chromium, or cobalt are present in the cellular media in an abnormal excess.^{1,4} In this regard, recent studies try to correlate the presence of metals like Co and Cr, possibly liberated from hip and knee prosthesis made of Cr/Co alloys, with changes on the cellular redox state of osteoblasts in vitro.^{5,6}

When cells are exposed to oxidative stress, they trigger their antioxidant defense system as a compensatory mechanism to protect them from damage induced by free radicals. Such antioxidant defense includes antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx).⁷ Copper, zinc-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) is a cytosolic metalloenzyme of about 32 kDa that exists in homodimeric form containing a Cu and a Zn atom in each of the monomeric structures. The protein, which catalyzes the dismutation of the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) into hydrogen peroxide and molecular oxygen via its Cu redox cycle [Cu(II)/Cu(I)], is one of the most important enzymes in the front line of defense against oxidative stress.^{8,9} Additionally, the structural aspects of Cu, Zn-SOD have been recently highlighted because at least 25% of the cases of familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS), sporadic ALS, or both are possibly caused by specific mutations in the Cu, Zn-SOD gene.¹⁰ Cu, Zn-SOD has also been identified as a major target of oxidative damage in Alzheimer's

- (1) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazura, M.; Telser, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84.
- (2) Franco, R.; Sánchez-Oleab, R.; Reyes-Reyes, E. M.; Panayiotidis, M. I. *Mutat. Res.* **2009**, *674*, 3–22.
- (3) Limón-Pacheco, J.; Gonsébat, M. E. *Mutat. Res.* **2009**, *674*, 137–147.
- (4) Pourahmad, J.; O'Brien, P. J. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2001**, *500*, 203–207.
- (5) Fleury, C.; Petit, A.; Mwale, F.; Antoniou, J.; Zukor, D. J.; Tabrizian, M.; Huk, O. L. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3351–3360.
- (6) Raghunathan, V. K.; Ellis, E. M.; Grant, M. H. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 647–652.
- (7) Aruoma, O. I. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 199–212.
- (8) Fridovich, I. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 97–112.
- (9) Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Beem, K. M.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *J. Mol. Biol.* **1982**, *160*, 181–217.
- (10) Sato, T.; Yamamoto, Y.; Nakanishi, T.; Fukada, K.; Sugai, F.; Zhou, Z.; Okuno, T.; Nagano, S.; Hirata, S.; Shimizu, A.; Sakpda, S. *J. Neurol. Sci.* **2004**, *218*, 79–83.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: eblancog@uniovi.es (E.B.-G.); asm@uniovi.es (A.S.-M.).

disease (AD) and Parkinson's disease (PD) affected brains.¹¹ Therefore, possible changes on the level of Cu, Zn-SOD (activity, expression, and molecular structure) can be used as a specific biomarker of important health disorders such as ALS, AD, and PD and eventually could be invaluable to study the long-term health risks posed by metallic (Cr/Co-based alloys) prosthesis.⁶ For this purpose, the development of accurate and precise analytical strategies to provide the absolute quantifications of such antioxidant enzyme are required. Most existing methods for Cu, Zn-SOD determinations are based on the measurement of its enzymatic activity in an indirect way by using the competition between the enzyme itself and a superoxide scavenger, commonly a coloration agent that works as an activity reporter.¹² Such methods are highly susceptible to positive interferences from non-SOD substances able to react with the superoxide anion radicals or with the coloration agents. Additionally, SOD activity measurements are strongly dependent on the assay used (it is a relative measurement) as well as on the selected protein extraction buffer.¹³ In fact, intercomparisons of results among different laboratories or experiments turned out controversial being today a rather complex issue.¹⁴ In order to avoid such present drawbacks, this manuscript aims first at the development of an alternative quantification strategy for reliable and absolute determination of Cu, Zn-SOD entire protein in red blood cells.

Thus Cu, Zn-SOD was first chromatographically separated from other proteins using anion-exchange chromatography and detected online by UV-vis absorption and by inductively coupled plasma mass spectrometric (ICPMS) monitoring (in this latter case, detecting Cu and Zn ions present in the enzyme). Since the stoichiometry of Cu and Zn to SOD is well-established, the determination of these metal ions by ICPMS might serve as an indirect method to quantify the protein, provided that no protein demetalation occurs during sample handling before detection (that is, during sample preparation and chromatographic separation). Among the different metal quantification methods that can be conducted by ICPMS, isotope dilution analysis (IDA) provides best capabilities in terms of precision and accuracy,^{15,16} and it has been proposed before as an alternative for Cu, Zn-SOD quantification.^{17,18} Thus, by postcolumn addition of a spike (containing an isotopically enriched element) it is possible to quantify accurately the corresponding heteroelement present in the biomolecule (Cu and/or Zn in this case) eluting from the column. This permits the indirect quantification of the SOD concentration, provided that the metal/protein stoichiometry is maintained along the whole procedure. Additionally, since the enzymatic activity of SOD is directly related to the presence of Cu in the protein, it should be possible to obtain a direct correlation between the Cu concentra-

tion obtained by ICPMS and the activity of the protein (measured by any of the existing methods). In that case, the single ICPMS measurement of Cu could provide both total SOD concentration and activity information. Such possibility has been evaluated in real samples of red blood cells from control individuals and patients with total hip arthroplasty and compared with the direct activity measurements.

Finally, the identity of the sought protein has been confirmed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) of the intact molecule in the appropriate fraction collected after high-performance liquid chromatography (HPLC) separation. For this purpose, a careful optimization of the sample preparation by evaluating two different MALDI matrixes has been conducted. The use of 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrix has permitted us to preserve the metal-protein association in the sought fraction of the real sample, very seldom achieved.¹⁹

MATERIALS AND METHODS

Reagents, Materials, and Samples. Cu, Zn-SOD from bovine and from human erythrocytes was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Mobile phases for HPLC containing (A) 10 mM tris(aminomethane) (Merck, Darmstadt, Germany)/hydrochloric acid (Merck), pH 7.4 and (B) A + 250 mM ammonium acetate (Merck) were prepared by dilution of the solid salts with the 18 M Ω cm distilled deionized water (Millipore, Bedford, MA). Isotopically enriched Cu and Zn solutions (100 ng g⁻¹) with relative abundances of 99.714% ⁶⁵Cu and 7.726% ⁶⁴Zn, 4.953% ⁶⁶Zn, 1.164% ⁶⁷Zn, 85.992% ⁶⁸Zn, and 0.164% ⁷⁰Zn were prepared by dilution in water of the stock solution (10 μ g g⁻¹) obtained from Spectrascan (Teknolab A.S. Dröbak, Norway). Cutoff membrane filters (10 kDa) were obtained from Amicon-Ultra (Millipore Iberica, Madrid). Human serum samples from healthy volunteers (five) and patients carrying Co/Cr/Mo-based prosthesis (three) were kindly provided by Hospital Central of Asturias (Spain).

HPLC-ICPMS. HPLC separations were carried out using a dual-piston liquid chromatographic pump (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a sample injection valve from Rheodyne, model 7125 (Cotati, CA, USA), fitted with a 50 μ L injection loop, an anion-exchange column, Mono-Q HR 5/5 (50 mm \times 5 mm i.d., Pharmacia, Amersham Bioscience, Spain), and a diode array detector (DAD) from Agilent Technologies (1100 Series, Waldbron, Germany). All the mobile phases were passed through a scavenger column (25 mm \times 0.5 mm i.d.) placed between the pump and the injection valve in order to eliminate possible metal traces present as contamination in the mobile phases. The scavenger column was packed with Kelex-100 (Schering, Germany) impregnated silica C₁₈ material (20 μ m particle size) (Bondapack, Waters Corporation, Massachusetts). Specific atomic detection of Cu and Zn in the column effluent was performed using an ICPMS model 7500 from Agilent Technologies (Agilent, Tokyo, Japan) equipped with a collision cell system (ICP-(ORS)-MS). Table 1 summarizes the corresponding operating conditions.

MALDI-TOF-MS. The instrument used in the study was a Voyager-DETM STR Biospectrometry Workstation (Applied Bio-

- (11) Choi, J.; Rees, H. D.; Weintraub, S. T.; Levey, A. I.; Chin, L.-S.; Li, L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11648–11655.
- (12) Serra, J. A.; Marschoff, E. R.; Dominguez, R. O.; de Lustig, E. S.; Famulari, A. L.; Bartolome, E. L.; Guareschi, E. M. *Clin. Chim. Acta* **2000**, *301*, 87–102.
- (13) Janknegt, P. J.; Rijstenbil, J. W.; Van de Poll, W. H.; Gechev, T. S.; Buma, A. G. J. *J. Photochem. Photobiol., B* **2007**, *87*, 218–226.
- (14) Zhou, J. Y.; Prognon, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 1143–1148.
- (15) Heumann, K. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 318–329.
- (16) Rodríguez González, P.; Marchante Gayón, J. M.; García-Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Spectrochim. Acta, Part B* **2005**, *60*, 151–207.
- (17) Deitrich, C. L.; Raab, A.; Pioselli, B.; Thomas-Oates, J. E.; Feldmann, J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8381–8390.
- (18) Wang, M.; Feng, W.; Lu, W.; Li, B.; Wang, B.; Zhu, M.; Wang, Y.; Yuan, H.; Zhao, Y.; Chai, Z. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9128–9134.

- (19) Zehl, M.; Allmaier, G. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 103–110.

Table 1. Experimental Operating Conditions

ICPMS Parameters	
instrument	Agilent 7500 CE (ORS)
rf power	1500 W
nebulizer gas flow rate	1 L min ⁻¹
<i>m/z</i> monitored	⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn
hexapole bias	-15 V
QP bias	-13 V
HPLC Parameters	
column	Mono-Q HR 5/5 anion exchanger (50 mm × 5 mm i.d., GE Healthcare)
injection volume	50 μL
flow rate	1 mL min ⁻¹
eluent	(A) 10 mM Tris-acetic acid (pH = 7.4) (B) A + 250 mM ammonium acetate
gradient	0–100% B in 30 min (linear)
detection	259 nm
MALDI-TOF-MS Parameters	
instrument	Voyager-DETM STR Biospectrometry
scan type	positive
instrument mode	lineal
external calibration	cytochrome <i>c</i> α-lactalbumin β-lactoglobulin
matrixes	(A) α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (B) 2,4,6-trihydroxyacetophenone
laser	2600 V
spectrum acquisition	
shots	150
scan range	6000–35000
acceleration voltage	25000 V

systems, Langen, Germany) equipped with a nitrogen pulsed laser (337 nm) and operating in positive mode. Typically mass spectra were acquired by averaging 1–3 accumulated spectra of 150 single laser shots. External calibration was performed for molecular assignments using different standards of cytochrome *c*, α-lactalbumin, and β-lactoglobulin. All experimental and calculated mass values given refer to the average molecular mass and are mean of 3–5 different samples. Sample preparation for MALDI-TOF-MS measurements was performed on a stainless steel hydrophobic target (Voyager 96 × 2 sample plate P/N V700813) using the dried-droplet technique. For that, an aliquot (0.5 μL) of the sample solution and an equal aliquot of the matrix solution were mixed on the target in the given order and dried at room temperature. Two different matrix solutions were evaluated for the analysis of intact SOD by MALDI: α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) (5 mg mL⁻¹ dissolved in 100 μL of trifluoroacetic acid, TFA 1% and to 1 mL with 30% acetonitrile, ACN) and 2,4,6-trihydroxyacetophenone (prepared by mixing 900 μL of 10 mg mL⁻¹ 2,4,6-trihydroxyacetophenone monohydrate in 20% ACN with 100 μL of 50 mg mL⁻¹ solution of diammonium hydrogen citrate in water).

Activity Measurement. The activity of the SOD was determined by the method of pyrogallol autoxidation.²⁰ This method is based on the inhibitory effect of the enzyme on the rate of pyrogallol autoxidation that can be monitored spectrophotometrically at 420 nm as described previously.²¹ One unit of SOD activity

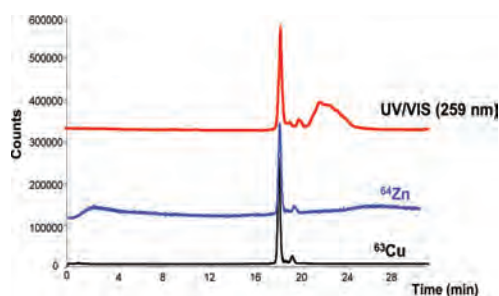


Figure 1. Illustrative chromatogram by HPLC-UV-vis (259 nm) and ICPMS detection of a standard of bovine Cu, Zn-SOD monitoring ⁶³Cu (black trace) and ⁶⁴Zn (blue trace, off axis for clarity purposes).

was defined as the inhibition of the pyrogallol oxidation rate by 50%. For this purpose, different aliquots of the standard of commercially available bovine Cu, Zn-SOD were taken to a final volume of 1.9 mL with 50 mM Tris-HCl, pH 8.20 (containing 1 mM DTPA for scavenging any free copper ions) to obtain final activities ranging from 0 to 2 units. A fixed volume of 100 μL of 5 mM pyrogallol previously prepared in 10 mM HCl was then added, and the mixture was left to stand for 40 s before starting the measurements. The samples were processed in the same way, and the change in absorption of all solutions was determined over 4 min at room temperature using a spectrophotometer (UV-vis Spectrometer, Lambda 20, Perkin-Elmer).

Sample Treatment. Individual blood cells from both groups (healthy volunteers and patients) were treated to be separated from plasma by centrifugation at 3000g, 4 °C, 10 min. The cells were then hemolysed by addition of ice-cold distilled water (4.5 mL per 0.5 mL of cells) and shaking for 3 min using a vortex mixer at room temperature. After that a solution of ethanol/chloroform (2:1) (3.75 mL per 0.5 mL of cells) was added in order to accomplish the hemoglobin precipitation. After manual shaking for 5 min, the mixture was centrifuged (10 000g, 4 °C, 1 h), and the supernatant was divided into two aliquots: one was directly used to conduct the activity measurements and the second one was passed through a 10 kDa cutoff filter for cleaning, preconcentration, and further HPLC-UV-ICPMS measurements. For the activity measurements, aliquots of the processed sample ranging from 50 to 150 μL were treated in the same way as the standards (adding buffer to a final volume of 1.9 mL and then 0.1 mL of the pyrogallol solution).

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic Separation and Detection of Cu, Zn-SOD via UV-ICPMS. For optimization of the separation conditions by anion-exchange chromatography, a commercial standard of Cu, Zn-SOD from bovine erythrocytes was used. The best separation was obtained using the chromatographic conditions summarized in Table 1, based on a gradient of ammonium acetate (pH 7) in 30 min. With the use of these conditions, it was possible to obtain the chromatograms shown in Figure 1 where the UV (259 nm), Cu (*m/z* 63), and Zn (*m/z* 64) traces are overlaid. By comparing the chromatographic profiles (UV and ICPMS) it is

(21) Marklund, S. L. In *Handbook of Methods/or Oxygen Radical Research*; Greenwald, R. A., Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, 1985; pp 243–247.

(20) Marklund, S.; Marklund, G. *Eur. J. Biochem.* **1974**, *47*, 469–474.

possible to address the presence of a major peak at ~18 min that exhibits UV absorbance and contains Cu and Zn (see the ICPMS trace). The UV trace reveals, however, that this protein standard is not completely pure and contains some other absorbing species at longer retention times (20–24 min) without association to Cu or Zn ions. In fact, when the peak areas of such compounds were evaluated in the UV profile, the corresponding Cu, Zn-containing peak accounted just for 38% of the total area. This means that the protein standard (without information on the concentration by the manufacturer) contains some other species that account for about 60% of the total weighted solid. Therefore, the final Cu, Zn-SOD concentration considered for further calculations is only ~38% of the total weighted protein standard.

The column recovery for Cu and Zn was also evaluated by measuring the concentrations of these elements in the SOD standard before and after injection in the chromatographic column (using ICPMS with direct calibration). The recoveries for Cu were quantitative ($103\% \pm 2\%$), but in the case of Zn, the results were slightly lower ($70\% \pm 3\%$) for three subsequent injections of the same standard. Such lability of Zn versus Cu into the SOD molecule has been previously reported by other authors that observed that Zn could be first removed from the protein under slightly acidic conditions ($\text{pH} \sim 4$).^{22,23} Therefore, in further quantification experiments, via isotope dilution, Cu was taken as the ICPMS target element present in SOD (although Zn was always simultaneously monitored as an additional confirmation of the species identity). The detection limit for this element in the HPLC-ICPMS set up turned out to be about 1 ng g^{-1} protein with a precision between runs of about 2–3% (as RSD for $n = 3$ injections of the same standard) in the peak area.

Postcolumn IDA-HPLC-ICPMS. For postcolumn isotope dilution experiments, a solution containing 100 ng mL^{-1} of isotopically enriched Cu (^{65}Cu , 99.714%) was continuously pumped by an arm of a T-piece and mixed with the eluent coming from the chromatographic column as reported in previous publications.²⁴ After calculating the isotope ratio on each point of the chromatogram and applying the online isotope dilution equation²⁵ it is possible to calculate the total Cu associated to the main peak in the chromatogram. By taking into account the weighted protein mass (and considering, as mentioned before, that the SOD peak accounts for only 38% of the total) it was possible to obtain a Cu/protein stoichiometry of 1.98:1, which agrees with the theoretical value (2:1) of the dimer of Cu, Zn-SOD that contains two atoms of Cu and two atoms of Zn per mole of protein. In the case of Zn, since the metal recovery from the column was not quantitative, the obtained stoichiometry was about 1:1.70. Under the chromatographic conditions used here (nearly physiological conditions) the dimeric structure of the Cu, Zn-SOD is expected to be preserved. However, such considerations have to be taken into account since the final protein concentration will be obtained by the Cu measurements. In the view of such results, we can

(22) Pantoliano, M. W.; Valentine, J. S.; Mammone, R. J.; Scholler, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1717–1723.

(23) Yamazaki, Y.; Takao, T. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8246–8252.

(24) Del Castillo, M. E.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2006**, *82*, 8218–8226.

(25) Heumann, K. G.; Gallus, S. M.; Rädlinger, G.; Vogl, J. *Spectrochim. Acta, Part B* **1998**, *53*, 273–287.

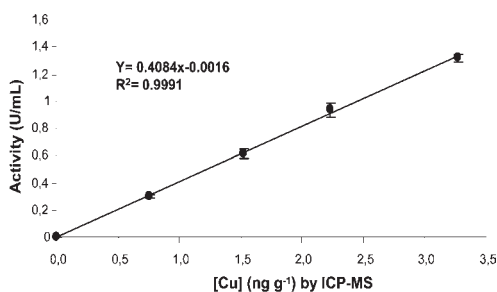


Figure 2. Plotted curve obtained by measuring the activity of four commercial Cu, Zn-SOD standards vs the protein concentration obtained by ICPMS results via Cu analysis.

conclude that (a) there is a quantitative species recovery through the column (not only the Cu recovery is quantitative) which needs to be addressed for further quantitative result, and (b) since the enzymatic activity is only driven by the presence of Cu in the catalytic site of the enzyme,⁹ this activity must be maintained along the proposed chromatographic separation. If this is so, a linear relationship between the Cu concentration found in the enzyme and its activity should be expected. Thus, a single ICPMS measurement should be enough to obtain, simultaneously, SOD concentration and activity. Since the Cu concentration can be directly obtained by IDA-HPLC-ICPMS, we have tried to correlate it with the activity measurements (by percent inhibition of pyrogallol autoxidation) in the same standards. For this purpose different Cu, Zn-SOD solutions were quantified with the proposed method (IDA-HPLC-ICPMS) and plotted versus their activity measured by using the pyrogallol autoxidation method.

The obtained results are shown in Figure 2. As can be seen, there is a good linear correlation between the Cu concentration (obtained by HPLC-ICPMS) and the enzymatic activity (expressed as activity units). From the curve in Figure 2, and by just measuring Cu in the chromatographic peak by postcolumn IDA-HPLC-ICPMS, it would be possible to calculate the absolute protein concentration and also its activity. However, such assumption will only be accurate if the sample preparation does not change the stoichiometry of Cu/protein (2:1 for SOD) since the used HPLC method has proved not to do so. Thus, sample preparation is evaluated in the next section.

Cu, Zn-SOD Analysis in Red Blood Cells. The erythrocytes sample preparation for Cu, Zn-SOD extraction involved first the cell lyses followed by hemoglobin precipitation and preconcentration of the remaining extract. In order to evaluate for the recovery of the whole sample treatment, different aliquots of the sample (after lyses) were spiked with different amounts of a Cu, Zn-SOD standard from human erythrocytes. Then, the samples were processed as described before for hemoglobin precipitation using ethanol/chloroform. The mixture was centrifuged, the phases were separated, and the organic layer was discarded. The aqueous layer was then passed through a 10 kDa cutoff membrane filter and then reconstituted to a final volume of $150 \mu\text{L}$ before injection into the HPLC-UV-ICPMS system. The results revealed that the recovery of the whole process ranged from 70% to 74%, probably ascribed to coprecipitation during the hemoglobin removal and losses in the ultracentrifugation step. It is noteworthy

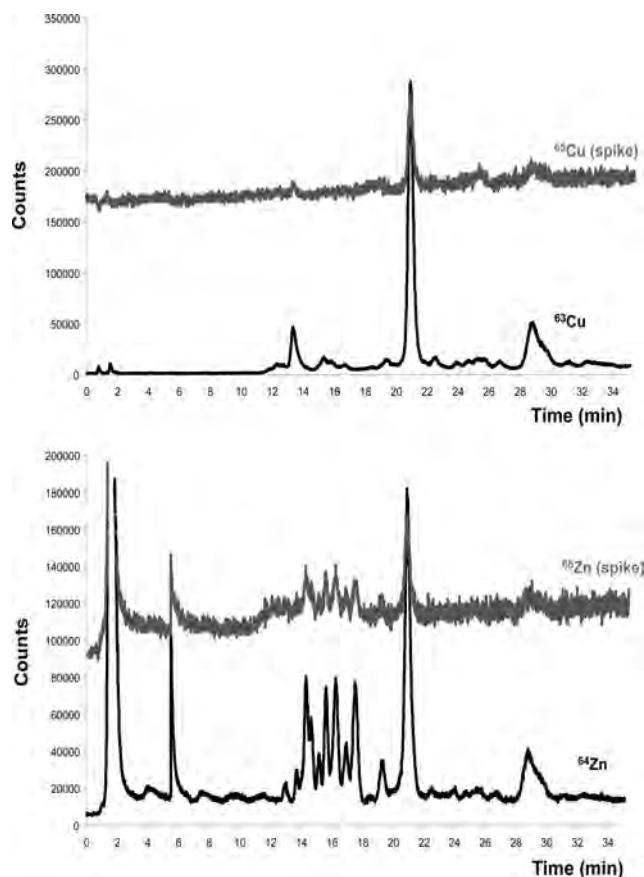


Figure 3. HPLC–ICPMS chromatogram showing the profiles of $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ (spike) and $^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ (spike) in the red blood cell extract from a patient with total hip arthroplasty. The main peak at about 20.5 min containing Cu and Zn was identified by MALDI-TOF-MS as Cu, Zn-SOD and quantified by IDA.

that the metal/protein stoichiometry did not seem to suffer significant changes.

Once this was verified, the samples coming from control individuals and patients carrying metallic hip prosthesis²⁶ were processed, following the same sample preparation protocol, and analyzed by HPLC–ICPMS. Figure 3 shows a representative chromatogram of the consistently obtained results. As can be seen, the most intense ICPMS signals, where a coelution of Cu and Zn occurs (about 20.5 min), corresponded to a slightly higher retention time than this observed in the bovine Cu, Zn-SOD standard (18 min) shown in Figure 1. This is due to the different isoelectric points of bovine (4.95) and human (4.75) Cu, Zn-SOD due to the slightly different amino acid sequence. Additionally, other minor Cu-containing peaks are shown in the chromatogram. For Zn, an intense Zn signal on the void volume was observed along with many other Zn-containing species (between 12 and 19 min). This species was collected, desalted, and analyzed by MALDI to confirm the presence of Cu, Zn-SOD.

Species Characterization by MALDI-TOF-MS. For further confirmation of the identity of the quantified species in the

chromatographic peak that exhibited Cu and Zn coelution (see Figure 3), the peak was collected, purified, and analyzed by MALDI-TOF-MS. MALDI is considered a soft ionization source which suffers some limitations regarding the preservation of protein–metal interactions mainly due to the use of strong acids to dissolve the crystallization matrixes and to the high energy of the laser beam. Cu, Zn-SOD is considered to be a very stable metalloprotein that preserves its activity at concentrations up to 8 M urea²⁷ or 2% SDS and at pH ranges from 4.5 to 9.²⁸ Therefore, it seems a very good candidate to be studied by MALDI-TOF-MS, using a specific set of conditions.

Two different MALDI matrixes were used: one containing α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and the other one 2,4,6-trihydroxyacetophenone. The second one has demonstrated excellent features for the analysis of metal conjugates in the case of oligonucleotides²⁹ by MALDI-TOF-MS and to preserve noncova-

(27) Forman, H. J.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 2645–2649.

(28) Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G. *Crit. Rev. Biochem.* **1987**, *22*, 111–180.

(29) Brüchert, W.; Krüger, R.; Tholey, A.; Montes-Bayón, M.; Bettmer, J. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1451–1459.

(26) Nuevo Ordoñez, Y.; Montes-Bayón, M.; Blanco, E.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 1037–1043.

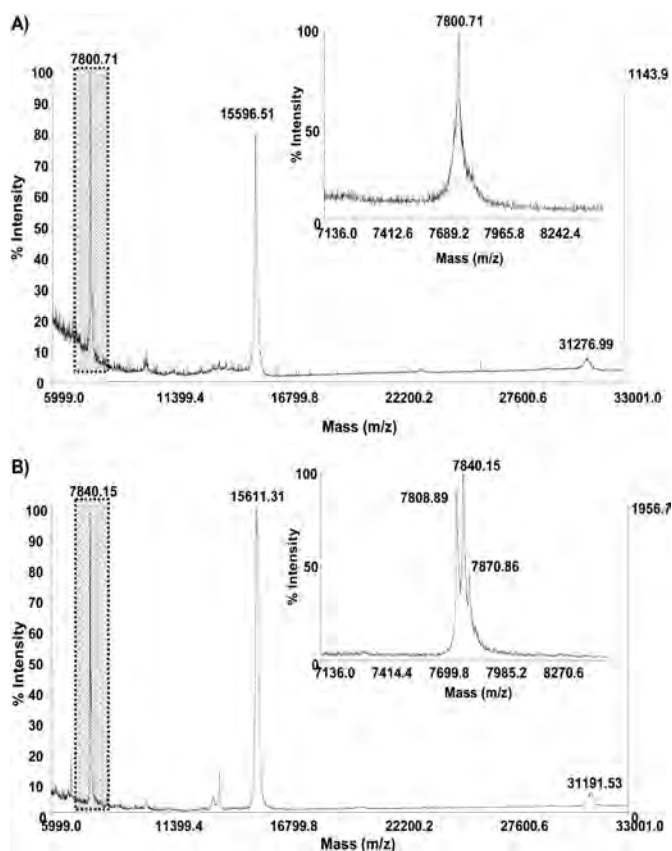


Figure 4. MALDI-TOF-MS of the bovine Cu, Zn-SOD standard using two different MALDI matrixes: (A) α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; (B) 2,4,6-trihydroxyacetophenone.

lent interactions,³⁰ and so it could be adequate to preserve metals into the protein SOD structure. Therefore, the two MALDI matrixes were evaluated for the analysis of a standard of bovine Cu, Zn-SOD. Figure 4A shows the observed mass spectrum corresponding to the use of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. The MS spectrum shows some traces of the Cu, Zn-SOD dimer at 31.3 kDa, but the most intense signals corresponded to the monomer at m/z 15 596 \pm 10 Da and the doubly charged ion at m/z 7800 \pm 12 Da. According to the databases (Swiss Prot, SODC_bovine), the molecular mass of the apo monomer is 15 591.3 Da (after considering the modifications described by the database); therefore, the observed peak at m/z 15 596 could correspond to the $[M + H]^+$ species of the monomer. Similarly, the Cu, Zn-SOD standard was analyzed with the 2,4,6-trihydroxyacetophenone matrix (Figure 4B). In this case, the obtained spectrum is similar but the observed maximum of the monomer (m/z 15 611) and the double charged one (m/z 7806) are slightly higher than in Figure 4A. When the magnification of the m/z range from 7136 to 8242 is taken in both cases (insets of Figure 4, parts A and B), the observed results are quite different. In the case of using α -cyano as MALDI matrix, a single broad

protein profile is observed (inset of Figure 4A), whereas three well-resolved masses can be identified in the acetophenone matrix (inset of Figure 4B). Such species with m/z 7808, m/z 7840, and m/z 7870 could be ascribed to the doubly charged apo-SOD, Cu- (or Zn)-containing SOD, and the Cu, Zn-SOD, respectively. To confirm such results further experiments were conducted to prove the species identity.

For this purpose, the protein standard of bovine Cu, Zn-SOD was demetallated by dialysis overnight against a 1 M HCl solution. Then, the protein was preconcentrated in a membrane filter and washed to remove the excess of acid. The protein was then immobilized on the MALDI plate with the two matrixes, and the results are summarized in Figure 5. In this case, Figure 5A shows the profile of SOD after acid treatment with the α -cyano matrix that is very similar to the profile obtained before treatment (see the inset Figure 4A). On the other hand, out of the three species detected when using the acetophenone as MALDI matrix of the inset in Figure 4B, just a single species (m/z 7806) is detected with this matrix after acid treatment of the SOD standard (see Figure 5B). Therefore, this finding confirms the possibility to detect apo-SOD, partially loaded (most likely with Cu) SOD, and fully loaded (Cu, Zn-SOD) by MALDI when using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrix.

(30) Thiede, B.; Von Janta-Lipinski, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 1889–1894.

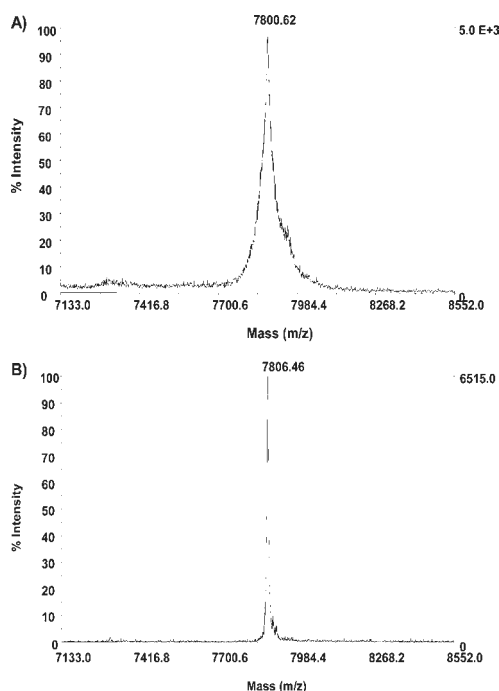


Figure 5. MALDI-TOF-MS of the bovine Cu, Zn-SOD standard after dialysis of the standard vs 1 M HCl to remove the metals, using (A) α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and (B) 2,4,6-trihydroxyacetophenone.

Thus, in a similar way the fractions collected from the patients samples were analyzed by MALDI-TOF-MS using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrix. The human Cu, Zn-SOD possess 154 amino acids (two more than the bovine) and exhibits a molecular mass of 15 936 Da (for the monomer). The observed results shown in Figure 6 reveal the presence of a main signal at m/z 15 996 \pm

18 Da that could correspond to the monomer of the partially metalated human SOD (m/z 15 968, $\Delta m = 0.2\%$) and to the doubly charged at m/z 8001 \pm 10 Da (see the inset of Figure 6). Additionally, the magnification of the m/z range from m/z 7622 to 8461 provides a well-resolved profile exhibiting three main peaks at m/z 7969, 8001, and 8033 that agree well with the doubly charged apo-SOD (m/z 7969), Cu- (or Zn)-containing SOD (m/z 8001), and the Cu, Zn-SOD (m/z 8033), respectively. In this case, a standard of bovine SOD together with cytochrome *c* was used for the calibration, and thus, the mass accuracy is clearly superior to that of Figure 4. This confirms the presence of the sought protein in the quantified fractions and opens the possibility of analyzing intact metalloproteins by MALDI-TOF-MS just by using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrix.

Quantitative Determination of Cu, Zn-SOD in Red Blood Cells. After the assessment of the species identity in the real samples, the quantitative step was taken. For this purpose, the online isotope dilution method was applied¹⁶ and a postcolumn spike of isotopically enriched Cu was added online after the chromatographic separation. This setup allows final determination of the Cu concentration in the protein (and, thus, the SOD concentration provided that stoichiometry and quantitative separation of Cu species are secured).

From the calculated SOD concentration, it was possible by interpolation into the graph of Figure 2 to directly obtain the protein activity. Additionally, the activity was also measured directly into the corresponding sample by the above-mentioned enzymatic assay.²⁰ The obtained results are summarized in Table 2. As can be observed, the activity measured and the activity estimated through the Cu concentration results showed a systematic difference of about 15%. This is probably ascribed to the protein losses during the preconcentration step necessary for the HPLC-ICPMS determination but unnecessary for the direct activity measurement (the activity is measured after hemoglobin precipitation). Beside this, both set of results are in reasonably good agreement. Admittedly the number of samples analyzed is

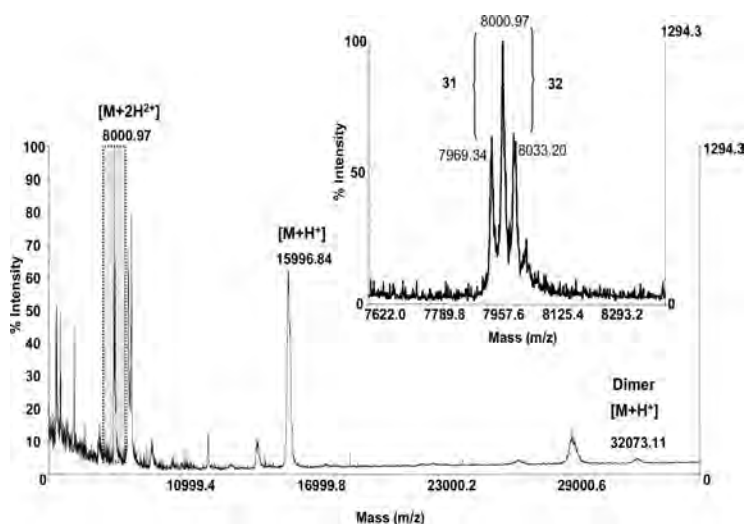


Figure 6. MALDI-TOF-MS spectrum of the fraction collected from 17 to 19 min in the chromatogram of Figure 3 using as matrix 2,4,6-trihydroxyacetophenone acid. The inset shows the magnification of the m/z range from 7622 to 8461.

Table 2. Results Encountered for Cu Determination via IDA–HPLC–ICPMS and Calculated SOD Concentration in the Samples from Five Independent Controls and Three Exposed Patients^a

	Cu ng g ⁻¹ (ICPMS) ^b	SOD μg g ⁻¹	activity (calculated) U g ⁻¹ erythrocytes ^c	activity (measured) U g ⁻¹ erythrocytes ^d
control 1	66.5	17	100.5	118.4
control 2	71.8	18	116.6	137.5
control 3	72.8	18	116.5	127.1
control 4	79.1	20	125.6	132.8
control 5	75.5	19	97.5	105.5
patient 1	32.5	8	45.7	55.3
patient 2	39.5	10	52.4	55.3
patient 3	36.3	9	46.9	55.7
range	32.5–79.1	8–13	45.7–125.6	55.3–132.8

^a Also, the results on the activity calculated by using the correlation line shown in Figure 2 are compared with those directly measured in the sample. ^b Reproducibility ($n = 3$) 3–5%. ^c According to the graph shown in Figure 2. ^d Directly measured in the samples. Reproducibility ($n = 3$) 8–10%.

too limited here to draw general conclusions, but the levels of Cu, Zn-SOD in the samples of patients having total hip arthroplasty are significantly lower than those observed in the control samples. Such finding seems to support the work reported by other authors that ascribe lower antioxidant levels in such patients due to the presence of metals (e.g., such as Cr(VI)) released from prosthesis.³¹ These latter authors have found lower intracellular reduced glutathione (GSH), as a result of the oxidation to the dimer GSSG, and significant inhibition of glutathione reductase activity.

CONCLUSIONS

A new method for Cu, Zn-SOD absolute quantitative determination has been developed based on a postcolumn IDA approach with HPLC–ICPMS measurement of copper. After optimization

(31) Lalaoui, A.; Henderson, C.; Kupper, C.; Grant, M. H. *Toxicology* 2007, 236, 76–81.

of the separation conditions, it has been demonstrated that Cu can be quantitatively recovered in association to SOD after the chromatographic separation (observed Zn recoveries, however, were about 70%). Since the protein catalytic activity is related to the bound Cu presence, our results indicate that the HPLC separation seems not to affect the enzymatic activity of the protein. Such conclusion has been validated by measuring the activity of the protein, using the pyrogallol autoxidation method, and comparing it with the SOD concentration obtained by ICPMS experiments for a number of standards, obtaining a good correlation between both set of data. Furthermore, such linear correlation line could be used to extract activity figures directly from ICPMS absolute concentration. This concept has been proved by analyzing SOD in real red blood cells of control individuals and of patients carrying metal-on-metal total hip replacement. Finally, the molecular characterization of the intact protein in real blood cells has been carried out by MALDI-TOF-MS using two different MALDI matrixes. Excellent results particularly using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as sample matrix have been observed where the bonding (association) of Cu and Zn to the biomolecule seems to be preserved. Such finding opens promising future investigations in the use of MALDI to explore metal–protein associations, which has been a remaining challenge so far.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the kind collaboration of Dr. J. Paz Aparicio from the Hospital Central de Asturias for providing the samples and the Ministry of Education and Science (Spain) and the Regional Government (Asturias, Spain) for financial support through the projects CTQ-2007-60206BQU and COF08-11, respectively.

Received for review November 16, 2009. Accepted February 12, 2010.

AC902624B

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 150

www.rsc.org/jaas

PAPER

Species specific isotope dilution *versus* internal standardization strategies for the determination of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells^{†‡}Y. Nuevo Ordóñez,^a C. L. Deitrich,^b M. Montes-Bayón,^a E. Blanco-González,^{*a} J. Feldmann^b and A. Sanz-Medel^{*a}

Received 12th July 2010, Accepted 19th November 2010

DOI: 10.1039/c0ja00075b

Many proteins (more than one third) contain metal ions either within their own structures or bound to some of their active sites. These metals are involved in numerous biological processes and therefore, the quantification of metalloproteins that can serve as clinical biomarkers is of great interest. With this aim, the development of analytical strategies that permit individual (targeted) protein quantitative analysis is attempted in this work. In particular, the evaluation of different strategies for the determination of Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD), a metalloprotein present in the first-line antioxidant defence system of the body, is conducted. The first analytical strategy is based on the use of bovine Cu, Zn-SOD as internal standard for the quantitative analysis of human Cu, Zn-SOD. For this aim, the chromatographic separation between both species (bovine and human) has been optimized according to their respective isoelectric point by anion exchange chromatography. Interestingly, the obtained results revealed a faster specific degradation of the bovine standard with respect to human SOD during sample preparation. The second strategy involves the production and evaluation of an isotopically enriched metalloprotein standard to be used as tracer in the species specific isotope dilution (SS-IDA) method by measuring the Cu associated to the protein. This is done by liquid chromatography with online inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) detection and applied to the quantification in bovine erythrocytes. This finding is a good example to illustrate the power of SS-IDA for targeted protein quantification in respect to the commonly used alternative standards.

Introduction

A first step towards the molecular understanding of the pathogenic mechanism of oxidative stress in different diseases is to know the causing molecules of such redox imbalance or/and evaluate their consequences. The most plausible cause for oxidative stress is the presence of free radicals¹ and there are some intrinsic difficulties in their direct measurement: i) the ultra-short half-life of these species (usually microseconds) due to their high reactivity and ii) many of the generated end products are in themselves reactive, although to a lesser degree. Therefore, the measurement of the effects caused by free radical action is the preferred way to evaluate oxidative stress. Among the different possible biomarkers for oxidative stress, the measurement of changes on the expression of redox controlling enzymes such as

Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1; EC 1.15.1.1) are widely used. Additionally, point mutations in this protein and the presence of oxidative adducts are considered as specific biomarkers Alzheimer's disease (AD),² Parkinson's disease (PD)³ and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).⁴ Cu, Zn-SOD is a homodimeric enzyme (32 kDa) first discovered by McCord and Fridovic,⁵ that catalyzes the dismutation of superoxide radicals into molecular oxygen and hydrogen peroxide, which is then decomposed by catalase and glutathione peroxidase. The dismutation reaction takes place *via* its Cu ion redox cycle [Cu(II)/Cu(I)], while the neighboring Zn ion plays a structural role.⁶

Thus, Cu, Zn-SOD has been established as one of the important target biomolecules to address changes in the redox status of the organisms and to protect for oxidative stress.⁷ However, this can only be applied for clinical monitoring if sensitive and specific methods for Cu, Zn-SOD determination exist to quantitatively distinguish between true disease values clearly discriminated from the noise of individual biological variations. Such quantitative targeted protein analysis is generally conducted by combination of stable isotope dilution with multiple reaction monitoring (MRM) *via* electrospray mass spectrometry (ESI-MS).⁸ However, the determination of Cu, Zn-SOD in

^aDepartment of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, C/Julían Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: eblancog@uniovi.es; asm@uniovi.es

^bCollege of Physical Science, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Aberdeen, UK AB24 3UE

[†] This article is part of a themed issue highlighting outstanding and emerging work in the area of speciation.

[‡] Electronic supplementary information (ESI) available: Supplementary information. See DOI: 10.1039/c0ja00075b

biological samples has been generally accomplished by activity assays due to the relatively high concentration of this protein reported in red blood cells ($>20 \text{ mg L}^{-1}$, ranging between 20 and 240 mg L^{-1}).^{9,10} The levels found in serum ($>100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) require more sensitive and specific strategies such as ELISA assays that provide limits of detection low enough (about 40 ng L^{-1}) to address small variations among individuals.^{11,12} In any case, the variation of the published concentration results among different methods is so extensive that no reference levels of Cu, Zn-SOD have been established yet either in serum or in red blood cells. Additionally, variations due to different pathological conditions can lead to an increase of this biomarker (in, e.g. acute myelogenous leukemia or renal failure where concentration in plasma can increase from $54 \pm 21 \text{ ng mL}^{-1}$ in plasma to $354 \pm 125 \text{ ng mL}^{-1}$).¹³ Also, a decrease in SOD levels (in, e.g., malignant lymphoma patients, chronic alcoholism or medullar tumours where the concentration decreases from $353 \pm 62 \text{ ng g}^{-1}$ in normal tissues to $123 \pm 13 \text{ ng mL}^{-1}$) can be observed.^{14,15}

In addition to biological methods, some other alternatives have been recently proposed with the final aim of Cu, Zn-SOD absolute quantification by inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) consisting of determining the Cu bound to the biomolecule and calculating the protein content from the known metal:protein stoichiometry. Some of these strategies are based on the appropriate gel electrophoretic separation of the protein followed by the elemental detection of the Cu and Zn on the ablated protein spots by ICP-MS.¹⁶ In order to compensate for potential losses during the analytical procedure, Feldmann *et al.* have used the synthesized isotopically labelled ⁶⁵Cu, ⁶⁸Zn-SOD that permits also the absolute quantification of the protein.^{17,18} But the use of isotopically labelled protein standards represents a growing area of research in both molecular (labelling on the N, O or C)¹⁹ and elemental (labelling on the heteroelements such as Fe,^{20,21} Cu,²² *etc.*) mass spectrometry. It is well established that the earlier in the procedure the isotopically labelled species are spiked into the sample, the higher the potential to compensate for metal losses during the whole analytical procedure, independently if the final measurement is done by ESI-MS or by ICP-MS.²³

In a recent publication we have described the use of anion exchange high performance liquid chromatography (HPLC) with ICP-MS detection for Cu, Zn-SOD quantification in red blood cells using post-column isotope dilution analysis.²⁴ This study revealed that losses of about 30% were occurring during sample preparation, specifically during the haemoglobin precipitation step. One alternative to address such losses is the use of standard additions, which is feasible in the case of Cu, Zn-SOD since the human enzyme is commercially available. However, this is a time consuming and expensive methodology since spiking at 2–3 levels of concentration have to be conducted.²⁵ Another possibility is the use of an adequate internal standard. This possibility has been demonstrated successfully for quantification using ICP-MS and the capability of this instrument to provide almost species independent ionization of heteroelements.²⁶ Indeed, the best results should be obtained if the internal standard were as close in structure as possible to the sought molecule and if it can be spiked at the beginning of the sample preparation.²⁵ This is approximated in protein analysis by using bovine standards which are often available and relatively affordable.²⁷

Thus, in this work we explored the possibility to conduct the determination of Cu, Zn-SOD in human red blood cells by using a bovine Cu, Zn-SOD as internal standard. Also the possibility of using species-specific spiking mode of isotope dilution analysis (“the perfect internal standard”) will be evaluated and both strategies critically compared.

Materials and methods

Reagents, Materials and Samples

Cu, Zn-SOD from bovine was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mobile phases for HPLC containing: A) 10 mM tris-aminomethane (Merck, Darmstadt, Germany)/Acetic acid (Merck), pH 7.4 and B) A + 250 mM ammonium acetate (Merck) were prepared by dilution of the solid salts with the 18 M Ω cm distilled de-ionized water (Millipore, Bedford, MA, USA). Isotopically enriched Cu and Zn solutions with relative abundances of 98.54% ⁶⁵Cu and 85.99% ⁶⁸Zn were prepared by dilution in water of the stock solution ($604.4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ of Cu and $1009.8 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ of Zn) obtained from Spectrascan (Teknolab A.S. Dröbak, Norway). Cut-off membrane filters (10 kDa) were obtained from Amicon-Ultra (Millipore Iberica, Madrid). The Bovine samples were provided from a farm and extracted by a veterinarian and the human samples were provided by Hospital Central of Asturias (Spain).

HPLC-ICP-MS

HPLC separations were carried out using a dual piston liquid chromatographic pump (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a sample injection valve Rheodyne, Model 7125 (Cotati, CA, USA), fitted with a 50 μ L injection loop, an anion-exchange column, Mono-Q HR 5/5 (50 \times 5 mm id, Pharmacia, Amersham Bioscience, Spain) and a Diode Array Detector (DAD) from Agilent Technologies (1100 Series, Waldbron, Germany). All the mobile phases were passed through a scavenger column (25 \times 0.5 mm id) placed between the pump and the injection valve in order to eliminate possible metal traces present as contamination in the mobile phases. The scavenger column was packed with Kelex-100 (Schering, Germany) impregnated silica C₁₈ material (20 μ m particle size) (Bondapack, Waters Corporation, Massachusetts, USA). Specific atomic detection of Cu and Zn in the column effluent was performed using an inductively coupled plasma mass spectrometer Model 7500 from Agilent Technologies (Agilent, Tokyo, Japan) equipped with a collision cell system (ICP-(ORS)-MS).

Preparation of the isotopically enriched Cu, Zn-superoxide dismutase

The isotopically enriched SOD was prepared using a combination of previously reported methods by Deitrich *et al.*¹⁷ and Yamazaki *et al.*²⁸ In brief, the commercial protein standard (either human or bovine) was dissolved in 10 mM ammonium acetate pH 6.3. These stock solutions were then transferred into 3-mL dialysis membranes with a 5000 Da molecular weight cut-off (MWCO) (Spectra/Pro CE Flot-A-Lyzer, Spectrum Europe B.V.). Enzyme solutions were dialyzed against a 20 mM ammonium acetate buffer (pH 6.3) for 1 h at room temperature to remove low molecular weight impurities in order to obtain

a purified stock solution. For preparation of the apo-enzyme, the solution was dialyzed against 20 mL of 20 mM ammonium acetate buffer (pH 3.1) containing 5 mM EDTA for 2h. Then, the dialysis buffer was changed to a 20 mM ammonium acetate buffer (pH 3.1) without EDTA (to remove the EDTA). After 2 h, the dialysis buffer was replaced with 20 mM ammonium acetate buffer (pH 6.8) and allowed to stand for 1 h, giving the apo-enzyme solution. The structure of the apo-enzyme was confirmed by MALDI-TOF (Voyager-DETM STR Biospectrometry™ Workstation, Applied Biosystems, Langen, Germany) and by ESI-MS (LC/MSD Trap System, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).²⁴

The resulting apo-enzyme solution was then remetalated with the isotopically enriched ⁶⁵Cu and ⁶⁸Zn solutions. For incorporation of the isotopically enriched metals into the apo-enzyme, an excess of ⁶⁸Zn and ⁶⁵Cu solutions were added sequentially at different pH. First, the Zn²⁺ ion solution (100 µL of 1009.8 µg mL⁻¹, pH 3.9) was added to the apo-enzyme solution and incubated at 37 °C for 4 h, thereafter mixed with the Cu²⁺ ion solution (250 µL of 604.4 µg mL⁻¹, pH 8.2) and incubated at 37 °C overnight. Afterwards, the remetalated SOD1 was passed through 10 KDa cut-off filter and thoroughly washed with Milli-Q water to remove the excess of Cu and Zn. Finally the structure of the labeled species was confirmed by MALDI-TOF (intact protein analysis and trypsin digested protein). For trypsin digestion, 50 µL of the sample were treated with 50 µL urea (prepared 12 mol L⁻¹ in 0.1 mol L⁻¹ Tris-HCl) and 5 µL dithiothreitol (DTT, 0.2 mol L⁻¹) to reduce the protein disulfide bonds. The mixture was centrifuged for 1 min at 700 g and was left to react for 1 h at room temperature. After this time, 20 µL of iodoacetamide (IAA, 0.2 mol L⁻¹) were added in order to protect SH groups and the mixture was left to stand for one hour at room temperature. Finally, 20 µL more of DTT were added to consume the excess of IAA and after one hour 775 µL of Milli-Q water and 100 µL trypsin were incorporated. This cocktail was kept for 15 h at 37 °C and then the pH adjusted at about 6 with acetic acid. The peptides obtained with this procedure were then cleaned by Zip-Tip 18 and immobilized in the MALDI plate using α-ciano as matrix. The sequence coverage of the obtained peptides was 99%.

Real sample treatment

Bovine red blood cells and human red blood cells, collected with sodium citrate as anticoagulant, were hemolyzed by addition of ice cold distilled water (4.5 mL per 0.5 mL of cells) and shaking for 3 min using a vortex mixer at room temperature. After that a solution of ethanol-chloroform (2 : 1) (3.75 mL per 0.5 mL of cells) was added in order to accomplish the haemoglobin precipitation. After manual shaking for 5 min, the mixture was centrifuged (12000g, 4 °C, 1 h). At last, the samples were passed through a 10 KDa cut-off filter for cleaning and preconcentration. In the case of using bovine SOD as internal standard to quantify the SOD in human red blood cells, an aliquot of the bovine Cu, Zn-SOD standard was added to the human sample of red blood cells after lysis and the sample treatment protocol was then followed. The results obtained for SS-IDA-ICP-MS were done in bovine red blood cells as proof of concept. For this purpose, an aliquot of the isotopically enriched SOD standard

from bovine erythrocytes was added to the sample of bovine red blood cells after lysis and the previously described sample protocol was followed. For the calculation mass bias has been corrected by using the exponential model and dead time corrections are not necessary since the instrument performs automatic dead time correction.

Results and discussion

The use of bovine Cu, Zn-SOD as internal standard for human SOD1 analysis

A good internal standard should fulfil a number of prerequisites: 1) it should be as similar to the analyte in structure as possible; 2) the retention time in the chromatographic system should be as close as possible to the retention time of the analyte when an elution gradient has been used (thus, nebulization/ionization effects due to changes in the mobile phase composition can be addressed); and 3) it should be absent from the sample and chromatographically separated from interfering compounds. In this work we have evaluated the possibility of using Cu, Zn-SOD from bovine erythrocytes as an internal standard for the quantification of the SOD1 extracted from human erythrocytes. For this purpose, the first step was the evaluation of the chromatographic set-up for the separation of the two investigated standards (bovine and human standards of SOD1) under the used

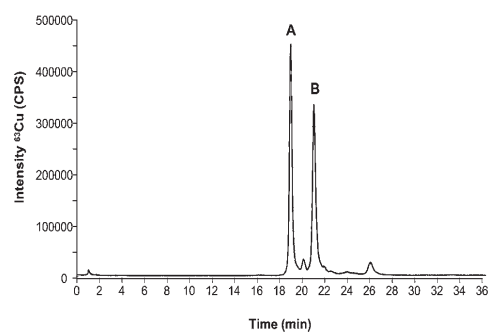


Fig. 1 Copper profile by HPLC-ICP-MS corresponding to a mixture of a standard of bovine SOD1 (A) and human SOD1 (B) in an approximated ratio of 1 : 1 (400 ng mL⁻¹ as Cu or 100 µg mL⁻¹ as SOD).

Table 1 ICP-MS and HPLC operating conditions used in the work

ICP-MS Parameters	
Instrument	Agilent 7500 CE (ORS)
Rf power	1500 W
Nebulizer gas flow rate	1 L min ⁻¹
m/z monitored	⁶⁵ Cu, ⁶⁵ Cu
Hexapole bias	-15 V
QP bias	-13 V
HPLC Parameters	
Column	Mono Q HR 5/5 Anion exchange
Injection volume	50 µL
Flow rate	1 mL min ⁻¹
Mobile phases	A) 10 mM Tris-Acetic Acid B) A + 250 mM ammonium acetate
Gradient	Gradient 0–100% B in 30 min (linear)

chromatographic conditions. Fig. 1 shows the obtained chromatogram for a mixture 1 : 1 of both species injected into the HPLC-ICP-MS system (the separation conditions are collected in Table 1). As can be seen, two main species can be observed in the ^{63}Cu trace at 19 and 21 min, respectively. By injecting the individual compounds it was possible to realize that the first eluting peak (19 min) corresponds to the bovine standard while the one at 21 min corresponds to the human standard. Such good separation is due to the different isoelectric points of bovine (4.95) and human (4.75) Cu, Zn-SOD associated to the slightly different amino acid sequence. The small impurity eluting between both peaks at approximately 20 min belongs to the bovine standard and could always be detected. Once the separation between both standards was achieved, the next step was the evaluation of SOD1 from bovine erythrocytes as internal standard for quantification of human SOD1.

For this purpose, two independent aliquots of the human erythrocytes lysate (5 mL) were taken and one of them was spiked with the bovine SOD1 standard (100 μL of 0.05 mg mL^{-1} as SOD). The obtained results are shown in Fig. 2 where it is possible to observe a good separation between species in the extracted sample without addition of internal standard (Fig. 2A, black trace) with the main peak (at 21 min) corresponding to the retention time of human erythrocytes SOD1. Fig. 2B (blue trace) shows the resulting chromatogram after spiking bovine SOD1

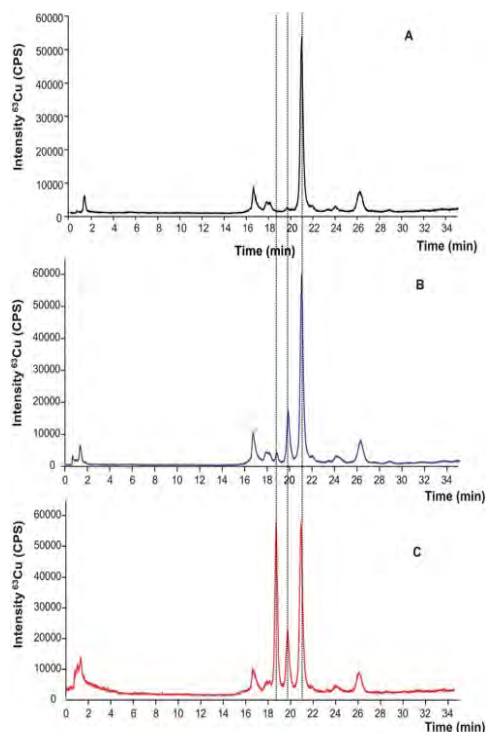


Fig. 2 Copper signal of the SOD1 extracted from human red blood cells by HPLC-ICP-MS before spiking (A) spiked after lysis with 100 μL of 0.05 mg mL^{-1} bovine SOD (B) and spiked twice: after lysis and at the time of injection with bovine SOD1 at the same concentration (C).

immediately after the lysis. In this case, the bovine standard expected to elute at 19 min can be barely detected while a new unknown Cu-containing species appears at 20 min (not present in the original sample chromatogram of Fig. 2A). In order to verify a possible shift on the retention time of the bovine standard due to the sample matrix, the same sample of Fig. 2B was spiked again with the bovine standard and re-injected in the chromatographic system. The resulting profile is shown in Fig. 2C where a good separation of the three species could be observed at 19, 20 and 21 min respectively. These initial results pointed out a possible species degradation of the bovine standard during sample preparation, since the human SOD1 present in the sample (eluting at 21 min) showed very similar intensity in all the obtained chromatograms.

Therefore, this approach could be used for quantification only if the species degradation occurs to the same extent in the SOD from the sample and from the standard that does not seem to be this case. Since this fact has not been confirmed, these results prove the limited capability of using bovine SOD1 standard as an internal standard to quantify the SOD in human real samples. Therefore, the alternative strategy of species specific isotope dilution was evaluated further on.

Species-specific isotope dilution for human SOD1 analysis

The first part of the study was devoted to the optimization of the synthesis of the labeled species by combining previously published methodologies as described in the procedures section.^{17,28} Fig. 3 shows the chromatographic profiles of the isotopes ^{63}Cu and ^{65}Cu of isotopically enriched SOD from bovine erythrocytes. The study was done first by using the bovine SOD1 standard since it can be obtained as lyophilized powder at higher concentration than the human standard. After the conditions were optimized, the remetallation protocol was also applied to the human SOD1 (data not shown). The signals of remetallated enzyme shown in Fig. 3 revealed an altered isotopic abundance when compared with those of natural standard of Cu, Zn-SOD and the isotope ratio is $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu} = 0.015 \pm 0.002$ (similar to the

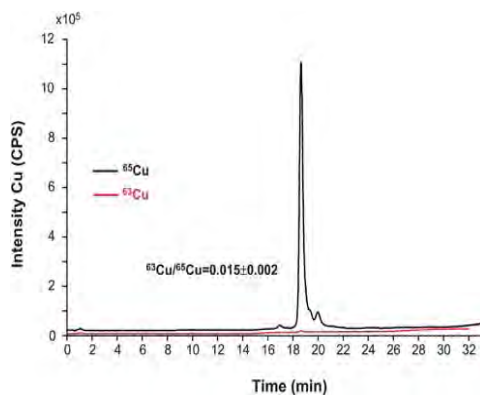


Fig. 3 Chromatogram of the isotopically enriched bovine SOD1 obtained in the laboratory for the two copper isotopes and the corresponding isotope ratio on the SOD1 peak (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SOD obtained by dilution of the synthesized standard).

^{65}Cu standard used for the enrichment). It is important to observe that the demetallation–remetallation process has not degraded the protein since no other species can be seen in the chromatogram.

The quantification of the bovine standard of isotopically enriched SOD1 was achieved by reversed post-column isotope dilution analysis using the previously developed procedure.²⁴ For this purpose a solution containing 20 ng mL^{-1} of natural Cu (^{63}Cu , 69.15%) was continuously pumped by an arm of a T piece and mixed with the eluent coming from the chromatographic column. After calculating the isotope ratio on each point of the chromatogram and applying the on-line isotope dilution equation (ESI†), it is possible to obtain the mass flow chromatogram and calculate the ng of Cu associated to the main peak in the chromatogram. This permits the indirect quantification of the SOD concentration provided that the metal/protein stoichiometry is maintained along the whole procedure (input quantities for the calculation are given in the ESI†).^{24,25} The concentration obtained was $0.17 \pm 0.01\text{ mg mL}^{-1}$ of Cu (2.7 mM) ($n = 3$ injections of the diluted synthesized standard) for the isotopically enriched SOD1. Metal concentrations can be converted into protein concentrations since the stoichiometry of the protein–metal complex is known for both metals (ratio of 2 : 1 metal per protein). Therefore, the final concentration of isotopically enriched SOD1 is $43.5 \pm 2.6\text{ mg mL}^{-1}$ (1.36 mM) ($n = 3$ injections). Additional experiments for spike characterization by activity measurements were not conducted since Cu has proved to be quantitatively recovered from the column and it is the catalytic center of SOD.²⁴

In order to address if possible metal exchange between species (natural and isotopically labelled) we initially mixed the natural SOD1 standard from bovine erythrocytes (previously quantified by post column IDA) with the isotopically labelled synthesized species in an approximated 1 : 1 ratio. Together with metal exchanging, this experiment can be also used to corroborate the method accuracy by calculating the concentration of the natural SOD1 by species specific IDA. The concentration of Cu in the natural standard of SOD1 by this method was determined to be about $1.72 \pm 0.06\text{ mg mL}^{-1}$ (27 mM or 436 mg mL^{-1} SOD) ($n = 3$ injections), a value which agrees well with the concentration obtained for the same standard by post-column IDA ($1.74 \pm 0.03\text{ mg mL}^{-1}$ Cu, $n = 3$ injections). Therefore we have proven that it should be possible to use this SOD isotopically enriched in ^{65}Cu for the quantification of the SOD in bovine real samples since no isotopic exchange between SOD1 species can be observed. The analytical performance characteristics of the SS-IDA method are summarized in Table 2 and compared with those provided by ELISA assay. It is noteworthy that ELISA provides better sensitivity than the proposed strategy although the linear dynamic range of the SS-IDA method makes it more suitable for

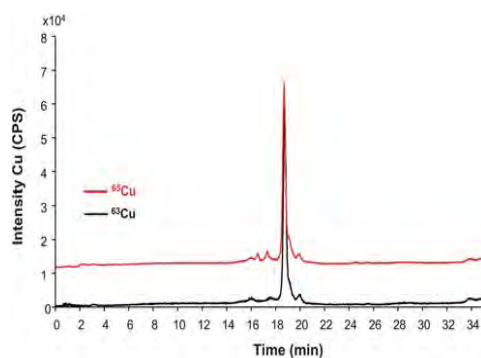


Fig. 4 Chromatogram of the extracted SOD1 from bovine red blood cells by HPLC-ICP-MS after spiking with isotopically enriched bovine SOD1 right after lysis and used for quantitative purposes (approximately $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ as SOD). Red trace is off-axis (10000 cps) for clarity.

analysis of SOD1 in red blood cells (with concentration levels in the ppm range). In the case of serum, where the reported SOD1 concentrations are in the ng mL^{-1} , the ELISA assay could be more suitable.

Once we proved that the isotopically enriched SOD could be used as a standard for species-specific IDA-ICP-MS, we applied this compound to quantify the concentration of SOD1 in erythrocytes extracted from a cow blood sample. For this aim, the isotopically labeled spike is added to the cells right after lysis and the sample processed as described in the sample treatment section. The mixture is then injected in the HPLC-ICP-MS systems. The copper chromatogram obtained is shown in Fig. 4 and as can be seen, no species degradation seems to be observed (differently to the case of using bovine SOD1 as internal standard for human SOD1). After application of the species specific isotope dilution equation (shown in the ESI†) to the peak areas in the chromatogram, the final concentration of Cu in the sample turned out to be $19.05 \pm 0.03\text{ ng mL}^{-1}$ (31 mM or $4.83\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ as SOD) ($n = 3$ injections) or $18 \pm 1\text{ ng mL}^{-1}$ ($n = 3$ independent lyses). Similarly, the SOD1 from the cow red blood cells was quantified by means of post-column IDA. In this case the Cu obtained results ($13.62 \pm 0.02\text{ ng mL}^{-1}$ or $3.46\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ as SOD, $n = 3$ injections) are lower than those obtained by species-specific IDA. Since the column recovery has proved to be quantitative for Cu and for Cu-SOD (but not for Zn) in previous studies,²⁴ the losses (about 30%) might occur during hemoglobin precipitation and sample preconcentration steps. In any case, the obtained results corroborate the IDA principle that the earlier the spike is mixed with the sample, the more errors along the sample preparation/isolation can be compensated.

Table 2 Analytical features of the proposed SS-IDA method for Cu, Zn-SOD quantification compared with ELISA assays for the same analyte

Method	LOD ^a /ng mL ⁻¹	LOQ ^a /ng mL ⁻¹	%RSD (3 injections)	%RSD (3 lysis)	Linear range/ng mL ⁻¹ ^a
SS-IDA HPLC-ICP-MS	100	800	2	10	100–5000
ELISA	0.04	0.2	3	5	0.08–5

^a Expressed as concentration of SOD.

Conclusions

Two different strategies have been evaluated for quantification of Cu, Zn-SOD in red blood cells. The first one makes use of the bovine SOD species as an internal standard to quantify the human SOD1. Such a method has proved to be feasible (without observing species degradation) when the sample and the spike are mixed just before injection in the chromatographic system. However, when the spiking is conducted at the beginning of the sample treatment procedure, specific degradation of the bovine species used as standard with respect to the human SOD can be observed with time. Therefore, the next step was the evaluation of using the same species as internal standard but isotopically enriched and then species specific isotope dilution analysis. In this regard, the optimization of the isotopically enriched species synthesis permitted to obtain a fairly pure isotopically labelled standard of bovine SOD1 to be used for further quantitative studies. The SS-ID-ICP-MS allow the quantitative determination of Cu, Zn-SOD in real red blood cells of bovine samples and compensate for losses during sample preparation that turned out to be of about 30% of the total SOD1. Since lysis is a process that affects cell walls, the fact of adding the protein spike (already solubilised) before or after lysis does not affect the protein recovery from the sample. On the other hand, once the protein from the red blood cells is solubilised in the water media and the spike solution of isotopically enriched SOD is added, both species have proved to behave in the same way. Such results are in agreement with previous standard addition measurements in human SOD1 that revealed that while the chromatography used was fully quantitative the rest of the sample preparation steps were somehow prone to losses. In any case, the appropriate use of the species specific IDA method could be compared with AQUA strategies. However, a very important difference is that AQUA peptides are added into the sample after tryptic digestion of the protein to the corresponding peptides, thus, any losses of the procedure before this point can not be taken into account. When using SS-IDA, the spiking can be done right after lysis (or even before) and thus, all the losses during sample handling will have an affect in the same way on the sample protein and the spike and will therefore, be compensated.

Acknowledgements

The authors want to thank the Spanish Ministry of Science for funding through the projects CTQ2007-60206/BQU and CTQ2006-02309, cofinanced through EU Feder Program. C.L.D./J.F. thanks the College of Physical Sciences and EPSRC GR/S98689/01 for financial support. The support with the

instruments of Agilent Technology and Thermo-Fisher is also acknowledged.

References

- 1 K. H. Cheesman and T. F. Slater, *Br. Med. Bull.*, 1998, **49**, 481–93.
- 2 N. H. Zawia, D. K. Lahiri and F. Cardozo-Pelaez, *Free Radical Biol. Med.*, 2009, **46**, 1241–1249.
- 3 M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazura and J. Telsler, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, **39**, 44–84.
- 4 T. Sato, Y. Yamamoto, T. Nakanishi, K. Fukada, F. Sugai, Z. Zhou, T. Okuno, S. Nagano, S. Hirata, A. Shimizu and S. Sakoda, *J. Neurol. Sci.*, 2004, **218**, 79–83.
- 5 J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6049–6055.
- 6 J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson and D. C. Richardson, *J. Mol. Biol.*, 1982, **160**, 181–217.
- 7 A. Shimizu, T. Nakanishi, M. Kishikawa and A. Miyazaki, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, **776**, 15–30.
- 8 P. Picotti, O. Rinner, R. Stallmach, F. Dautel, T. Farrah, B. Domon, H. Wenschuh and R. Aebersold, *Nat. Methods*, 2010, **7**, 43–46.
- 9 A. Concetti, P. Massei, G. Rotilio, M. Brunori and E. A. Rachmilewitz, *J. Lab. Clin. Med.*, 1976, **87**, 1057–1064.
- 10 M. Minami and M. Yoshikawa, *Clin. Chim. Acta*, 1979, **92**, 337–342.
- 11 T. Adachia, M. Nakamura, H. Yamadab, A. Futenmab, K. Katob and K. Hirano, *Clin. Chim. Acta*, 1994, **229**, 123.
- 12 P. Mondola, M. Bifulco, R. Serù, T. Annella, M. R. Ciriolo and M. Santillo, *FEBS Lett.*, 2000, **467**, 57–60.
- 13 K. Pawlaka, D. Pawlakb and M. Mysliwieca, *Clin. Biochem.*, 2005, **38**, 700–705.
- 14 Y. Sun, L. W. Oberley and Y. Li, *Clin. Chem.*, 1988, **34**, 497–500.
- 15 K. Iwase, A. Nagasaka, K. Kato, A. Itoh, S. Jimbo, Y. Hibi, N. Kobayashi, H. Yamamoto, T. Seko and K. Miura, *J. Surg. Res.*, 2006, **135**, 150–155.
- 16 L. M. Wang, J. S. Becker, Q. Wu, M. F. Oliveira, F. A. Bozza, A. L. Schwager, J. M. Hoffman and K. A. Morton, *Metallomics*, 2010, **2**, 348–353.
- 17 C. L. Dietrich, A. Raab, B. Pioselli, J. Thomas-Oates and J. Feldmann, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8381–8390.
- 18 C. L. Deitrich, S. Braukmann, A. Raab, C. Munro, B. Pioselli, E. M. Krupp, J. E. Thomas-Oates and J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 3515.
- 19 T. Geiger, J. Cox, P. Ostasiewicz, J. R. Wisniewski and M. Mann, *Nat. Methods*, 2010, **7**, 383–385.
- 20 M. E. Del Castillo, M. Montes-Bayón and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2006, **82**, 8218–8226.
- 21 M. Hoppler, C. Zeder and T. Walczyk, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7368–7372.
- 22 C. F. Harrington, D. S. Vidler, M. J. Watts and J. F. Hall, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 4034–4041.
- 23 J. Meija and Z. Mester, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 115–125.
- 24 Y. Nuevo-Ordóñez, M. Montes-Bayón, E. González-Blanco and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2387–2394.
- 25 A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. R. Fernández de la Campa, J. Ruiz Encinar and J. Bettmer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 3–16.
- 26 A. Pereira, J. Ruiz Encinar, M. Carrascal, J. Abian and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1777–1787.
- 27 H. Yang, Y. Y. Zhang and U. Poschl, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 879–886.
- 28 Y. Yamazaki and T. Takao, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8246–8252.

D.3.5 Referencias

- [1] L. Tang y J.W Eaton. *Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials*. J. Exp. Med. 178 (1993) 2147-2156.
- [2] A. Cross y O.T.G. Jones. *Enzymic mechanisms of superoxide production*. Biochim. Biophys. Acta. 1057 (1991) 281-298.
- [3] K.B. Beckman y B.N. Ames. *The free radical theory of aging matures*. Physiol. Soc. 78 (1998) 547-581.
- [4] M. Rojkind, J.A. Domínguez-Rosale, N. Nieto y P. Greenwel. *Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses*. Cell. Mol. Life Sci. 59 (2002) 1-20.
- [5] S.C. Marcus, D.E. Mark, D. Miral y L. Joseph. *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J. 17 (2003) 1195-214.
- [6] D. Mukul, B. Kishore, P.R. Naveen y M.S. Lalit. *Oxidative damage of plasma proteins and lipids in epidemic dropsy patients: Alterations in antioxidant status*. Biochim. Biophys. Acta. 1722 (2005) 209-17.
- [7] E.R. Stadtman. *Protein oxidation and aging*. Science. 257 (1992) 1220-1224.
- [8] C.G. Fraga, M.K. Shigenaga, J.W. Park, P. Degan y B.N. Ames. *Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine*. Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 4533-4537.
- [9] B. Halliwell y J.M.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford. (1999) 530-533.
- [10] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur y J. Telser. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*, Int. J. Biochem. Cell. Biol. 39 (2007) 44-84
- [11] B. Halliwell, R. Aeschbacht, J. Lorigert y O. I. Aruoma. *The Characterization of antioxidants*. Food Chem. Toxic. 33 (1995) 601-617.
- [12] B.N. Ames, M.K. Shigenaga y T.M. Hagen. *Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90 (1993) 7915-7922.
- [13] J.M. Mates. *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. Toxicol. 153 (2000) 83-104.
- [14] J.M. McCord y I. Fridovich. *Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J. Biol. Chem. 244 (1969) 6049-6055.
- [15] R.A. Jacob. *The integrated antioxidant system*. Nutr. Res. 15 (1995) 755-66.
- [16] H. Dahlstrand, A. Stark, L. Anissian y N.P. Hailer. *Elevated Serum concentrations of cobalt, chromium, nickel, and manganese after Metal-on-Metal alloarthroplasty of the hip: a prospective randomized study*. J. Arthrop. 24 (2009) 837-845.
- [17] C. Anderson, S.J. MacDonald, S. Sritulanondha, A. Thompson, D. Naudie y A. Charles. *Metal ion levels after Metal-on-Metal total hip arthroplasty: a randomized trial*. Clin. Orthop. Relat. Res. 467 (2009) 101-111.
- [18] T.D. Richardson, S.J. Pineda, K.B. Strenge, T.A. Van Fleet, M. MacGregor, J.C. Milbrandt, J.A. Espinosa y P. Freitag. *Serum Titanium Levels After Instrumented Spinal Arthrodesis*. 33 (2008) 792-796.
- [19] S. Goldstein. *The Fenton Reagents*. Free Radic. Biol. Med. 15 (1993) 435-45.

- [20] F. Haber y J. Weiss. *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Proc. R. Soc. Ser. A. 147 (1934) 332-52.
- [21] S. Kawanishi, Y. Hiraku, M. Murata y S. Oikawa. *The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis*. Free Radic. Biol. Med. 32 (2002) 822-832.
- [22] B. Halliwell. *Free radicals and antioxidants - quo vadis?*. Trends Pharmacol. Sci. 32 (2011) 125-130.
- [23] A. Pérez de la Cruz, J. Abilés y J. Castaño Pérez. *Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías*. Nutr. Clin. Med. 2 (2008) 45-64.
- [24] T.M. Dawson y V.L. Dawson. *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science. 302 (2003) 819-22.
- [25] M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews y E. Masliah. *Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Neromol. Med. 4 (2003) 21-36.
- [26] T. Adachia, M. Nakamura, H. Yamada, A. Futenmab, K. Katob y K. Hirano. *Increase of urinary extracellular-superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate*. Clin. Chim. Acta. 229 (1994) 123-131.
- [27] P. Mondola, M. Bifulco, R. Seru, T. Annella, M. R. Ciriolo y M. Santillo. *Presence of Cu,Zn superoxide dismutase in human serum lipoproteins*. FEBS Lett. 467 (2000) 57-60.
- [28] Z.P. Cheremisina, T.B. Suslova y L.G. Korkina. *Chemiluminescent determination of superoxide dismutase activity*. 1 (1994) 22-23.
- [29] L.W. Oberley y D.R. Spitz. *Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue*. Meth. Enzymol. 105 (1984) 457-464.
- [30] E.F. Elstner, R.J. Youngman y W. Osswald. *Superoxide Dismutase. Methods of Enzymatic Assay*. Verlag Chemie. 3 (1983) 293-302.
- [31] S. Marklund y G. Marklund. *Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase*. Eur. J. Biochem. 47 (1974) 469-474.
- [32] B.H. Gary, L.H. Lee y J.F. Wyman. *An automated analysis for superoxide dismutase enzyme activity*. J. Anal. Toxicol. 9 (1985) 36-39.

*E. CONCLUSIONES/
CONCLUSIONS*

Las conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. La optimización de las metodologías analíticas para la determinación de elementos traza (Cr, Co, Mo y Mn) en fluidos biológicos, basadas en el empleo de ICP-MS de alta resolución, ha permitido establecer diferencias significativas entre los niveles de concentración encontrados para algunos elementos (en particular Cr, Co y Ti en la orina y Cr y Ti en sangre total), en pacientes portadores de implantes ortopédicos de cadera M/M respecto a los de los individuos control.

2. Se ha puesto a punto una metodología para la determinación de Ti en suero humano (a niveles de ultratrazas), mediante estrategias de dilución isotópica empleando ICP-MS de alta resolución y trabajando a poder de resolución 4000 ($m/\Delta m$). Dicha metodología ha permitido evitar las interferencias poliatómicas que afectan a este elemento en fluidos biológicos.

3. Los extremadamente bajos límites de detección alcanzados con la metodología propuesta para Ti ($0.05 \mu\text{L}^{-1}$), han permitido establecer por primera vez, los niveles de Ti sérico en la población (40 muestras) no portadora de implantes ortopédicos ni dentales, pero posiblemente expuesta a otras fuentes de Ti como son los cosméticos y productos de higiene personal.

4. La metodología propuesta se ha aplicado al análisis del Ti sérico en pacientes con implantes intramedulares, fabricados con diferentes aleaciones de este metal. Los resultados obtenidos han mostrado diferencias significativas en todos los grupos (implantes de húmero, tibia y fémur), respecto a los niveles de Ti encontrados en los individuos control. Debido a que estos implantes se utilizan para fijar fracturas en individuos jóvenes, la problemática de estudiar el efecto biológico a largo plazo (de bajas dosis de Ti circulante), ha de ser abordada en el futuro.

5. Se han desarrollado metodologías de "screening" multielemental, mediante estrategias integradas de cromatografía de líquidos empleando ICP-

E. CONCLUSIONES

MS como detector y espectrometría de masas molecular (MALDI-TOF). Dichas metodologías se han aplicado para evaluar el posible transporte de los elementos traza, liberados por los implantes en estudio, a través del torrente circulatorio (por las proteínas séricas). Los resultados obtenidos en suero mostraron que el Mn aparece enlazado a la proteína transferrina, mientras que el Co se enlaza preferentemente a la albúmina (proteína sérica más abundante). En el caso del cromo se observó, mediante incubación previa del suero con Cr (III) que este se enlazaba preferentemente también a la transferrina mientras que la incubación con Cr (VI) no aportó resultados significativos.

6. En el caso del Ti, se ha puesto a punto una metodología de especiación cuantitativa en suero a nivel fisiológico (tanto en individuos control como en pacientes) mediante estrategias de dilución isotópica post-columna empleando ^{47}Ti enriquecido como trazador y empleando HPLC con ICP-MS de alta resolución acoplado en-línea.

7. Los resultados obtenidos en la especiación cuantitativa de Ti en suero (tanto de controles, a los cuales se les realizó una etapa previa de preconcentración, como de pacientes portadores de implantes) mediante análisis de dilución isotópica post columna, han mostrado que la transferrina es la única responsable del transporte y distribución sistémica del Ti en el organismo, observando que el 98% del Ti presente en el suero está unido a dicha proteína.

8. Estudios sobre las formas moleculares de la proteína ponen de manifiesto que el Ti se enlaza exclusivamente al lóbulo correspondiente al N-terminal de la transferrina, pudiendo ser esta la vía de entrada del Ti a las células, mediante los receptores de Tf presentes en la superficie celular.

9. Se ha establecido una metodología analítica para evaluar si la presencia de Ti circulante en pacientes cambia la expresión de proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa de Cu y Zn (Cu,Zn-SOD). Para ello se han desarrollado estrategias de cuantificación del enzima Cu,Zn-SOD a

través de la medida del Cu enlazado, mediante análisis por dilución isotópica tanto inespecífico (post columna IDA) como específico (SS-IDA). A través de la concentración de Cu, ha sido posible establecer una correlación entre la concentración de enzima (Cu,Zn-SOD) y su actividad enzimática medida mediante el método de la autooxidación del pirogalol.

10. La aplicación de estas metodologías a la cuantificación de Cu,Zn-SOD en eritrocitos de pacientes con elevada concentración de Ti circulante (portadores de implantes ortopédicos), reveló cambios en la concentración y en la actividad del enzima Cu,Zn-SOD en dichos pacientes comparados con los controles. Este hecho puede relacionarse con el ya conocido incremento del estrés oxidativo debido a la presencia de metales (p.ej. Ti) procedentes de implantes metálicos.

The main conclusions that can be derived from the present Ph. D Thesis are summarized in the following points:

1. The optimization of analytical methodologies for the determination of trace elements (Cr, Co, Mo y Mn) in biological fluids, based on the use of high resolution ICP-MS, has permitted to establish significant differences between the concentration levels encountered for some of these elements (particularly Cr, Co and Ti in urine and Cr and Ti in blood) in patients carrying M/M total hip arthroplasty in respect to the levels found for these elements in the control group.

2. A new strategy for Ti determination at ultra-trace level based on isotope dilution analysis has been developed and successfully applied to human serum samples using high resolution ICP-MS working at medium resolution ($m/\Delta m$ 4000). The combination of HR-ICP-MS and isotope dilution analysis has permitted to achieve precise and accurate determination of Ti by avoiding the polyatomic interferences that affect this element in biological fluids.

3. The extremely low detection limits reached for Ti ($0.05 \mu \text{L}^{-1}$) with the proposed methodology has allowed to establish, for the first time, the levels of Ti in the serum of the population ($n=40$ samples) non-exposed to this element by Ti-containing metal implants but possibly exposed to other Ti sources such as cosmetics or personal care products.

4. The analysis of Ti in serum of patients with implants manufactured with different Ti alloys revealed significant differences between the exposed groups (total hip arthroplasty, humerus, tibial, and femur implants) and the control group. Particularly in the case of intramedullary Ti nails and considering that these implants are used to fix fractures in young people, the long-term biological effects of low Ti concentrations release should be addressed in the future.

E. CONCLUSIONS

5. Multielemental screening of the metals released by the implants and their association to biomolecules has been accomplished by using “integrated” mass spectrometric strategies including elemental detection based on ICP-MS after liquid chromatographic separations and molecular mass spectrometry (MALDI-TOF). The results obtained in serum have revealed that serum Mn seems to be associated to the protein transferrin, while Co binds, preferably, to the albumin (the most abundant protein in serum). In the particularly case of Cr, *in vitro* experiments showed that in spiked serum solutions Cr (III) associates also to transferrin, while the incubation with Cr (VI) did not provide any conclusive result.

6. In the case of Ti, a new methodology for metal quantitative speciation in serum at physiological levels (both for control individuals and patients exposed to Ti-based metal implants) has been developed. This methodology, based on the use of post-column isotope dilution analysis (or species unspecific IDA) makes use of ^{47}Ti as isotopically labeled spike and HPLC coupled on-line to HR-ICP-MS for separation and detection of Ti associated to protein fractions that turned out to be the fraction corresponding to transferrin.

7. The results obtained on the Ti quantitative speciation in serum (both for control individuals, with a previous preconcentration step, and patients carrying Ti implants) have shown that the protein transferrin is the only one responsible for the Ti transport and systemic delivery through the body. Moreover, it could be observed that 98% of the Ti present in the serum is bounded to such protein in both groups of samples.

8. The studies carried out on the molecular forms of transferrin have shown that even when the protein presents two sites for metal binding, Ti is preferentially bound to the terminal N-lobe of the protein, so the complex ($\text{Fe}_c\text{Ti}_N\text{-Tf}$) could be the way Ti gets transported into cells through the Tf receptors (TfR) usually located on the cell walls.

9. An analytical methodology for evaluating if the detected Ti levels in serum yielded changes in the expression of oxidative stress related proteins (like Cu,Zn-Superoxide dismutase, Cu,Zn-SOD) has been established. For this aim the quantification of Cu,Zn-SOD through the Cu measurements using isotope dilution analysis (both post-column IDA and species-specific IDA) has been conducted. Once the concentration of Cu was obtained, it was possible to establish a correlation between the concentration of Cu,Zn-SOD and its activity, using the pyrogallol auto-oxidation assay.

10. The quantification of Cu,Zn-SOD in human erythrocytes revealed significant differences on the concentration of this enzyme in patients with higher Ti levels (patients with orthopedic implants) with respect to control individuals. The observed changes in the concentration of Cu,Zn-SOD could be correlated with changes on the protein activity. Such results could be related to the documented increase of oxidative stress due to the presence of metals (like Ti) released by metallic implants in cellular systems.

*F. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS/
SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH*

Los trabajos futuros que se proponen a luz de los resultados obtenidos son los siguientes:

A) Estudio de la liberación de metales por parte de otros implantes ortopédicos

En los últimos años las patologías lumbares son tratadas con más frecuencia a través de la cirugía (artrodesis lumbar), mediante el uso de implantes, con el objetivo de conseguir una sólida fusión que anule la movilidad del espacio entre vértebras. Se puede hacer colocando un injerto de hueso entre ambas vértebras ("artrodesis no instrumentada") o usando además unas placas metálicas para fijar ambos cuerpos vertebrales ("artrodesis instrumentada"). La artrodesis de la columna lumbar es una alternativa quirúrgica en los casos de inestabilidad raquídea, espondilolistesis ístmica y/o degenerativa, artropatía facetaria, inestabilidad postoperatoria, herniación discal recurrente y escoliosis degenerativa entre otros.

La artrodesis instrumentada consiste en un sistema de fijación rígido, adaptando 2 barras, una a cada lado de la columna sujetas mediante tornillos intrapediculares, generalmente de Ti o alguna de sus aleaciones, que garantizarán una perfecta estabilización de los segmentos. Aunque todavía existen pocos estudios publicados, también existen evidencias de la presencia de iones metálicos, fundamentalmente Ti, en los fluidos y tejidos circundantes de los individuos sometidos a operaciones de artrodesis vertebral. Por tanto, se propone el estudio de la liberación de Ti en estos pacientes sometidos a artrodesis vertebral.

B) Efectos generados tras el tratamiento con bisfosfonatos en la liberación del Ti por parte de implantes dentales y ortopédicos

Un aspecto esencial para la biocompatibilidad de los implantes dentales y ortopédicos de Ti es la necesidad de oseointegración (una conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado y la superficie de un

F. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

implante sometido a carga funcional). La elección del Ti en este tipo de implantes odontológicos se debe a que este metal en contacto con la atmósfera se oxida en milisegundos, transformándose su superficie en óxido de titanio. Dicho óxido se comporta como un material bio-inerte, es decir que no produce rechazo. Sin embargo, recientemente se han encontrado casos de osteonecrosis después de la colocación de implantes dentales y por tanto una inhibición de la oseointegración en pacientes siguiendo tratamientos con bifosfonatos. Los bifosfonatos, son un grupo de fármacos que se utilizan ampliamente para el tratamiento de enfermedades con reabsorción ósea, como la osteoporosis, las metástasis óseas, procesos oncológicos, la enfermedad de Paget, etc. Aunque no haya una evidencia directa de que el implante dental (de Ti) causa la osteonecrosis en pacientes que siguen terapias con bifosfonatos, los datos obtenidos hasta el momento se fundamentan en la experiencia clínica de odontólogos, los cuales han observado dicha patología en pacientes implantados que siguen dichos tratamientos. Por tanto, se estudiará el efecto de estas terapias en la liberación de metales.

C) Estudios de citotoxicidad del Ti liberado

Los estudios de *citotoxicidad* del Ti, que se define como la evaluación *in-vitro* de los riesgos toxicológicos utilizando cultivos celulares, también han de llevarse a cabo. Estos tests proporcionan información sobre, la viabilidad y muerte celular; el estado de las membranas y orgánulos celulares; así como acerca de la síntesis de ADN y de proteínas. Resultados recientes, han puesto de manifiesto que la presencia de partículas de TiO_2 en ciertos sistemas celulares aumenta el estrés oxidativo (el desequilibrio entre la generación de especies reactivas del oxígeno y su eliminación por la defensa antioxidante del organismo), que se encuentra relacionado con el desarrollo de numerosas enfermedades. Para la monitorización de los posibles efectos del Ti sobre el estado redox celular, se emplea la medida de ciertas enzimas antioxidantes como son: la superóxido dismutasa (SOD1) y la glutatión peroxidasa (GPx).

F. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Ambas enzimas se encuentran presentes en el citosol celular y cambios en su expresión indican alteraciones del sistema redox celular. Por tanto, la monitorización de la citotoxicidad, así como de las alteraciones de los enzimas antioxidantes en cultivos celulares expuestos al Ti, será imprescindible para la caracterización de los efectos de este elemento sobre la salud.

On the light of the results obtained in this Ph.D. Thesis, the following research topics can be proposed:

A) Study of the metals released from other metallic implants (spinal arthrodesis)

In the late years lumbar pathologies had been frequently treated by surgery (spinal arthrodesis), using implants to achieve a solid fusion between vertebra. This operation consists of implanting a bone graft between the vertebra “non instrumented arthrodesis” or a metallic sheet to fix both vertebra “instrumented arthrodesis”. The spinal arthrodesis is a surgical alternative to treat cases of spinal instability, spondilolisthesis isthmic and/or degenerative, arthropathy facet, post-surgery instability, herniation, recurrent disc, and degenerative scoliosis, among others.

The instrumented arthrodesis consists of a solid fusion of the vertebra with two bars, one at each side of the column, fixed by screws, in most of the cases they are made of titanium or titanium alloys, which guarantee the perfect stabilization between the segments. In spite of the limited number of published results, there are some evidences of the presence of metallic ions, mainly titanium ions, into the surrounding tissues and also into the biological fluids of the patients carrying spinal implants. For this reason, the study of the Ti released into serum of patients with instrumented spinal arthrodesis is a natural extension of the conducted work.

B) Effects of titanium release from orthopaedic and dental implants in patients treated with bisphosphonates therapies.

A crucial requirement to guarantee the biocompatibility of dental and orthopaedic implants is the osseointegration (a direct connection between the implant surface and the surrounding bone). Ti is chosen in this kind of implants due its chemicals qualities: this metal can be oxidized extremely fast in the air forming a very protective titanium oxide film. This titanium oxide film behaves

F. SUGGESTIONS FOR FUTURE RESEARCH

as an inert material. Nevertheless, nowadays some cases of osteonecrosis after dental implantation have been reported in patients treated with bisphosphonates therapies. Therefore, an inhibition of osseointegration could be occurring in those patients. Bisphosphonates are a group of drugs widely used to treat diseases like bone resorption, osteoporosis, bone metastasis, oncological processes, paget diseases, etc. Although there is no clear evidence that Ti is responsible to produce osteonecrosis in patients who have been treated with bisphosphonates, the current information is based on the experience of odontologists who had been observed this pathology (osteonecrosis) in patients treated with bisphosphonates. Consequently, the influence of bisphosphonate treatment on the metal release will be study.

C) Studies of titanium cytotoxicity once it is released from the implants.

The cytotoxicity studies of Ti, which is defined as in vitro evaluation of the toxicological risks using cellular cultures will be carried out. These kinds of tests provide knowledge about the viability and cellular dead, the state of the cell membranes and also about the synthesis of DNA and proteins. Some current results have highlighted the increase of oxidative stress (unbalance between the production of ROS and their elimination by the antioxidant system) in certain cellular systems in presence of TiO₂ nanoparticles. This is why the monitorization of the cytotoxicity and also the disorders of antioxidant enzymes in cellular cultures exposed to Ti will be essential to characterize the effects of this element to human health.