



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

Departamento de Química Física y Analítica

# ANÁLISIS DE PEQUEÑAS ESTRUCTURAS MEDIANTE ICP-MS: DESARROLLO METODOLÓGICO Y APLICACIONES

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

Roberto Álvarez-Fernández García

TESIS DOCTORAL

Oviedo, 2020



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

Department of Physical and Analytical Chemistry

# ICP-MS ANALYSIS OF SMALL OBJECTS: METHOD DEVELOPMENTS AND SELECTED APPLICATIONS

Doctorate Program: Chemical, Biochemical and Structural  
Analysis and Computational Modelling

Roberto Álvarez-Fernández García

DOCTORAL THESIS

Oviedo, 2020



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Análisis de pequeñas estructuras mediante ICP-MS: Desarrollo metodológico y aplicaciones	Inglés: ICP-MS Analysis of Small Objects: Method Developments and Selected Applications
2.- Autor	
Nombre: Roberto Álvarez-Fernández García	DNI/Pasaporte/NIE: ·
Programa de Doctorado: Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado (Universidad de Oviedo)	

### RESUMEN (en español)

Dos células producidas a partir de la misma célula precursora durante la mitosis pueden mostrar diferencias en sus genomas, transcriptomas y proteomas después de varias divisiones. Esta heterogeneidad puede ser la causa de diferentes enfermedades y se puede apreciar en muchos aspectos de la célula, entre los que se encuentra su composición elemental. En este sentido, los metales desempeñan un papel clave en importantes procesos biológicos. Por ello, el desarrollo de estrategias analíticas que permitan el estudio de la variación del metaloma en células individuales es de vital importancia en campos como la biotecnología o la farmacología. Debido a los grandes avances en la sensibilidad y la mejora en cuanto a límites de detección, la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se postula como una excelente candidata para el análisis de pequeñas estructuras a nivel individual. La caracterización de nanopartículas metálicas individuales mediante el método *single particle* ICP-MS ha servido como punto de partida para el análisis de células individuales, un área de investigación muy activa en la que se puede apreciar un especial interés en el desarrollo de sistemas para la introducción de muestras a la fuente de ionización que mejoren la eficiencia de transporte de dichas estructuras al plasma.

Por todo ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de metodologías analíticas basadas en ICP-MS para el análisis de pequeñas estructuras como células y nanopartículas de forma individual. Para ello, se han



utilizado equipos de ICP-MS con distintos analizadores de masa equipados con diferentes sistemas de introducción de muestra, fundamentalmente aquellos basados en la nebulización neumática, persiguiendo un aumento en la eficiencia de transporte respecto a los sistemas convencionales. Estos se han utilizado en diversas aplicaciones que implican diferentes modelos celulares, desde células humanas hasta levaduras o bacterias. Por un lado, se ha evaluado el contenido intracelular de elementos constitutivos de las células (Cu, P), así como la incorporación celular de metalofármacos como el cisplatino o nanopartículas metálicas en cultivos celulares. Por otro lado, se han desarrollado estrategias que han permitido investigar la formación de nanopartículas biogénicas en las células tras su lisis, o la degradación de nanopartículas metálicas en tejidos animales. Los resultados más importantes de estos estudios se resumen a continuación:

- Se ha desarrollado y optimizado un sistema de introducción de muestra mediante nebulización neumática para la introducción de células individuales. Tras su caracterización utilizando células tratadas con un complejo de Tb-DTPA, se ha aplicado a la evaluación cuantitativa de la incorporación de cisplatino en células de cáncer de ovario sensibles y resistentes al fármaco (A2780 y A2780cis, respectivamente), permitiendo distinguir directamente entre ambas líneas celulares. El mismo sistema permitió evaluar el contenido de cobre en esporas individuales de la bacteria *Streptomyces coelicolor*.
- Se ha utilizado un sistema de introducción de células de alta eficiencia (*High-Efficiency Cell Introduction System*, HECIS) en un ICP-MS con analizador de tipo triple cuadrupolo para estudiar la incorporación de selenio en células individuales de levaduras crecidas en medios de cultivo enriquecidos con diferentes formas de este elemento. Tras la ruptura mecánica de las células, este mismo sistema junto con otras técnicas complementarias como HPLC-ICP-MS y TEM, han permitido investigar la presencia de nanopartículas biogénicas de selenio en las células de levadura con un amplio rango de tamaños.
- Estas tres técnicas complementarias (SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS y TEM) se han



aplicado al estudio de la degradación de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato en hígado de rata, tras su inyección por vía intraperitoneal en el animal.

- Se ha desarrollado una metodología basada en el uso de un ICP-MS con analizador de tiempo de vuelo (TOF) que ha permitido comparar la incorporación de nanopartículas de oro con diferente recubrimiento en células individuales de adenocarcinoma colorrectal humano. El uso de este analizador de masas ha permitido distinguir entre nanopartículas libres y asociadas a las células. Paralelamente, se ha evaluado la citotoxicidad de las nanopartículas y su impacto en el metaboloma celular a través de un experimento de metabolómica dirigida basado en una separación por cromatografía de interacción hidrofílica con detección por espectrometría de masas de alta resolución, utilizando un espectrómetro de masas tipo orbitrap con fuente de electrospray (HILIC-HR-MS).

#### **RESUMEN (en Inglés)**

Two cells that have just been produced from the same precursor cell during mitosis can exhibit, after several divisions, differences in their genomes, transcriptomes and proteomes. This heterogeneity can be the cause of different diseases and can be appreciated in many cell aspects, including its elemental composition. In this sense, metals play a key role in important biological processes such as gene expression or in catalytic mechanisms. Thus, the development of analytical strategies that allow to study the cell to cell variation in terms of the metallome is of vital importance. Due to the improvements of detection sensitivity and



limits of detection, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is an exceptional candidate for the analysis of small objects within the fields of biotechnology or pharmacology. The characterization of individual metallic nanoparticles by the single particle ICP-MS principle has served as a starting point for the analysis of individual cells, a very active research area in which there is a special interest in the development of new strategies for the introduction of cell samples to the ionization source with maximum transport efficiency.

Therefore, the general objective of this Doctoral Thesis was the development of analytical strategies based on ICP-MS for the analysis of small objects such as single cells and nanoparticles. To address this aim, ICP-MS instruments with different mass analysers and equipped with new sample introduction systems were used, pursuing an increase in transport efficiency compared to conventional ICP-MS systems. This instrumentation has been used in several applications involving different cell types. On the one hand, the intracellular content of constitutive cellular elements such as copper or phosphorus has been evaluated, as well as the cellular uptake of metallodrugs like cisplatin or metallic nanoparticles in cell cultures. On the other hand, analytical strategies were developed to investigate the presence of biogenic nanoparticles in cells after their lysis, or the degradation of metallic nanoparticles in animal tissues. The main results of these studies are summarized below:

- A sample introduction system based on pneumatic nebulization has been developed and optimized for the introduction of single cells. After its characterization using Tb-DTPA-treated cells, it has been applied to the quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and drug resistant ovarian cancer cells (A2780 and A2780cis, respectively), allowing to directly distinguish between both cell lines. The same system has also shown the ability to quantify the copper content in single spores of *Streptomyces coelicolor*.
- A High-Efficiency Cell Introduction System (HECIS) has been fitted in a triple quadrupole ICP-MS to study the uptake of selenium in single yeast cells grown in culture media enriched with different forms of this element. After the mechanical lysis of the cells, the same system, together with other complementary techniques such as HPLC-ICP-MS and TEM, have shown great



potential to investigate the presence of biogenic selenium nanoparticles in the yeast cells in a wide range of sizes.

- These three complementary techniques (SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS and TEM) have been applied to study the degradation of citrate-stabilized gold nanoparticles in rat liver, after intraperitoneal injection into the animal.
- A single cell method based on a time-of-flight (TOF) ICP-MS has been developed, which has permitted to compare the uptake of gold nanoparticles with different surface modifications into single cells of human colorectal adenocarcinoma cell lines. The use of this mass analyser has made it possible to distinguish between free and cell associated nanoparticles. The cytotoxicity of the nanoparticles was also evaluated and a targeted metabolomics experiment based on a hydrophilic interaction liquid chromatography with high resolution mass spectrometry detection was carried out, using an orbitrap mass spectrometer with an electrospray source (HILIC-HR-MS). This method has shown its usefulness in the evaluation of the changes in the cellular metabolome produced by exposure to gold nanoparticles with different coatings.





# Índice

---

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Análisis de células individuales .....	3
1.2. Principio del análisis de células individuales mediante ICP-MS .....	7
1.2.1. Sistemas de introducción de muestra.....	11
1.2.1.1. Introducción de células individuales mediante nebulización neumática .....	12
1.2.1.2. Sistemas de generación de microgotas para introducción de células individuales .....	23
1.2.1.3. Análisis de células individuales mediante ablación láser (LA-ICP-MS) .....	30
1.2.2. Sistemas de ICP-MS empleados en la detección de células individuales: analizadores de masa.....	36
1.2.2.2. Citometría de masas (CyTOF).....	40
1.2.3. Resolución temporal: tiempo de integración .....	44
1.2.4. Calibración y eficiencia de transporte .....	49
1.2.5. Influencia de las características celulares en su análisis mediante SC-ICP- MS .....	54
1.3. Single cell ICP-MS: Aplicaciones.....	61
1.3.1. Medida de elementos constitutivos .....	62
1.3.2. Medida de incorporación de metalofármacos .....	66
1.3.3. Estudios de incorporación de nanopartículas.....	72
1.3.3.1. Nanopartículas artificiales .....	75
1.3.3.2. Nanopartículas naturales o biogénicas.....	79
1.3.4. Medida de componentes celulares mediante el uso de anticuerpos marcados.....	83
2. OBJETIVOS.....	87

2.1. Objetivos generales.....	89
2.2. General Objectives .....	91
3. EXPERIMENTAL .....	93
3.1. Instrumentación .....	95
3.1.1. Equipos de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) .....	95
3.1.2. Equipo de espectrometría de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI-MS).....	98
3.1.3. Equipos de cromatografía de alta resolución (HPLC) .....	99
3.1.4. Instrumentación complementaria .....	100
3.2. Materiales, reactivos y disoluciones .....	101
3.3. Muestras .....	103
3.4. Procedimientos Experimentales .....	106
3.4.1. Digestión ácida de muestras de cultivos celulares .....	106
3.4.2. Lisis de levaduras .....	106
3.4.3. Ensayos de citotoxicidad .....	107
3.4.4. Extracción de metabolitos de cultivos celulares.....	108
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	111
4.1. Desarrollo y caracterización de un método basado en nebulización neumática para la introducción de células individuales al ICP-MS .....	113
4.1.1. Sistema de Introducción de muestra y condiciones experimentales ....	114
4.1.2. Optimización del sistema de introducción de muestra .....	115
4.1.3. Validación del método desarrollado.....	125
4.1.4. Aplicación al análisis de células tratadas con cisplatino .....	129
4.1.5. Aplicación del método a la determinación de cobre en esporas de Streptomyces coelicolor. ....	134
4.1.5.1. Determinación de cobre total en esporas y micelio.....	136

4.1.5.2. Determinación de cobre en esporas individuales de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	141
4.2. Análisis de pequeñas estructuras mediante técnicas analíticas complementarias basadas en ICP-MS.....	145
4.2.1. Estrategias analíticas basadas en ICP-TQ-MS para estudiar la incorporación de selenio y presencia de nanopartículas biogénicas en células de levadura. ....	145
4.2.1.1. Evaluación cuantitativa de la incorporación de selenio en células individuales de levadura. ....	148
4.2.1.2. Estudio de la presencia de nanopartículas biogénicas de selenio en células de levadura. ....	156
4.2.2. Empleo de técnicas complementarias basadas en ICP-MS para el estudio de la degradación de nanopartículas de oro en tejidos animales.....	171
4.2.2.1. Administración de las nanopartículas de oro. ....	173
4.2.2.2. Extracción de nanopartículas de oro de tejidos animales.....	173
4.2.2.3. Análisis de nanopartículas de oro mediante SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS y TEM. ....	174
4.3. Evaluación del impacto celular generado por la exposición a nanopartículas de oro con diferentes recubrimientos en cultivos celulares. ....	181
4.3.1. Cultivos celulares y tratamiento de las células.....	184
4.3.2. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad de las nanopartículas de oro.....	185
4.3.3. Caracterización de las nanopartículas de oro mediante SP-ICP-MS.....	189
4.3.4. Evaluación cuantitativa de la incorporación de nanopartículas de oro en células individuales mediante SC-ICP-TOF-MS. ....	194
4.3.5. Efecto de la exposición celular a AuNPs en el metaboloma celular mediante HILIC-HR-MS. ....	203
5. CONCLUSIONES .....	211
5.1. Conclusiones generales.....	213

5.2. General conclusions .....	216
5.3. Sugerencias para trabajos futuros .....	218
6. BIBLIOGRAFÍA.....	221
7. PUBLICACIONES DERIVADAS.....	267
7.1. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral.....	269
7.2. Otras publicaciones .....	270

# Índice de Figuras

---

Figura 1. Posibles distribuciones de una especie química entre las células individuales de una población celular. Adaptada de Amable y colaboradores. <sup>12</sup> .....	5
Figura 2. Representación esquemática de la señal obtenida en ICP-MS con el tiempo para: (a) Analito disuelto y (b) suspensión de células o nanopartículas.....	10
Figura 3. Diagrama del sistema de introducción de muestra convencional de un ICP-MS. Adaptado de Caruso y colaboradores. <sup>47</sup> .....	13
Figura 4. Diagrama general de los nebulizadores: (a) concéntrico, (b) de flujo cruzado y (c) de flujo paralelo. Adaptada de Canals y colaboradores. <sup>48</sup> .....	14
Figura 5. Imágenes de la punta de los nebulizadores: (a) HEN, (b) MicroMist, (c) Microconcéntrico y (d) nebulizador neumático concéntrico convencional. Extraído de Todolí y colaboradores. <sup>51</sup> .....	16
Figura 6. Imágenes de cámaras de nebulización (a) de paso doble o tipo Scott, (b) de paso simple y (c) ciclónica.....	17
Figura 7. Diagrama esquemático del sistema HECIS para la introducción de células con alta eficiencia. Figura adaptada de Groombridge y colaboradores. <sup>64</sup> .....	20
Figura 8. Diagrama del generador de microgotas piezoeléctrico ( $\mu$ DG). (a) Esquema del dispensador de microgotas. (b) Esquema del sistema de desolvatación. Figura adaptada de Shigeta y colaboradores. <sup>78</sup> .....	24
Figura 9. Fotografía de las gotas generadas con un cabezal de 50 $\mu$ m utilizando (a) modo de pulso simple (gota de 67 $\mu$ m) y (b) modo de pulso triple (23 $\mu$ m). Figura extraída de Shigeta y colaboradores. <sup>78</sup> .....	25
Figura 10. Diagrama esquemático del diseño del chip microfluídico propuesto por Wang y colaboradores <sup>82</sup> para la encapsulación de células en microgotas y su acoplamiento al ICP-MS para el análisis de células individuales. ....	28
Figura 11. Representación esquemática del generador de microgotas desarrollado por Wei y colaboradores. <sup>84</sup> .....	30
Figura 12. (A) Imagen de campo claro de los fibroblastos NIH/373 fijados, (B) Imagen de LA-ICP-MS para la distribución de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ (distribución de AuNPs)	

dentro de las células, superpuesta a la imagen anterior y (C) Variación de la señal de $^{197}\text{Au}^+$ en la línea 20 de la imagen de LA-ICP-MS. Extraída de Pisonero y colaboradores. <sup>88</sup> .....	33
Figura 13. Representación esquemática de la técnica de oversampling. Adaptada de Mueller y colaboradores. <sup>45</sup> .....	34
Figura 14. Representación de las señales de $^{157}\text{Gd}$ obtenidas mediante LA-ICP-MS en (A) 25 células marcadas con Gd-DTPA-BMA, (B) 25 células no marcadas y representación de las células fijadas (C) antes de la ablación y (D) después de la ablación. Adaptada de Managh y colaboradores. <sup>103</sup> .....	35
Figura 15. Representación del efecto del uso de celdas de colisión-reacción en la duración de los eventos obtenidos en el análisis de nanopartículas y células individuales mediante ICP-MS. Adaptado de Bolea y colaboradores. <sup>122</sup> .....	40
Figura 16. Protocolo de trabajo general en citometría de masas. Adaptado de Bendall y colaboradores. <sup>133</sup> .....	43
Figura 17. Efecto del tiempo de integración en la media de células/nanopartículas individuales. ....	46
Figura 18. Efecto del tiempo de integración en la relación señal/ruido de la medida. Figura adaptada de Liu y colaboradores. <sup>149</sup> .....	48
Figura 19. Relación entre el tiempo de integración y: (a) relación señal/ruido, (b) probabilidad de eventos múltiples, (c) número de puntos por eventos. Extraída de Miyashita y colaboradores. <sup>65</sup> .....	49
Figura 20. Diagrama de una célula animal típica y detalle de la membrana celular donde se aprecia su estructura de bicapa lipídica con proteínas asociadas. ....	56
Figura 21. Estructura de la pared celular de las levaduras. Adaptada de Anwar y colaboradores. <sup>184</sup> .....	58
Figura 22. Diferencias entre la envoltura celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Adaptada de Egan y colaboradores. <sup>189</sup> .....	59
Figura 23. Dependencia del color de nanomateriales de Au en función de su tamaño y forma. Adaptado de Dreaden y colaboradores. <sup>230</sup> .....	72
Figura 24. (a) Estructura del complejo DOTA-lantánidio modificado con el grupo maleimida, (b) reacción entre el grupo maleimida y grupos tiol. ....	84
Figura 25. Medida de $^{31}\text{P}$ mediante ICP-MS en modo triple cuadrupolo utilizando $\text{O}_2$ como gas de reacción.....	97

Figura 26. Ejemplo de derivatización de grupos tiol con N-etilmaleimida (NEM) con el glutatión. Adaptado de Ortmayr y colaboradores. <sup>304</sup> .....	109
Figura 27. (a) Fotografía del nebulizador Enya Mist y la cámara de nebulización. (b) Representación esquemática del nebulizador Enya Mist.....	114
Figura 28. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de una suspensión de nanopartículas de oro de 30 nm en 10 % metanol y (b) influencia de la concentración de metanol en la sensibilidad y la eficiencia del transporte. ....	117
Figura 29. Estructura del complejo Tb-DTPA. ....	118
Figura 30. Imágenes de microscopio óptico de células A2780 (a) en PBS, (b) en 10 % de metanol, y (c) tras pasar ser nebulizadas por el nebulizador Enya Mist diluidas en 10 % metanol. Las células fueron observadas con el microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes obtenidas mediante la cámara Nikon DS-Fi1. Las barras de escala son de 10 $\mu\text{m}$ . ....	119
Figura 31. Resultados de la medida de $^{159}\text{Tb}$ mediante SC-ICP-MS para diferentes concentraciones de células A2780 tratadas con 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Tb-DTPA: (a) $2,5 \times 10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ , (b) $5 \times 10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ , (c) $1,0 \times 10^5$ células $\text{mL}^{-1}$ y (d) $3,0 \times 10^5$ células $\text{mL}^{-1}$ .....	120
Figura 32. Análisis por citometría de flujo de la mezcla entre partículas fluorescentes (A) y células A2780 (B). ....	123
Figura 33. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de una suspensión de $5 \times 10^4$ células $\text{mL}^{-1}$ monitorizando (a) $^{56}\text{Fe}$ , (c) $^{159}\text{Tb}$ y los correspondientes histogramas de la distribución de la intensidad de las señales de (b) $^{56}\text{Fe}$ y (d) $^{159}\text{Tb}$ .....	123
Figura 34. Representación gráfica de la eficiencia de transporte frente la concentración celular de la suspensión introducida. ....	125
Figura 35. Resultados de la medida de $^{159}\text{Tb}$ mediante SC-ICP-MS de células A2780 tratadas con (a) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y (b) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Tb-DTPA.....	125
Figura 36. (a) Medida de $^{159}\text{Tb}$ mediante FIA-ICP-MS y (b) recta de calibrado obtenida para patrones inorgánicos de concentración creciente de Tb, donde aparece la ecuación de la recta de regresión por mínimos cuadrados y su coeficiente de correlación $R^2$ . ....	128
Figura 37. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780 tratadas en diferentes condiciones: (a) blanco (metanol 10 %), (b) células control no tratadas, (c)	

células tratadas con 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino y (d) células tratadas con 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino.....	130
Figura 38. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780 recogidas utilizando el método CellStripper™ y previamente tratadas con (a) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino y (b) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino. ....	131
Figura 39. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780cis, resistentes a cisplatino, tratadas con (a) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino y (b) 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino.....	132
Figura 40. Recta de calibrado obtenida para patrones inorgánicos de Pt.....	132
Figura 41. Diagramas de cajas del contenido de Pt en células individuales de las líneas A2780 y A2780cis tratadas con 10 y 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cisplatino. ....	133
Figura 42. Rectas de calibrado obtenida para la medida de $^{63}\text{Cu}$ y $^{65}\text{Cu}$ utilizando patrones de Cu entre 0 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	138
Figura 43. Concentración de cobre citosólico durante el desarrollo de <i>S.coelicolor</i> . ....	139
Figura 44. Concentración de cobre citosólico en: (a) esporas durmientes y (b) esporas germinadas y micelio. En ambos casos se utilizó la cepa silvestre (Wt), mutante SCO2730::Tn5062, y cepa silvestre obtenida en medio suplementado con 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4$ (Wt80Cu).....	140
Figura 45. Variación de la concentración intracelular de cobre en cultivos de 8 h en función de la concentración de cobre en el medio de cultivo. ....	141
Figura 46. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de esporas de <i>Streptomyces coelicolor</i> : (a) cepa silvestre (Wt) y (b) esporas obtenidas de un medio suplementado con 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4$ (Wt80Cu).....	142
Figura 47. Histograma que muestra el contenido de Cu citosólico en esporas individuales de <i>S.coelicolor</i> obtenidas de medio SFM suplementado con 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4$ (Wt80Cu).....	143
Figura 48. Ampliación de un único evento celular de (a) $^{63}\text{Cu}$ medido sin gas en la CRC y (b) $^{31}\text{P}$ medido como $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ tras la presurización de la CRC con $\text{O}_2$ . Medidas realizadas con un tiempo de integración de 100 $\mu\text{s}$ . ....	151



Figura 49. Resultados de la medida de SC-ICP-MS de levaduras SELM-1 monitorizando (a) $^{31}\text{P}$ (como $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b) $^{80}\text{Se}$ (como $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms.....	152
Figura 50. Representación gráfica de la eficiencia de transporte frente a la concentración de células de levadura utilizada.....	153
Figura 51. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de la muestra Levadura1 monitorizando $^{31}\text{P}$ (como $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y $^{80}\text{Se}$ (como $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) antes (a) y después de añadir (b) selenometionina y (c) selenito sódico a la suspensión celular.....	155
Figura 52. Contaje de levaduras mediante citometría de flujo (a) antes y (b) después de la lisis con partículas de vidrio y su posterior filtración. ....	157
Figura 53. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de una suspensión de nanopartículas de selenio (a) antes y (b) después del tratamiento mecánico con partículas de vidrio. ....	158
Figura 54. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 monitorizando (a) $^{31}\text{P}$ (como $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b) $^{80}\text{Se}$ (como $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms, después de la lisis celular.....	159
Figura 55. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra SELM-1 monitorizando (a) $^{31}\text{P}$ (como $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b) $^{80}\text{Se}$ (como $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms, después de la lisis celular.....	160
Figura 56. Distribución de tamaños obtenida en el lisado de la muestra Se-levadura1 mediante SP-ICP-MS.....	161
Figura 57. Imágenes de TEM de la suspensión obtenida tras la lisis celular y filtración de la muestra Se-levadura1. (a) Algunas partículas detectadas con diámetros entre 80 y 250 nm aproximadamente (barra de escala de 50 nm), y (b) Imagen de TEM de alta resolución donde se aprecia la presencia de partículas con diámetros entre 3,5 y 10,5 nm. ....	162
Figura 58. Espectro de EDX correspondiente a la imagen de HR-TEM que se muestra en la Figura 57(b), que indica la presencia de selenio. ....	163
Figura 59. Cromatograma de HPLC-ICP-MS que muestra la separación de AuNPs de 30 nm (negro), 10 nm (rojo) y especies de oro de bajo peso molecular (azul).....	165
Figura 60. Cromatograma de HPLC-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 tras la lisis celular, antes (azul) y después (verde) de la reacción con sulfito. ....	166

Figura 61. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 después de la lisis celular: (a) antes y (b) después de la reacción con sulfito sódico, con un tiempo de integración de 5 ms.....	168
Figura 62. Cromatograma de HPLC-ICP-MS de la muestra SELM-1 tras la lisis celular, antes (azul) y después (verde) de la reacción con sulfito.....	169
Figura 63. Imágenes de HR-TEM de la fracción cromatográfica recogida de la muestra SELM-1.....	169
Figura 64. Imagen de HR-TEM de las AuNPs inyectadas (tamaño nominal 40 nm). .....	174
Figura 65. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la suspensión de AuNPs de 40 nm ( $50 \text{ ng L}^{-1}$ ), y (b) distribución de tamaños resultante.....	176
Figura 66. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de las AuNPs extraídas de hígado de rata, y (b) distribución de tamaños resultante. ....	177
Figura 67. Imagen de HR-TEM de las AuNPs extraídas de hígado de rata.....	178
Figura 68. Cromatograma de HPLC-ICP-MS del extracto de hígado.....	179
Figura 69. Representación de AuNPs modificadas en su superficie con PEG-COOH y PEG-NH <sub>2</sub> .....	185
Figura 70. Resultados de los ensayos de citotoxicidad (a) alamar blue y (b) rojo neutro para la línea celular HT-29 tratada con diferentes concentraciones de AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> . ....	187
Figura 71. Resultados de los ensayos de citotoxicidad (a) alamar blue y (b) rojo neutro para la línea celular Caco-2 tratada con diferentes concentraciones de AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> . ....	188
Figura 72. Representación esquemática del sistema de introducción de células de alta eficiencia de Glass Expansion. <sup>391</sup> .....	190
Figura 73. Resultados de la medida mediante SP-ICP-TOF-MS de partículas de poliestireno dopadas con lantánidos: (a) eventos obtenidos para una suspensión de 33000 partículas mL <sup>-1</sup> , y (b) ampliación de un evento.....	191
Figura 74. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de suspensiones de (a) AuNP-PEG-COOH y (b) AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> . ....	192
Figura 75. Distribuciones de tamaños obtenidas mediante SP-ICP-MS para (a) AuNP-PEG-COOH y (b) AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> . ....	193

Figura 76. Resultados de la medida mediante SC-ICP-TOF-MS de células HT-29 (a) control y (b) tratadas con 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> .....	196
Figura 77. Ampliación de un evento celular de células HT-29 tratadas con AuNP-PEG-COOH en el que se puede ver la señal de <sup>31</sup> P y de <sup>197</sup> Au. ....	197
Figura 78. Diagramas de cajas que muestran el contenido de Au (fg) observado en células individuales de las líneas HT-29 y Caco-2 tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs recubiertas de PEG con grupos -COOH y -NH <sub>2</sub> .....	198
Figura 79. Diagramas de cajas que muestran el número de AuNPs incorporadas por célula en los diferentes tratamientos. ....	201
Figura 80. Porcentaje de células que incorporaron AuNPs en los diferentes tratamientos. ....	202
Figura 81. Análisis de componentes principales de las líneas celulares HT-29 y Caco-2 en todas las condiciones de tratamiento (control y tratadas con 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> y AuNP-PEG-COOH).....	208
Figura 82. Mapa de calor de los diferentes metabolitos encontrados en los diferentes tratamientos de las HT-29 y Caco-2. ....	209



# Índice de Tablas

---

Tabla 1. Valores certificados del material de referencia certificado de levadura enriquecida en selenio SELM-1. <sup>293</sup> .....	105
Tabla 2. Parámetros instrumentales de las medidas realizadas en el ICP-MS Agilent 7700. ....	115
Tabla 3. Comparación de la eficiencia de transporte de células para la medida de <sup>56</sup> Fe como elemento constitutivo y <sup>159</sup> Tb como marcador celular. ....	124
Tabla 4. Parámetros instrumentales de las medidas de SC-ICP-TQ-MS realizadas en el equipo iCAP TQ ICP-MS. ....	150
Tabla 5. Contenido de fósforo y selenio en células individuales de diferentes muestras de levadura (valores expresados en fg por célula) .....	154
Tabla 6. Límites de detección (en masa y tamaño) para la medida de selenio con diferentes tiempos de integración.....	160
Tabla 7. Condiciones de la separación cromatográfica con detección por ICP-TQ-MS. ....	164
Tabla 8. Parámetros instrumentales del ICP-MS acoplado al sistema HPLC y en modo single particle.....	175
Tabla 9. Parámetros instrumentales de las medidas de SP-ICP-TQ-MS realizadas en el equipo icpTOF2R. ....	190
Tabla 10. Valores promedio y rango de masa de Au obtenida mediante SC-ICP-TOF-MS en células individuales de las líneas HT-29 y Caco-2 tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs recubiertas de PEG con grupos -COOH y -NH <sub>2</sub> . ....	198
Tabla 11. Valores promedio y rango de número de AuNPs incorporadas por célula en los diferentes tratamientos. ....	200
Tabla 12. Parámetros instrumentales de las medidas de metabolómica dirigida mediante HILIC-HR-MS. ....	207



## Lista de acrónimos y abreviaturas

---

μDG	Microdroplet generator (generador de microgotas)
AAS	Atomic absorption spectroscopy (espectrometría de absorción atómica)
AB	Ensayo de citotoxicidad alamar blue
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF4	Asymmetrical flow field-flow fractionation (fraccionamiento en campo de flujo de flujo asimétrico)
AFM	Atomic force microscopy (microscopía de fuerza atómica)
ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
ARN	Ácido ribonucleico
CRC	Collision/reaction cell (celda de colisión/reacción)
CTC	Célula tumoral circulante
DESI	Desorption electrospray ionization (ionización por desorción con electrospray)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EASI-MS	Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (espectrometría de masas mediante ionización por spray sónico ambiental)
EDX	Energy dispersive X-ray spectroscopy (espectroscopía de rayos X de energía dispersiva)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionization (ionización por electrospray)
FBS	Fetal bovine serum (suero fetal bovino)
FDA	Food and Drug Administration (Agencia de medicamentos y alimentos)
FIA	Flow injection analysis (análisis mediante inyección en flujo)
FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance (espectrometría de masas de resonancia ión ciclotrón con transformada de Fourier)

GC	Gas chromatography (cromatografía de gases)
GSH	Glutación
GSSG	Disulfuro de glutación
HECIS	High efficiency cell introduction system (Sistema de introducción de células de alta eficiencia)
HEN	High-Efficiency nebulizer (nebulizador de alta eficiencia)
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography (cromatografía líquida de interacción hidrofílica)
HPCN	High performance concentric nebulizer (nebulizador concéntrico de alto rendimiento)
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HR	High resolution (alta resolución)
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry (espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo)
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (espectrometría óptica de acoplamiento inductivo)
IMC	Imaging mass cytometry
KED	Kinetic energy discrimination
LA	Laser ablation (ablación láser)
LADE	Liquid assisted droplet ejection
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
LDI-MS	Laser desorption ionization mass spectrometry (espectrometría de masas mediante ionización por desorción mediante láser)
MALDI-MS	Matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry (espectrometría de masas mediante desorción e ionización asistida por matriz)
MC-ICP-MS	Equipo de ICP-MS multicolector
MCN	Nebulizador microconcéntrico
MM	Nebulizador MicroMist



MS	Mass spectrometry (espectrometría de masas)
NEM	N-etilmaleimida
NIST	National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología)
NM	Nanomaterial
NMR	Nuclear magnetic resonance (resonancia magnética nuclear)
NP	Nanopartícula
NR	Ensayo de citotoxicidad neutral red (rojo neutro)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Disolución tampón de fosfato salino)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PFH	Perfluorohexano
Q (TQ)	Analizador de masas de cuadrupolo (triple cuadrupolo)
QD	Quantum dot (punto cuántico)
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SC-ICP-MS	Single cell ICP-MS
SCoPe-MS	Single-cell proteomics by mass spectrometry
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEC	Size-exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaños)
SEM	Secondary electron multiplier (Multiplicador de electrones secundarios)
SEM	Scanning electron microscopy (microscopía electrónica de barrido)
SF	Sector Field (analizador de doble enfoque)
SIMS	Secondary ion mass spectrometry (espectrometría de masas de iones secundarios)
SP-ICP-MS	Single particle ICP-MS
SPR	Surface Plasmon Resonance (Resonancia de plasmón superficial)
TBS	Tris buffered saline (Disolución tampón de Tris-HCl)

TEM	Transmission electron microscopy (microscopio electrónico de transmisión)
TOF	Time-of-flight (tiempo de vuelo)
XRD	X-ray diffraction (difracción de rayos X)
XRF	X-ray fluorescence (fluorescencia de rayos X)

---

# ***1. Introducción***

---



## 1.1. Análisis de células individuales

Las células son las unidades más básicas de actividad fisiológica de todos los organismos vivos. Entender como las células individuales procesan la información y se adaptan y responden a perturbaciones es un desafío fundamental ya que las diferencias entre células siempre están presentes en cierto grado en cualquier población celular. El mismo tipo de células puede diferir en los niveles de expresión de diferentes biomoléculas incluso bajo las mismas condiciones fisiológicas y estímulos externos. Esta heterogeneidad celular en la mayoría de los sistemas celulares está bien documentada, tanto teóricamente<sup>1</sup> como experimentalmente<sup>2</sup> y hace que el comportamiento conjunto de una población pueda no ser representativo del comportamiento de las células individuales que la componen. Sin embargo, la mayoría del conocimiento actual se basa en medidas realizadas en conjuntos o poblaciones celulares.

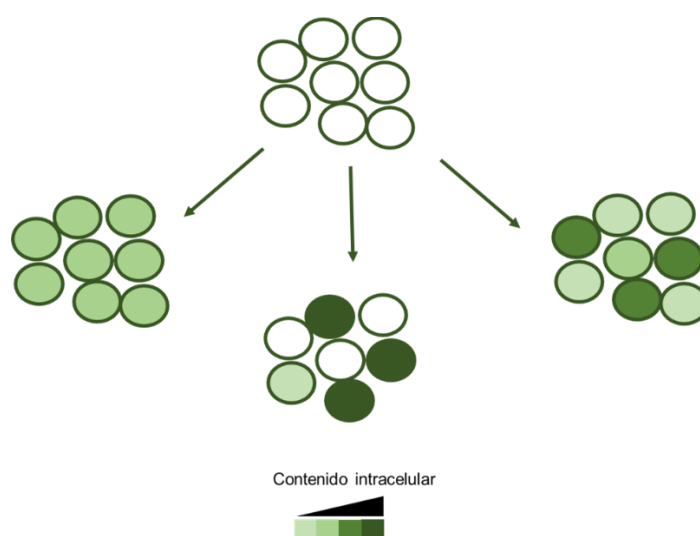
La heterogeneidad celular es una propiedad conocida de las poblaciones celulares que implica la presencia de variabilidad con respecto a una o más características medibles a nivel de célula individual. Puede surgir incluso dentro de una población celular isogénica<sup>2</sup> por una gran variedad de factores y su influencia se puede observar a muchos niveles (genómico, epigenómico, transcriptómico, proteómico o metalómico entre otros), aunque no se tiene porque dar en el mismo grado en todos ellos. La variabilidad entre células puede tener un origen genético, ya que cualquier población celular puede contener células individuales que desarrollen mutaciones aleatorias. Estas mutaciones pueden llegar a causar diferencias en las células que pueden persistir y volverse significantes dentro de la población si confieren alguna ventaja adaptativa y proliferan. La variabilidad genética como fuente de heterogeneidad es un concepto muy relevante, por ejemplo, en la biología del cáncer, debido a la inestabilidad genética de las células cancerosas.<sup>3</sup> Por otro lado, la heterogeneidad puede tener causas no genéticas produciendo variaciones fenotípicas dentro de una población de células que comparten el mismo genoma. Los factores de este tipo de variabilidad pueden ser extrínsecos o intrínsecos.<sup>4</sup> Los factores extrínsecos afectan de manera no uniforme a la población y pueden aportar plasticidad fenotípica en respuesta a un cambio ambiental. Esta se da, por ejemplo, cuando células en cultivo difieren en la distancia con otras células vecinas o con los bordes de la placa.<sup>4</sup> Cuando las células son sometidas a estímulos externos o se

encuentran en un estado patológico aparecen diferencias significativas en la expresión intracelular de moléculas, lo que proporciona una valiosa información para el diagnóstico temprano y tratamiento de enfermedades. Por otra parte, la heterogeneidad intrínseca se refiere a la diversificación espontánea de una población isogénica en distintas variantes. Esta es generalmente un resultado de eventos estocásticos como pueden ser la expresión de genes y proteínas en células individuales.<sup>5-7</sup> Debido a esta fluctuación estocástica de genes, puede haber niveles variantes de proteínas en diferentes células dentro de una misma población en un tiempo dado. De las diferentes formas de heterogeneidad comentadas, la intrínseca y no genética es la más interesante en términos biológicos ya que su origen y consecuencias no han sido concretamente estudiados hasta los últimos años.

Las diferencias entre células individuales son aún mayores cuando se trata de células tumorales debido a la diferente velocidad de crecimiento de las células y a los gradientes de hipoxia y acidez que se generan en el microentorno tumoral. Esto afecta, por ejemplo, a la distribución de muchos fármacos en un tumor, haciendo que se distribuyan de manera tan heterogénea que tan solo una parte de las células del tumor queda expuesta a una concentración letal del agente citotóxico.<sup>8</sup> Además, las células tumorales sufren modificaciones genéticas y epigenéticas continuamente que pueden aumentar su resistencia.<sup>9</sup> Estas se someten frecuentemente a medios hostiles durante el tratamiento del cáncer, como en el caso de la quimioterapia o la radiación. La heterogeneidad entre las células del tumor aumenta la probabilidad de resistencia al tratamiento o recaída tras el mismo debido a la existencia de subpoblaciones con mayor facilidad de adaptación a las condiciones adversas y recursos limitados, y a las complejas interacciones que se establecen entre las células individuales.<sup>10</sup> Cuando se tratan estas células con un fármaco antitumoral, este fenómeno lleva a la supervivencia y, por lo tanto, selección de las variantes del tumor resistentes al fármaco en caso de haberlas. Con el tiempo, esto puede finalizar con el desarrollo de resistencia en todo el tumor.<sup>11</sup>

Todo lo expuesto anteriormente hace crecer el interés en los análisis de células individuales, en contraposición a las medidas globales o en *bulk*. En estas últimas, se utilizan muestras celulares de un elevado número de células que se lisan o se digieren para seguidamente cuantificar el contenido de los analitos de interés mediante la técnica

adecuada. El resultado de esta determinación se normaliza finalmente al contenido celular de partida utilizando parámetros como el número de células, peso seco o la concentración proteica, determinada previamente. Este tipo de análisis proporciona información del contenido medio de la especie química determinada en la muestra, asumiendo que todas las células de la muestra se comportan de manera homogénea. No obstante, la variabilidad existente entre las células individuales de una muestra implica una pérdida de información sobre la distribución de la especie química en la muestra pudiendo incluso ocultar la existencia de diferentes subpoblaciones en la misma como se puede ver en la Figura 1.



*Figura 1. Posibles distribuciones de una especie química entre las células individuales de una población celular. Adaptada de Amable y colaboradores.<sup>12</sup>*

Por ello, en los últimos años ha aumentado notablemente el interés por el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias que permitan la determinación a nivel de célula individual de una especie química, que puede ser tanto una molécula como un elemento.<sup>13</sup> El análisis de los diferentes componentes celulares y el metabolismo a nivel de célula individual permite obtener información sobre la heterogeneidad y diferenciación celular, pero también es una buena estrategia para estudiar la relación entre el contenido de un elemento o biomolécula y las diferentes vías de señalización celular en la que participan.<sup>14</sup> Recientemente se han desarrollado diversas estrategias para el análisis de diferentes moléculas en células individuales, sin embargo, es un campo poco investigado existiendo todavía una demanda de nuevas técnicas que posean las características analíticas necesarias para la medida en una única célula. El desafío reside

en el pequeño tamaño y volumen de las células, lo que implica una minúscula cantidad de los analitos que, a su vez, se encuentran en una matriz muy compleja. De una célula individual humana se pueden extraer alrededor de 6 pg de ADN global, 10-30 pg de ARN total y entre 250-300 pg de proteína.<sup>15</sup> El ADN y ARN se puede amplificar posteriormente, pero no existen métodos de amplificación de proteínas y metabolitos o metales comparables con los existentes para moléculas de ácidos nucleicos. Además, las biomoléculas y especies metálicas se encuentran en las células en un amplio rango de concentraciones y participando en procesos bioquímicos complejos y muy dinámicos.<sup>13,16</sup> Por ello, para el análisis de células individuales se precisa del desarrollo de métodos rápidos, sensibles, precisos y selectivos.

Los mayores avances en este campo se han dado a nivel molecular en los campos de la genómica,<sup>17-19</sup> proteómica,<sup>20,21</sup> transcriptómica<sup>22</sup> y metabolómica.<sup>23,24</sup> Hasta la fecha, se están aplicando diferentes técnicas al análisis de células individuales que pueden ser complementarias entre sí. Entre ellas destacan métodos fluorimétricos, como la microscopia de fluorescencia o la citometría de flujo que utilizan marcadores fluorescentes que se unen a la especie de interés para llevar a cabo una detección altamente específica y sensible. Sin embargo, el número de marcadores que pueden ser detectados simultáneamente se ve limitado por solapamientos espectrales. Otros inconvenientes de estas técnicas son la inactivación de fluorescencia o la autofluorescencia que presentan típicamente las muestras de origen biológico como células y tejidos.

Asimismo, la detección por espectrometría de masas se está postulando como buena candidata para el análisis de muestras biológicas a nivel de célula individual debido a su alta sensibilidad, amplio rango de detección, alta especificidad y a la variedad de métodos de ablación e ionización disponibles. Entre estos se han utilizado la ionización por electrospray (ESI-MS), ionización por desorción mediante láser (*laser desorption ionization*, LDI-MS), desorción e ionización asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption and ionization*, MALDI-MS), iones secundarios (*secondary ions*, SIMS) y el plasma de acoplamiento inductivo (*inductively coupled plasma*, ICP-MS) para la determinación de un alto rango de especies químicas como proteínas, péptidos, lípidos, metabolitos y elementos.<sup>25</sup> Por ejemplo, Budnik y colaboradores desarrollaron la técnica



SCoPe-MS (*Single-Cell Proteomics by Mass Spectrometry*) para obtener la sensibilidad necesaria para el análisis proteómico de células individuales de mamífero.<sup>26</sup> En esta técnica, se minimizó la pérdida de proteínas mediante la recogida manual de células vivas bajo el microscopio seguida de su lisis mecánica mediante sonicación, para evitar la utilización de reactivos que puedan dificultar la separación de los péptidos y su ionización. La identificación y cuantificación de péptidos de las células individuales se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), utilizando una fuente de ionización de ESI y un analizador orbitrap. También se utilizaron técnicas como MALDI-MS o SIMS como técnicas de imagen con resolución subcelular y obtención del perfil molecular de células individuales.<sup>27-29</sup>

Paralelamente, se requiere del desarrollo y optimización de métodos de preparación y manipulación de muestra adecuados para el posterior análisis en células individuales. La microfluídica es una de las técnicas más prometedoras en este sentido debido a su capacidad para realizar múltiples operaciones en un solo dispositivo microfluídico (*lab-on-a-chip*) y utilizando volúmenes de muestra ínfimos (hasta nL o pL). Las plataformas microfluídicas ya han sido aplicadas en la manipulación de células para su posterior análisis por espectrometría de masas, especialmente para el análisis de proteínas y péptidos mediante ESI-MS.<sup>30-32</sup>

Sin embargo, el objetivo de esta tesis doctoral es la evaluación del contenido elemental de células individuales para diferentes aplicaciones. En este sentido es la fuente de plasma de acoplamiento inductivo acoplada a la espectrometría de masas (ICP-MS) la técnica más atractiva para este tipo de estudios. Por esta razón, esta estrategia se abordará más detalladamente en el apartado siguiente.

## **1.2.Principio del análisis de células individuales mediante ICP-MS**

Como se ha mencionado en la sección anterior, la heterogeneidad celular se puede apreciar en muchos aspectos. Entre estos, se encuentra la composición elemental y distribución de elementos dentro de la célula. La determinación de elementos traza en

muestras celulares se ha utilizado para entender numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos proporcionando información relevante en múltiples disciplinas como la toxicología, nutrición, biomedicina o investigación clínica.

Todas las células necesitan nutrientes esenciales para sobrevivir. Muchos de estos nutrientes son elementos, entre los que merecen especial atención los metálicos. Los iones metálicos son un componente de vital importancia en la química de la vida.<sup>33</sup> Se estima que al menos un tercio de las proteínas humanas necesitan de un cofactor metálico para la correcta realización de su función. Ejemplos de estos cofactores son el Cu, Fe, Zn o Mo<sup>34</sup> que se pueden encontrar en su forma iónica, formando complejos o unidos a otros compuestos. Esto hace que muchos de estos elementos químicos desempeñen un papel clave en importantes procesos biológicos como la expresión génica, el balance redox o la regulación del ciclo celular, entre otros. Por ello, la concentración de estos elementos dentro de la célula, su distribución dentro de esta y su unión a otros compuestos como proteínas están estrechamente reguladas y controladas.<sup>35</sup> Además, la producción y utilización de productos que contienen metales (p.e. metalofármacos) o nanopartículas metálicas es cada día más generalizada y el estudio de su incorporación celular de creciente interés. Algunos de estos productos están diseñados para que exista una interacción biológica con las células, como pueden ser los metalofármacos o agentes antibacterianos, mientras que otros interactúan de manera no intencionada, como los nanomateriales metálicos contenidos en pinturas, alimentos o productos de cuidado personal. No obstante, en ambos casos la interacción a nivel celular es inevitable, pasando estos compuestos a formar parte del metaloma celular al incluirse en las rutas celulares. Aunque el contenido elemental no refleja completamente la bioquímica de una célula, un cambio en la composición elemental puede ser un primer indicio para investigar los procesos biológicos involucrados.

Por consiguiente, la determinación de la composición elemental en sistemas biológicos es de primordial relevancia. Convencionalmente, el análisis de elementos traza en muestras de células o tejidos se ha llevado a cabo en *bulk*, como se explicó en la sección 1.1. Tras la digestión de muestras de un alto número de células, la técnica analítica más adecuada para el análisis elemental cuantitativo es la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), que ha reemplazado otras técnicas como

el ICP con detección por espectrometría de emisión óptica (*inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*, ICP-OES), la espectrometría de absorción atómica (*atomic absorption spectroscopy*, AAS) o la fluorescencia de rayos X (*X-ray fluorescence*, XRF). Sin embargo, la heterogeneidad entre células individuales puede influir en la concentración o la incorporación de un elemento, información imposible de obtener con las medidas globales. Por ello, la determinación elemental a nivel de célula individual parece mucho más interesante y de aplicación en muchos procesos biotecnológicos.

El reto analítico del análisis de células individuales reside en el pequeño tamaño de estas, lo que implica una concentración muy baja del elemento a medir, por lo que se necesitan técnicas con elevada sensibilidad y especificidad. El ICP-MS presenta capacidad de detección multielemental, elevada sensibilidad (con límites de detección en el rango de los ng L<sup>-1</sup> o incluso inferiores) y un amplio rango dinámico lineal con buena estabilidad y reproducibilidad. Además, se puede calibrar de manera sencilla con patrones elementales líquidos proporcionando información cuantitativa y permite la determinación de relaciones isotópicas de un elemento. Estas excepcionales características analíticas hacen que el ICP-MS sea un buen candidato para el análisis de pequeñas estructuras como células y nanopartículas individuales.

El análisis de células individuales mediante ICP-MS (*single cell ICP-MS*, SC-ICP-MS) se basa en el mismo principio que el análisis de partículas individuales (*single particle ICP-MS*, SP-ICP-MS), que fue descrito inicialmente en 1986 utilizando un ICP con detección por espectrometría de emisión óptica para el análisis de aerosoles y partículas en aire.<sup>36</sup> Posteriormente, Degueldre y colaboradores describieron por primera vez en 2003 el fundamento teórico del análisis de partículas individuales mediante ICP-MS (SP-ICP-MS) y demostraron su aplicabilidad para el análisis de coloides naturales y suspensiones coloidales de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, Zr, Th y Au.<sup>37-40</sup> Finalmente, Laborda y colaboradores introdujeron la técnica al análisis de nanomateriales metálicos, aprovechándose de su potencial para la detección y cuantificación de nanopartículas en muestras medioambientales, caracterizar su tamaño y estudiar su estabilidad.<sup>41</sup>

El fundamento de SP-ICP-MS fue adaptado por primera vez al análisis de células individuales por Li y colaboradores para estudiar la incorporación de uranio en bacterias individuales, siendo el punto de partida de la técnica *single cell ICP-MS* (SC-ICP-MS).<sup>42</sup> Este

fundamento se representa de forma esquemática en la Figura 2. Cuando una muestra se introduce en ICP-MS, generalmente en estado líquido, el nebulizador produce un aerosol de gotas de diferentes tamaños. La llegada de parte de esas gotas al plasma provoca la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de la muestra. Los iones generados en el plasma son conducidos hacia el analizador de masas, a través de una interfase de extracción, donde son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) para llegar finalmente al detector del equipo. Cuando se analiza la forma soluble de un elemento, que se distribuye de manera homogénea en la disolución, la masa de analito que entra al plasma por unidad de tiempo es constante provocando una señal continua estable durante todo el periodo de medida. Sin embargo, si la muestra contiene nanopartículas o células en suspensión y se diluye lo suficiente para que estas lleguen al plasma de manera individual, cada célula o nanopartícula generará una nube de iones cuando es vaporizada, atomizada e ionizada en el plasma que resultará en una señal transitoria de muy corta duración y que se conoce como evento o *spike*. La duración de estos eventos depende de varios factores como el tamaño de las células o el flujo de gas utilizado para la medida por ICP-MS, pero, para una célula típica de diámetro entre 1-10  $\mu\text{m}$ , es del rango de 100-500  $\mu\text{s}$ .<sup>43,44</sup>

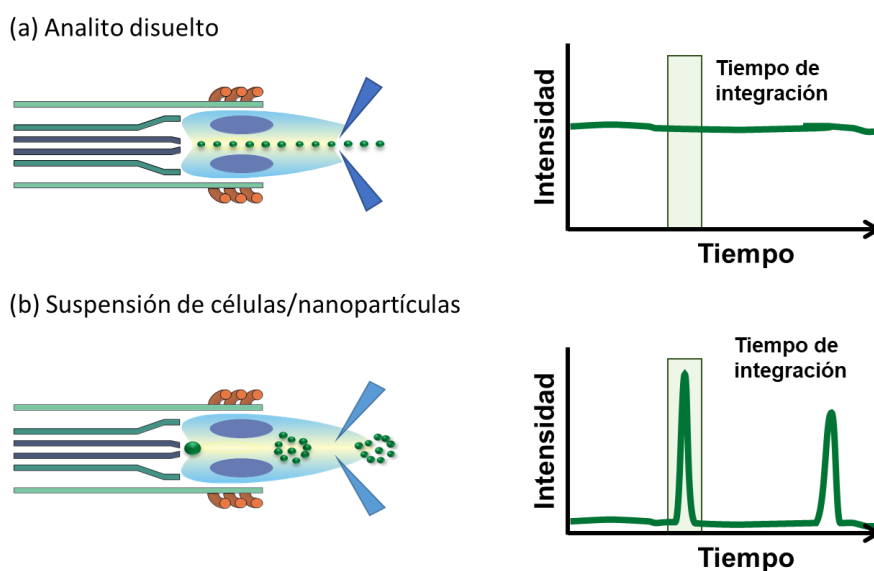


Figura 2. Representación esquemática de la señal obtenida en ICP-MS con el tiempo para: (a) Analito disuelto y (b) suspensión de células o nanopartículas.

La base teórica de esta técnica implica asumir que cada evento registrado es el resultado de una sola célula o nanopartícula. Cuando esto es cierto, la frecuencia de

eventos se relaciona directamente con la concentración en número de estas en la muestra. Por otro lado, la intensidad de los eventos es proporcional a la masa del elemento analizado en la célula o nanopartícula y, por último, la señal del fondo del análisis se relaciona con la concentración del elemento disuelto en la muestra y que no forma parte de las células o nanopartículas individuales.

Este principio se cumple para los sistemas que permiten la introducción de suspensiones celulares líquidas en línea (sistemas basados en nebulización neumática y de generación de microgotas, como se verá en las siguientes secciones). Esta estrategia proporciona una medida del contenido global de un elemento en cada célula individual. Alternativamente, existen técnicas de imagen que proporcionan información sobre la presencia o ausencia de un elemento y de su distribución espacial dentro de la célula, como la ablación láser con detección por ICP-MS (*laser ablation*, LA-ICP-MS).<sup>45</sup>

La medida de células o nanopartículas individuales requiere la introducción de células individuales integras al ICP-MS con alta eficiencia, es decir, haciendo que lleguen al plasma el mayor porcentaje posible de las células introducidas. Para ello se han desarrollado diferentes estrategias que se basan en diferentes tipos de sistemas de introducción de muestra. Además, la adquisición de la señal respecto al tiempo se debe realizar con alta resolución temporal, debido a la corta duración de las señales transitorias que se generan en el análisis de células individuales. Esto implica reducir el tiempo de integración o *dwell time* respecto a medidas convencionales, es decir, reducir el tiempo de adquisición por cada punto de medida. Estas peculiaridades del análisis de células individuales mediante ICP-MS se comentarán en las siguientes secciones.

### **1.2.1. Sistemas de introducción de muestra**

Existen dos estrategias principales para la introducción de células individuales al ICP-MS que son: i) la introducción de células completas en suspensión o ii) la utilización de un láser para arrancar las células fijadas en un soporte sólido generando un aerosol que es transportado al ICP-MS. Para la introducción de células individuales que se encuentran en suspensión, cada célula debe ser introducida en finas gotas para su transporte al plasma. Esto se puede conseguir mediante el uso de nebulizadores

neumáticos de diferentes tipos o utilizando generadores de microgotas. En este caso, una buena eficiencia de transporte al plasma tiene especial interés para reducir el consumo de muestra. Sin embargo los sistemas utilizados convencionalmente presentan a menudo eficiencias de transporte bajas, generalmente por debajo del 10 %.<sup>46</sup> Por ello, se han desarrollado nuevos sistemas de introducción de muestras que mejoran la eficiencia de transporte de las células individuales integras al plasma. Por otro lado, la ablación láser permite la ablación de células individuales completas, pero también, gracias a nuevos desarrollos de la técnica, la obtención de imágenes elementales de las células con resolución subcelular. A continuación, se explicarán las características más reseñables de las dos estrategias mencionadas.

### **1.2.1.1. Introducción de células individuales mediante nebulización neumática**

La manera habitual de introducir muestras líquidas en ICP-MS se lleva a cabo a través de la generación de un aerosol de la muestra en un nebulizador, que posteriormente es transportado al plasma a través de una cámara de nebulización. Durante este proceso la muestra se bombea a un determinado flujo hacia el nebulizador, normalmente con la ayuda de una bomba peristáltica o bomba de jeringa. Con la ayuda de un flujo elevado de Ar el nebulizador produce un aerosol cuyas gotas más gruesas son eliminadas mediante un sistema de drenaje a su paso a través de la cámara de nebulización, como se puede apreciar en la *Figura 3*. El aerosol de finas gotas resultante atraviesa la cámara y se transporta hacia el plasma a través del tubo inyector. La actuación de las técnicas espectroscópicas basadas en plasma de acoplamiento inductivo está muy influenciada por la calidad de este aerosol.

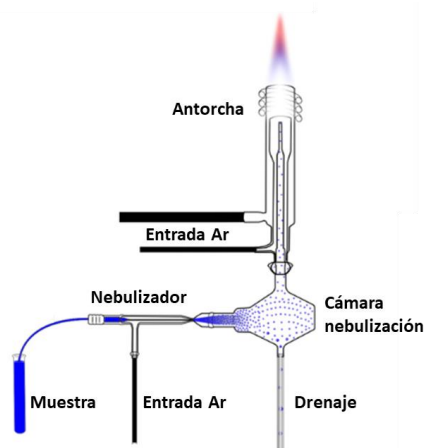


Figura 3. Diagrama del sistema de introducción de muestra convencional de un ICP-MS. Adaptado de Caruso y colaboradores.<sup>47</sup>

El proceso de nebulización implica la transformación de un volumen de líquido en un conjunto de gotas suspendidas en un gas (“spray”). Para el análisis de células individuales, utilizando diluciones de la muestra adecuadas, la mayoría de las gotas generadas en la nebulización no contendrán ninguna célula, para minimizar la probabilidad de encontrar una gota con dos o más células. Este proceso se basa en provocar una inestabilidad en la superficie del líquido mediante el aporte de energía para vencer sus fuerzas de cohesión como tensión superficial, viscosidad, etc. Según el tipo de energía utilizada, surgen diferentes mecanismos de nebulización. La nebulización neumática es aquella que utiliza la energía cinética procedente de una corriente gaseosa a elevada velocidad. Los nebulizadores neumáticos son los más utilizados para la introducción de muestras líquidas en ICP-MS debido a su adecuada robustez y estabilidad, simple manejo y bajo coste. Dentro de los nebulizadores neumáticos, se pueden encontrar diferentes tipos que difieren en su geometría y dimensiones, lo que influye en la manera de interaccionar las corrientes de líquido y gas. Algunos de los más comunes son:

- Nebulizadores neumáticos concéntricos: La muestra líquida se introduce a través de un capilar de manera concéntrica a la entrada de la corriente gaseosa por un segundo capilar (Figura 4). Estos confluyen en una pequeña apertura en la punta del nebulizador donde la interacción entre el líquido y el gas Ar tiene lugar de forma tangencial, produciéndose el aerosol por el efecto Venturi. Son los

nebulizadores neumáticos más comunes y existen una amplia variedad de estos para su uso en ICP-OES/MS.

- Nebulizador neumático de flujo cruzado: La entrada del líquido se realiza de forma vertical y la del gas de forma horizontal y, por ello, su interacción tiene lugar de forma perpendicular (Figura 4).
- Nebulizador neumático de flujo paralelo: Su diseño se basa en dos conductos paralelos a través de los cuales se suministran la muestra líquida y la corriente gaseosa hasta la punta del nebulizador donde se produce su interacción y la generación del aerosol. Actualmente *Burgener Research* tiene disponibles comercialmente diferentes tipos de nebulizadores de flujo paralelo como el Mira Mist o Ari Mist.
- Otros tipos: De surco en V (*V-groove*), cónico, de vidrio fritado, de rejilla.

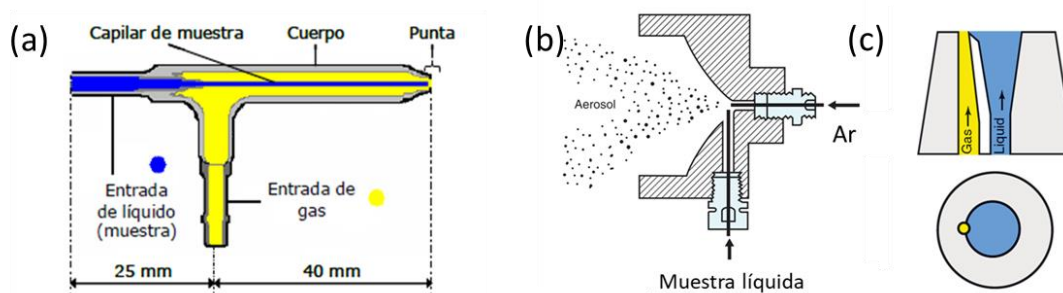


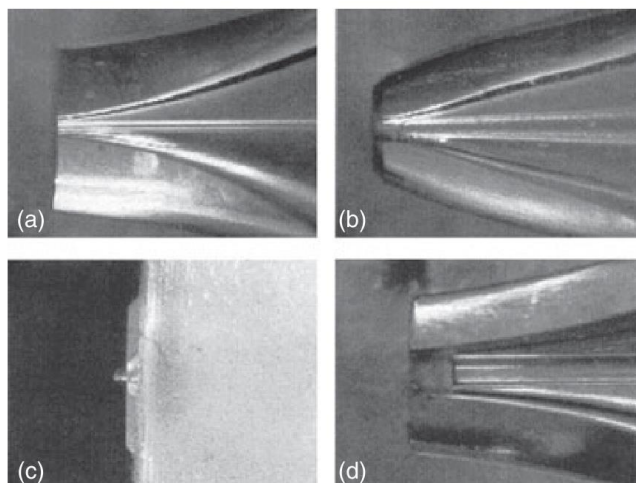
Figura 4. Diagrama general de los nebulizadores: (a) concéntrico, (b) de flujo cruzado y (c) de flujo paralelo. Adaptada de Canals y colaboradores.<sup>48</sup>

Los sistemas convencionales presentan eficiencias de transporte al plasma muy pobres, como se comentó anteriormente, de incluso inferiores al 1%.<sup>49,50</sup> Esto supone que el 99 % de la muestra no es analizada lo que a menudo no es un gran problema para el análisis de un analito en disolución, o incluso para el acoplamiento del ICP-MS con técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Sin embargo, en muchas aplicaciones como en el análisis de muestras biológicas la cantidad de muestra disponible es a menudo un factor limitante. En el caso del análisis de células individuales cada célula cuenta, especialmente en muestras en las que el número de células es limitado. Por ello, existe una tendencia a la reducción de las dimensiones de los nebulizadores convencionales lo que permite el trabajo utilizando flujos de los pocos  $\mu\text{L min}^{-1}$  y que, generalmente, proporcionan eficiencias de transporte al plasma superiores (micronebulizadores).



Los micronebulizadores más comunes son nebulizadores neumáticos concéntricos convencionales con dimensiones reducidas para las salidas del gas y el líquido<sup>51</sup> y el diámetro interno y grosor de la pared del capilar que transporta la muestra. El uso de microflujos tiene como consecuencia la obtención de un aerosol primario compuesto por gotas de menor tamaño que proporciona un mejor comportamiento analítico que los nebulizadores convencionales. Además, la reducción de sus dimensiones reduce o elimina los volúmenes muertos y, por lo tanto, minimiza los efectos de memoria. Como contrapunto, son sistemas más propensos a la obturación lo que limita su uso con disoluciones con altas concentraciones salinas, por la formación de cristales, y con suspensiones cuyas partículas pueden bloquear el capilar de la muestra. Ejemplos de estos tipos de nebulizadores son el nebulizador microconcéntrico (*microconcentric nebulizer*, MCN) o el nebulizador MicroMist (MM). En el primero, la punta del capilar de sílice que transporta la muestra se sitúa a una pequeña distancia fuera del cuerpo del nebulizador, mientras que, en el segundo el capilar es más corto que el cuerpo del nebulizador quedando la salida de la muestra líquida dentro este. Esto hace que el MCN genere aerosoles formados por gotas de mayor tamaño que el MM, presentando eficiencias de transporte y sensibilidades menores.<sup>51</sup>

Por otro lado, también existen micronebulizadores de alta eficiencia (*High-Efficiency Nebulizer*, HEN) en los que los extremos de salida de los capilares de la muestra líquida y del gas están en el mismo plano. Estos nebulizadores proporcionan un aerosol muy fino y monodisperso<sup>52</sup> lo que aumenta la eficiencia de transporte significativamente respecto a nebulizadores convencionales. Además, presenta señales poco ruidosas lo que conlleva una mejora de los límites de detección.<sup>53</sup> En la Figura 5 se pueden ver en detalle las puntas de los micronebulizadores explicados en comparación con un nebulizador concéntrico convencional.



*Figura 5. Imágenes de la punta de los nebulizadores: (a) HEN, (b) MicroMist, (c) Microconcentrico y (d) nebulizador neumático concéntrico convencional. Extraído de Todolí y colaboradores.<sup>51</sup>*

Para que la eficiencia de transporte del aerosol al plasma sea elevada es necesario que el aerosol esté formado por gotas monodispersas y del menor tamaño posible. No obstante, los nebulizadores producen generalmente aerosoles primarios con cierto grado de dispersión en el tamaño de gota. Cuando se utilizan nebulizadores neumáticos a un flujo de introducción de muestra de alrededor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , generalmente llegan al plasma aerosoles compuestos por gotas con diámetros que varían desde menos de  $1 \mu\text{m}$  hasta  $15 \mu\text{m}$ .<sup>44</sup> Sin embargo, se considera que las gotas menores de  $8 \mu\text{m}$  son las únicas capaces de completar el proceso de vaporización, atomización e ionización.<sup>54,55</sup> Para acondicionar dicho aerosol a los requisitos del plasma, el nebulizador se inserta en una cámara de nebulización. Las cámaras de nebulización actúan como un filtro de tamaños y velocidades de las gotas del aerosol, eliminando las de mayor tamaño e igualando la velocidad a la del gas portador. Existe una gran variedad de cámaras de nebulización para su utilización en ICP-MS (Figura 6) con diferentes diseños, volúmenes internos y materiales de fabricación:

- Cámaras de nebulización de doble paso, paso inverso o tipo Scott. Están formadas por dos tubos concéntricos de los cuales el interno tiene su parte final abierta. Al llegar a este punto, el aerosol tiene que hacer un giro de  $180^\circ$  y recorrer cierta distancia en sentido contrario para llegar al plasma. Las gotas de mayor tamaño son eliminadas por impactos tanto con las paredes del tubo interno como con la

pared final del tubo externo de la cámara. Solo las gotas más finas y con la velocidad adecuada son capaces de seguir la trayectoria al plasma que, en este caso, es bastante larga, lo que favorece la evaporación del disolvente de las gotas en su paso a través de la cámara. Su mayor inconveniente son los grandes volúmenes muertos en su interior lo que aumenta el tiempo de lavado, provoca efectos de memoria y limita su uso con micronebulizadores.<sup>56</sup>

- Cámara de nebulización de paso simple. El aerosol mantiene una trayectoria horizontal mucho más directa que en las anteriores, eliminando las gotas más gruesas únicamente mediante colisiones contra las paredes internas de la cámara y la propia gravedad, por lo que se recomienda su uso con nebulizadores que generen un aerosol primario de buenas características para no comprometer la estabilidad del plasma.<sup>57</sup> Pueden ser de forma cilíndrica o cónica y también pueden presentar una bola de impacto en su interior a una distancia determinada del nebulizador de la que depende el tamaño de las gotas deseçadas.<sup>58</sup>
- Cámara de nebulización ciclónica. En estas el aerosol entra tangencialmente respecto a las paredes de la cámara. Las gotas son discriminadas en función de su tamaño mediante la generación de un torbellino por el flujo tangencial del aerosol y el gas Ar en el interior de la cámara. Las gotas más finas son transportadas por el gas hasta el ICP mientras que las más gruesas chocan con las paredes de la cámara y son eliminadas por el sistema de drenaje.

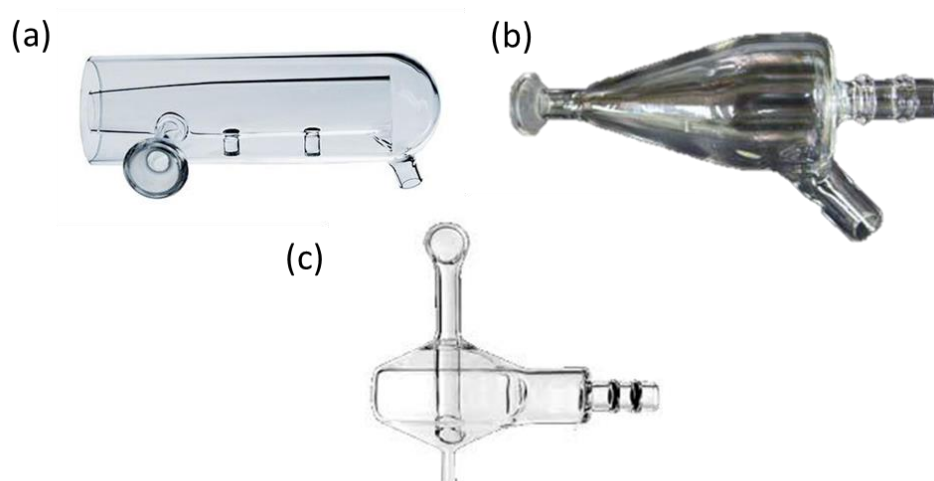


Figura 6. Imágenes de cámaras de nebulización (a) de paso doble o tipo Scott, (b) de paso simple y (c) ciclónica.

Al igual que en el caso de los nebulizadores, se han reducido las dimensiones habituales de las cámaras de nebulización para mejorar su rendimiento cuando se trabaja con microflujos. Para el análisis de células individuales mediante ICP-MS, son de especial interés sistemas de introducción de muestras de consumo total que presenten altas eficiencias de transporte. Estos sistemas están constituidos normalmente por un micronebulizador y una cámara de nebulización de paso simple de volumen interno reducido, lo que teóricamente permite el transporte total de muestras líquidas al plasma utilizando flujos de introducción de muestra en el rango de los  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

La principal desventaja en muchos trabajos de análisis de células individuales mediante nebulización neumática descritos hasta ahora es el uso de sistemas de introducción de muestra demasiado ineficientes. Uno de los primeros trabajos sobre la introducción de células individuales mediante nebulización neumática, en este caso al ICP-OES, fue publicado por Nomizu y colaboradores<sup>59</sup> en 1994. Utilizaron células de mamífero de entre 10-20  $\mu\text{m}$  de diámetro para determinar su contenido en calcio. Emplearon un sistema convencional basado en un nebulizador concéntrico (tipo Meinhard). La pérdida de grandes cantidades de células debido a su deposición en el sistema no permitió la introducción de células individuales en suspensión, resultando en la ausencia de señales. Para solucionar esto, la cámara de nebulización fue calentada a 70 °C y se aplicaron emisiones  $\alpha$  de  $^{241}\text{Am}$  para neutralizar la carga superficial de las células y prevenir así su deposición en la cámara y en los tubos y conexiones. Con estas modificaciones consiguieron obtener señales de Ca con un límite de detección de 0,01 pg pero con una eficiencia de transporte muy baja del 0,1 %.

El primer trabajo en el que se introdujeron células individuales al ICP-MS fue llevado por Li y colaboradores<sup>42</sup> en 2005 como se mencionó anteriormente, para monitorizar la incorporación de  $\text{U}^+$  en bacterias (*Bacillus subtilis*). Para ello utilizaron un equipo con analizador de doble enfoque operado a baja resolución ( $m/\Delta m \sim 300$ ) con un tiempo de integración de 4 ms y utilizando un sistema de introducción de muestras basado en un nebulizador microconcéntrico, demostrando la presencia de eventos de  $\text{U}^+$  solamente en presencia de bacterias. Posteriormente, Ho y colaboradores<sup>49</sup> lograron el conteo celular y determinación simultánea de elementos traza como Mn y Cu, y elementos mayoritarios como Mg, en células individuales de un alga unicelular (*Chlorella*

*vulgaris*). En este trabajo utilizaron un nebulizador de surco en V (*V-groove*) y una cámara de nebulización de doble paso refrigerada en un equipo de ICP-MS con analizador de cuadrupolo. La eficiencia de transporte obtenida fue de tan solo un 0,54 %.<sup>49</sup> Una eficiencia similar obtuvieron Meyer y colaboradores<sup>60</sup> en un trabajo más reciente en el que utilizaron un nebulizador MicroMist y una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott en un ICP-MS de triple cuadrupolo. La eficiencia de transporte se calculó a través de la medida de elementos constitutivos como el P y el S en células humanas de cáncer de pulmón (A549) y se obtuvieron valores del 0,5 %. Sin embargo, para los patrones líquidos obtuvieron una eficiencia de un 7,5 %, estimando este valor indirectamente mediante la comparación del volumen de muestra introducido y el volumen de desecho generado durante un periodo de tiempo definido.

Zheng y colaboradores también utilizaron un método basado en nebulización neumática utilizando un nebulizador concéntrico MicroMist y una cámara de nebulización de paso simple con bola de impacto para la medida de cisplatino,  $Gd@C82(OH)22$ <sup>61</sup> (una novedosa nanopartícula con prometedoras propiedades antineoplásicas) y puntos cuánticos<sup>62</sup> en células individuales, validando los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y medidas globales tras la digestión ácida de las células. Por otro lado, Wang y colaboradores<sup>63</sup> utilizaron un nebulizador concéntrico tipo PFA-ST y una cámara de nebulización ciclónica para estudiar el contenido y distribución de elementos traza esenciales como Fe, Cu, Zn, Mn, P y S en dos tipos de líneas celulares cancerosas (HeLa y A549) y una línea celular normal (16HBE).

Para resolver el problema de la baja eficiencia de transporte de los nebulizadores convencionales, Groombridge y colaboradores<sup>64</sup> diseñaron un sistema de introducción de células de alta eficiencia (*high efficiency cell introduction system*, HECIS) que consiste en un nebulizador concéntrico de alta eficacia (*high performance concentric nebulizer*, HPCN) y una cámara de nebulización de consumo total de pequeño volumen (15 cm<sup>3</sup>) alineada con el eje del cilindro formado por la entrada del flujo del gas de arrastre en el plasma (*on-axis*). Además, la cámara permite la introducción de un flujo de argón adicional que ayuda a incrementar la eficiencia minimizando la deposición de células por el impacto en las paredes de la misma. En la Figura 7 se representa un diagrama del sistema.

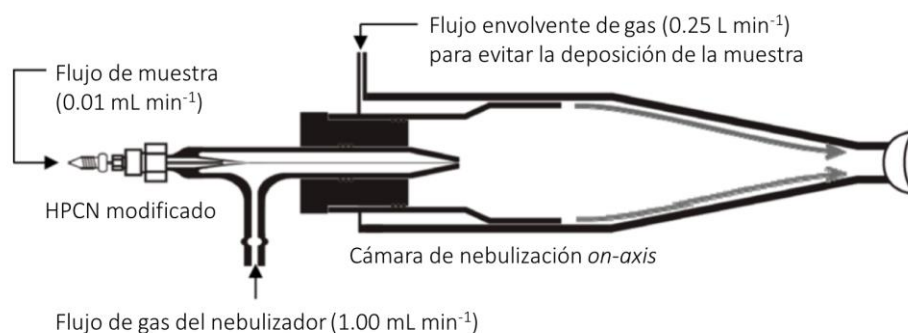


Figura 7. Diagrama esquemático del sistema HECIS para la introducción de células con alta eficiencia. Figura adaptada de Groombridge y colaboradores.<sup>64</sup>

El HPCN tiene una estructura concéntrica de triple tubo con un diámetro del capilar central de 110  $\mu\text{m}$ . Mediante la combinación de este nebulizador, bajos flujos de introducción de muestra ( $10 \mu\text{L min}^{-1}$ ) y la adición del gas envolvente en la cámara, se consiguió la introducción de células individuales de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) con una elevada eficiencia de transporte de un  $75,0 \pm 4,7 \%$ . Además, para prevenir la adsorción de las células en el inyector, tubos y nebulizador añadieron una baja concentración de NaCl que permitió la monitorización de P, Mg, Zn, Fe, Cu y Mn sin aumentar los fondos de la medida.<sup>64</sup>

Modificaciones posteriores en este mismo sistema lograron aumentar aún más la eficiencia. Para reducir la pérdida de células en las paredes de la cámara y permitir la introducción de células de un mayor rango de tamaños (de 2,0  $\mu\text{m}$  a 6,4  $\mu\text{m}$  de diámetro), se aumentó el diámetro del capilar interno del nebulizador a 150  $\mu\text{m}$  (110  $\mu\text{m}$  en el HPCN original) y se aumentó la longitud total de la cámara de nebulización. Con estas modificaciones se obtuvo una mayor relación señal/ruido para  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{55}\text{Mn}$  y  $^{66}\text{Zn}$ . Además, se incrementó la eficiencia del transporte a un 86 % para las células de mayor tamaño utilizadas (el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 con un diámetro medio de 6,4  $\mu\text{m}$ ) y hasta un 100 % para el resto de células de microorganismos unicelulares analizados con tamaños entre 2,0-3,0  $\mu\text{m}$  (levadura *S. cerevisiae*, cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, alga roja *Cyanidioschyzon merolae* 10D y *Galdieria sulphuraria*).<sup>65</sup> La eficiencia de transporte del 100 % de este sistema de consumo total se aprovechó posteriormente para la caracterización de nanopartículas de Ag y Pt en tamaño y concentración mediante *single particle* ICP-MS, permitiendo el uso de una

calibración externa con patrones elementales sin necesidad de evaluar la eficiencia de transporte, lo que reduce enormemente la complejidad de la técnica.<sup>66</sup> Recientemente, se ha utilizado el sistema HECIS para la detección y cuantificación de receptores de transferrina (TfR1) en la superficie de células individuales de cáncer de ovario con una eficiencia del 55 % después del marcaje elemental de dichas moléculas.<sup>67</sup>

Hay que destacar que la empresa PerkinElmer comercializa un sistema de introducción de muestras propio, basado en el mismo concepto, que consiste en una combinación de un micronebulizador de alta eficiencia (HEN) y una cámara de nebulización de consumo total (Asperon™), ambos diseñados para la introducción de células intactas al plasma de manera eficiente. Este sistema utiliza un flujo de Ar para el nebulizador de aproximadamente  $0,35 \text{ L min}^{-1}$  mientras que un flujo de Ar adicional de alrededor de  $0,7 \text{ L min}^{-1}$  se introduce directamente a la cámara de nebulización para incrementar la eficiencia de introducción de las células. Este sistema se ha aplicado recientemente al estudio de la incorporación y distribución de nanopartículas de oro (AuNPs) en algas unicelulares de un tamaño de  $20\text{-}30 \mu\text{m}$  (*Cryptomonas ovata*), utilizando AuNPs de 60 nm certificadas (NIST 8013) y perlas de poliestireno dopadas con lantánidos para el cálculo de la eficiencia de transporte y obteniendo valores de  $31,33 (\pm 2,54) \%$  y  $30,31 (\pm 1,85) \%$ , respectivamente.<sup>68</sup> También se aplicó a la cuantificación de la incorporación de As y su distribución en la población del alga unicelular flagelada *Chlamydomonas reinhardtii* tras su incubación con diferentes concentraciones de arseniato sódico. En esta ocasión la cámara de nebulización del sistema se combinó con un nebulizador PFA resultando en una eficiencia menor, de  $9,9 (\pm 0,9) \%$ .<sup>69</sup>

Otro sistema de introducción de células de alta eficiencia similar está disponible comercialmente bajo el nombre de *High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS*. La empresa Glass Expansion comercializa este sistema compuesto por un nebulizador concéntrico de vidrio diseñado para mantener una alta eficiencia de nebulización a bajos flujos de introducción de muestra ( $15\text{-}45 \mu\text{L min}^{-1}$ ) utilizando un flujo bajo de Ar para no comprometer la integridad de las membranas y paredes celulares. La cámara de nebulización de consumo total, fabricada en vidrio de borosilicato, también utiliza un flujo de Ar adicional a mayor velocidad para prevenir la deposición de las células en las paredes de la cámara a la vez que permite un buen lavado entre muestras. Por otro

lado, el CyTOF, sistema comercial que combina el marcaje multielemental de anticuerpos con la citometría de flujo y un ICP-TOF-MS para la detección de las marcas isotópicas como se explicará más adelante, presenta un sistema de introducción especial que consiste en un nebulizador concéntrico y una cámara de nebulización *on-axis* de pequeño volumen y calentada.<sup>70</sup> Mediante la introducción de la suspensión celular a un flujo de alrededor de  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  y la desolvatación del aerosol al calentarse a una temperatura de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  se consiguen eficiencias que varían entre el 30-40 % dependiendo del tamaño de las células.

Además, debido a las bajas eficiencias de transporte obtenidas a menudo tanto con sistemas comerciales convencionales como de microflujos algunos grupos de investigación han desarrollado sus propios sistemas de introducción de células individuales. En este sentido, Shi y colaboradores desarrollaron un sistema capilar en línea, en el que utilizaron una bomba de jeringa para introducir la suspensión celular al nebulizador a través de un capilar de cuarzo de  $100 \mu\text{m}$ . Con este sistema evaluaron cuantitativamente el contenido de mercurio en células individuales de tetrahymena, un tipo de protozoo unicelular acuático, con una eficiencia de introducción del 10 %.<sup>71</sup> El grupo de Wang y colaboradores empleó también un conjunto de tubos helicoidales en espiral antes del nebulizador para el enfoque de las células y su eficiente introducción. Mediante este sistema y utilizando un nebulizador concéntrico y una cámara de nebulización de pequeño volumen estos autores obtuvieron una eficiencia de transporte del 42 % para células K562, de médula ósea humana. Lo más destacado de este sistema es que permite la introducción de 40000 células por minuto con la suficiente resolución espacio-temporal.<sup>72</sup> El sistema desarrollado por Cao y colaboradores utiliza un nebulizador concéntrico y una cámara de nebulización de consumo total que permitió el análisis de cobre en eritrocitos. Como novedad, el flujo de muestra ( $0,8 \mu\text{L min}^{-1}$ ) se mezcla con un flujo mayor de PBS ( $4,40 \mu\text{L min}^{-1}$ ) en una celda de flujo que enfoca las células hacia un capilar de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro interno. En su camino al nebulizador las células pasan a través de un microscopio para su visualización previa. A un flujo total de  $5,2 \mu\text{L min}^{-1}$  consiguieron lograr una eficiencia de transporte del 100 % para las células de eritrocitos utilizadas, contadas previamente utilizando un hemocitómetro..<sup>73</sup>

Finalmente, el grupo de investigación de Meermann ha desarrollado recientemente un sistema que permite el lavado de las células de forma automatizada



permitiendo reducir el fondo iónico de las medidas.<sup>74</sup> Mediante el acoplamiento en línea de un sistema de HPLC, válvulas de 6 y 10 vías y un filtro, se pudo atrapar las células, lavarlas y, posteriormente bombearlas hacia el ICP-MS para su análisis, evitando los típicos lavados manuales previos. La muestra se transporta a un flujo de 30  $\mu\text{L min}^{-1}$  a través de un capilar de 180  $\mu\text{m}$  de diámetro interno al ICP-MS, provisto de un nebulizador de bajo flujo y una cámara cilíndrica de paso simple calentada a la que se le añade un flujo de Ar auxiliar para aumentar la eficiencia de transporte. El sistema fue aplicado a al análisis de  $^{24}\text{Mg}$  en células individuales de diatomeas de la especie *Cyclotella meneghiniana* con una eficiencia del proceso global de un 1 %, probablemente debido a una baja recuperación de células durante el proceso de lavado.

### **1.2.1.2. Sistemas de generación de microgotas para introducción de células individuales**

Otra alternativa para la introducción de células individuales al ICP-MS es el uso de generadores o dispensadores de microgotas discretas y homogéneas (*microdroplet generator*,  $\mu\text{DG}$ ). La ventaja principal del uso de estos dispositivos es la obtención de gotas dispersas con un rango de tamaños muy estrecho y de forma muy reproducible, permitiendo modificar la frecuencia de generación de estas.

En los últimos años, la utilización de  $\mu\text{DG}$  en ICP-MS se está volviendo cada vez más común, destacando su aplicación para el análisis de nanopartículas individuales mediante *single particle* ICP-MS, con la idea de introducir una nanopartícula individual en cada microgota.<sup>75,76</sup> Gschwind y colaboradores utilizaron un  $\mu\text{DG}$  comercial para la detección de nanopartículas de Au y Ag de diferentes tamaños, entre 30 nm y 110 nm, consiguiendo una eficiencia de transporte de las gotas cercana al 100 %.<sup>76</sup> En cuanto al análisis de células individuales, desde un punto de vista práctico se puede considerar que una célula desolvatada no es más que una gran partícula compleja, por lo que el uso de estos dispositivos parece prometedor. El principal reto es comprobar si las células, con un mayor tamaño del orden de las micras, también pueden ser embebidas dentro de las gotas generadas y comportarse como una nanopartícula.

Los primeros en utilizar un generador de microgotas para la introducción de células individuales fueron Shigeta y colaboradores.<sup>77</sup> En un trabajo previo, caracterizaron y optimizaron el acoplamiento entre un  $\mu$ DG comercial y un ICP-MS de doble enfoque (ICP-SF-MS) para su futura aplicación en la detección de elementos traza en células individuales de levadura selenizada.<sup>78</sup> El esquema del  $\mu$ DG utilizado se puede ver en la Figura 8. Este consiste en un dispensador de microgotas que consta de un capilar de vidrio por donde pasa la muestra y que está rodeado por un sistema piezoeléctrico. El sistema piezoeléctrico se acciona mediante pulsos cortos de voltaje cuya última consecuencia es la formación de las microgotas en la punta del capilar. Posteriormente, las gotas se mezclan con un gas de desolvatación en una cámara de distribución, en este caso He a un flujo de  $0,6 \text{ L min}^{-1}$  para eliminar el disolvente.

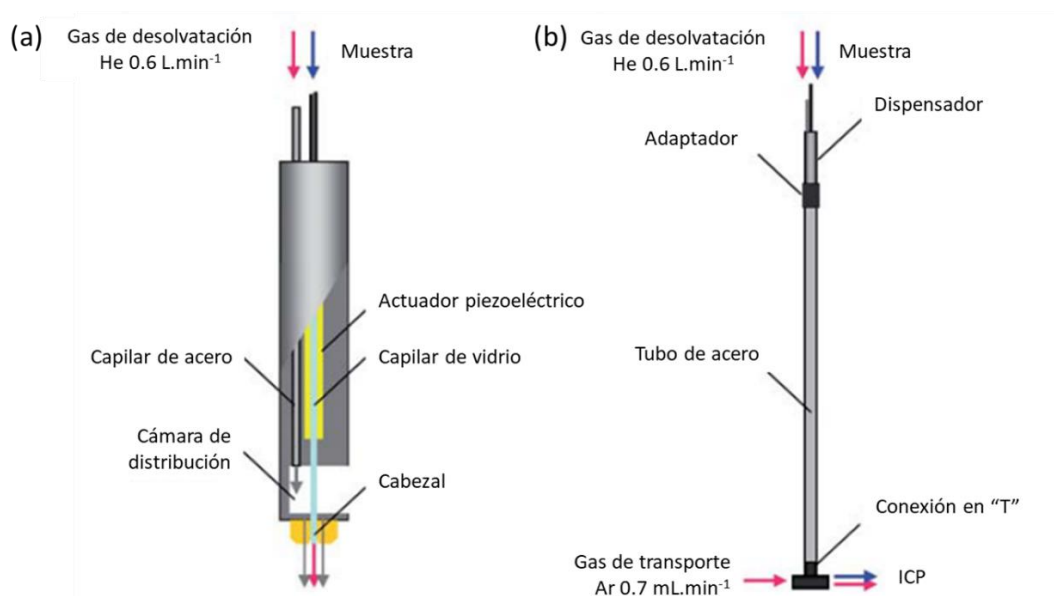


Figura 8. Diagrama del generador de microgotas piezoeléctrico ( $\mu$ DG). (a) Esquema del dispensador de microgotas. (b) Esquema del sistema de desolvatación. Figura adaptada de Shigeta y colaboradores.<sup>78</sup>

El tamaño de las gotas se puede controlar con la intensidad y el ancho de los pulsos de voltaje aplicados y el diámetro de la punta del capilar,  $50 \mu\text{m}$  en este caso. Con esta configuración, se obtienen gotas de  $50\text{-}70 \mu\text{m}$ , demasiado grandes para su total desolvatación en el plasma. Por ello, las gotas generadas son inyectadas en un sistema de desolvatación (Figura 8b) a temperatura ambiente.<sup>76</sup> Este está formado por un adaptador de flujo y un tubo de acero de  $35 \text{ cm}$  de longitud y  $0,45 \text{ cm}$  de diámetro interno. Con la ayuda de un flujo adicional de He, se consigue la desolvatación de las gotas a medida que

pasan por el tubo de acero. Al final del tubo, hay una pieza en “T” cuyas salidas conectan por un lado directamente con el inyector de la antorcha del ICP-MS y, por el otro, con un flujo de Ar perpendicular que arrastra las gotas hacia el plasma.

Además, este sistema utiliza convencionalmente un modo de pulso simple para la generación de microgotas. En esta investigación, se utilizó un modo de pulso triple que permitió la reducción del tamaño de las gotas generadas a  $23\ \mu\text{m}$  ( $6,7\ \text{pL}$ ) para un cabezal de  $50\ \mu\text{m}$ , como se puede observar en la Figura 9, y se consiguió su introducción al plasma con un 100 % de eficiencia.<sup>78</sup> Por otro lado, se obtuvieron límites de detección en el rango de los ag para elementos como Mg, Mn, Fe, Cu, Zn o Se, lo que convierte a la técnica en buena candidata para su aplicación al análisis de células individuales.

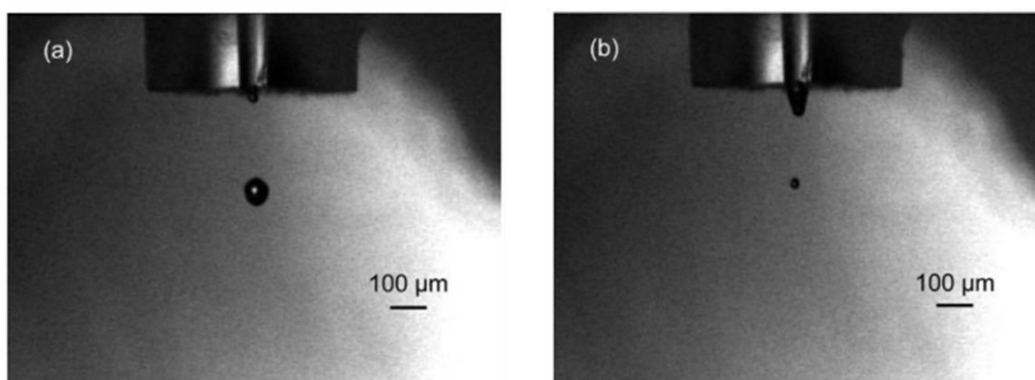


Figura 9. Fotografía de las gotas generadas con un cabezal de  $50\ \mu\text{m}$  utilizando (a) modo de pulso simple (gota de  $67\ \mu\text{m}$ ) y (b) modo de pulso triple ( $23\ \mu\text{m}$ ). Figura extraída de Shigeta y colaboradores.<sup>78</sup>

Tras la optimización del sistema de introducción de muestra y del ICP-SF-MS, demostraron su aplicabilidad a la determinación de elementos constitutivos en células de levadura selenizada, también con un 100 % de eficiencia de transporte.<sup>77</sup> Sin embargo, la máxima dilución posible fue de 1-5 células por cada 100 gotas, con una frecuencia de generación de microgotas de 50 Hz. Diluciones inferiores causaban un ensanchamiento de las señales o incluso la obtención de eventos múltiples debidos a gotas que contienen más de una célula.<sup>77</sup> Esto limita la introducción a solamente 0,5-2,5 células por segundo. Por otro lado, quedan cuestiones sin resolver como los posibles efectos de matriz que provocaron cambios en la sensibilidad entre la medida de células individuales y patrones elementales líquidos o la posible pérdida de integridad celular, particularmente para su

aplicación con células humanas. Un estudio para entender este posible efecto es imprescindible para el diseño de estrategias de calibración adecuadas.

Posteriormente, se desarrollaron diferentes modificaciones del sistema con el objetivo de incrementar la sensibilidad de la medida de elementos traza en células individuales. A modo de ejemplo, se desarrolló un nuevo sistema de desolvatación para el sistema de inyección de microgotas.<sup>79</sup> En este caso se consigue la evaporación del agua de la gota mediante calentamiento (200 °C) a su paso por el tubo del desolvatador, eliminando el vapor de agua generado mediante un enfriamiento posterior y consiguiendo así minimizar su llegada al plasma. El sistema fue caracterizado mediante un ICP-OES, pudiendo adquirir espectros de emisión elementales para células individuales del alga unicelular *Pseudococcomyxa simplex* y obteniendo un claro aumento de la sensibilidad para la detección de metales.

El dispensador de microgotas piezoeléctrico explicado, disponible comercialmente, presenta ciertos inconvenientes como la generación de gotas con un tamaño fijo dependiente del tamaño del cabezal y solamente modificable mediante cambios en los parámetros del dispensador. Son muy sensibles a cambios en las propiedades físicas de la muestra líquida utilizada (contenido en sales, pH), se obturan con facilidad y son muy caros y difíciles de limpiar. Además, la introducción de muestras de manera eficiente y no destructiva puede ser problemática debido al descenso de la muestra por el capilar a la vez que se aplican altos voltajes que pueden afectar a la integridad celular. Esto podría ser una fuerte limitación, ya que si las células explotan en la punta del capilar causarían, además de otros efectos indeseables, importantes efectos de memoria, que se reflejarían en un aumento de la señal del blanco en las gotas consecutivas al evento celular. Este efecto no ha sido observado con células de levadura<sup>77</sup> posiblemente debido a la robustez que les aporta su pared celular. Su aplicación a otros tipos de células como líneas celulares humanas sería probablemente mucho más compleja y problemática. Asimismo, el tamaño de estas levaduras es de 3-5  $\mu\text{m}$ , por lo que también habría que comprobar la capacidad del sistema de embeber células de mayor tamaño dentro de una microgota. Estos problemas pueden ser la causa de que no se haya publicado ninguna aplicación de este sistema a células de mamífero hasta el momento presente.

Alternativamente, surge la utilización de plataformas microfluídicas con canales en la escala micrométrica ideales para la manipulación de células individuales y capaces de encapsularlas en microgotas para su introducción al ICP-MS.<sup>80</sup> Estas plataformas ayudan a reducir la probabilidad de obtener eventos múltiples producidos por la presencia de varias células en la misma gota del aerosol. Para la generación de microgotas se suelen mezclar dos fases inmiscibles, la fase acuosa que contiene la suspensión celular y fases orgánicas como alcoholes. Sin embargo, el límite de cantidad de fase orgánica que tolera el ICP-MS es bajo ya que las partículas de carbono generadas por la incompleta oxidación y combustión de la fase orgánica afectan a la estabilidad del plasma y pueden causar depósitos de carbono en los conos de extracción. La interfase entre la plataforma microfluídica y el ICP-MS es clave y debe mantener la integridad celular y eliminar los componentes utilizados para la generación de la gota que puedan afectar a la detección. Una nueva estrategia fue presentada por Verboket y colaboradores<sup>81</sup>, utilizando un sistema microfluídico para la generación de gotas y su inyección directa en el ICP-MS. El componente principal de este sistema es un chip de eyección asistida de gotas (*liquid assisted droplet ejection*, LADE) que genera gotas de una muestra acuosa en un rango de tamaños de entre 40  $\mu\text{m}$  y 60  $\mu\text{m}$  en las que las células quedan embebidas en una fase muy volátil como el perfluorohexano (PFH). El chip está fabricado con polidimetilsiloxano (PDMS) y es barato, desechable y más robusto ante cambios en las propiedades físicas de la muestra. Las gotas producidas se transportan mediante un flujo ciclónico de He a un tubo de acero inoxidable de 6 mm de diámetro interno y 50 cm de longitud que incluye un desolvatador para evaporar el PFH. Las gotas secas se introducen al plasma tras ser mezcladas con un flujo de Ar introducido mediante un adaptador de flujo laminar, para mantener las condiciones de operación del ICP-MS estables. El sistema se utilizó para la determinación de Fe en glóbulos rojos bovinos de manera individual, obteniendo intensidades de  $^{56}\text{Fe}^+$  de alrededor de 400 cps, que corresponden a  $5 \times 10^8$  átomos en una célula individual, valor que concuerda con la concentración de Fe medida de manera global. Sin embargo, se obtuvo una baja eficiencia de transporte para las células de tan solo un 4,5 % debido a la deposición de células en el sistema. Este chip microfluídico se puede reproducir a bajo coste y modificaciones futuras permitirán la simultaneidad de varios procesos, como el pretratamiento de muestra en el propio chip o la introducción de diferentes muestras paralelamente.

Recientemente, se desarrolló un chip microfluídico de generación de gotas de fácil fabricación, también de PDMS, que se acopló directamente al ICP-MS equipado con un nebulizador de microflujos (micronebulizador PFA) para la determinación de zinc en células individuales de la línea HepG2 (Figura 10).<sup>82</sup>

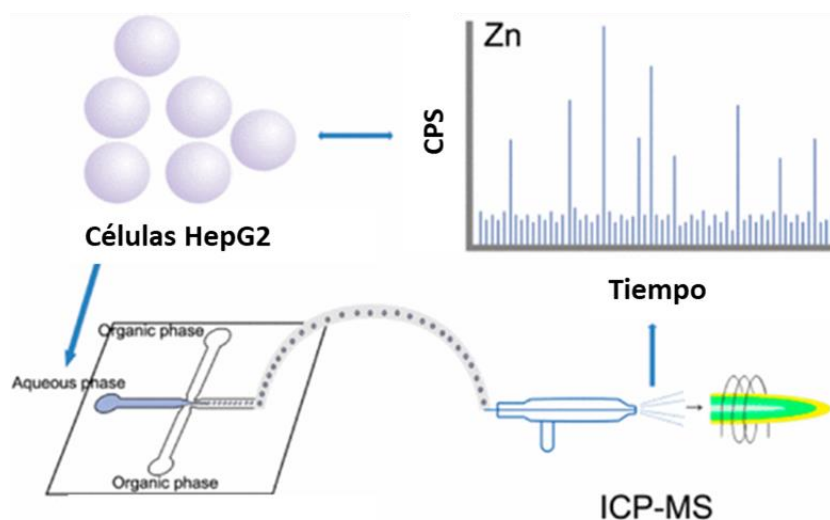


Figura 10. Diagrama esquemático del diseño del chip microfluídico propuesto por Wang y colaboradores<sup>82</sup> para la encapsulación de células en microgotas y su acoplamiento al ICP-MS para el análisis de células individuales.

Las células fueron encapsuladas en gotas mediante la interacción de la suspensión acuosa de células a un flujo de  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  y dos flujos perpendiculares de hexanol de  $12,5 \mu\text{L min}^{-1}$ . Como interfase se utilizó un capilar de sílice fundida de  $75 \mu\text{m}$  de diámetro interno y de 3 cm de longitud que conectó directamente la salida del chip con el nebulizador del ICP-MS y a través del cual las células permanecieron intactas. Mediante el uso del microflujos, la adición de  $\text{O}_2$  y optimización de los parámetros del chip se evitó la inestabilidad del plasma por la introducción de disolvente orgánico sin la necesidad de un sistema desolvador. Finalmente, se validó la aplicabilidad del sistema desarrollado para la medida de Zn en células individuales incubadas con nanopartículas de ZnO, utilizando estas mismas nanopartículas para la calibración. Comparado con el sistema comercial, esta plataforma presentó una eficiencia menor, del 2,96 % pero permitió una alta frecuencia de generación de gotas de entre  $3\text{-}6 \times 10^6$  gotas  $\text{min}^{-1}$ . Este mismo sistema ha sido utilizado para el estudio de incorporación de nanopartículas de Au de diferentes tipos y tamaños en células individuales de la línea HeLa.<sup>83</sup>

Las plataformas microfluídicas basadas en chips de PDMS, como los dos ejemplos anteriores, no soportan altas presiones y requieren el diseño de una interfase para su acoplamiento al ICP-MS. Además, su superficie hidrofóbica limita su rango de aplicaciones. Para solucionar estos problemas en los últimos años se están desarrollando sistemas microfluídicos fabricados con materiales comerciales como vidrio, teflón o *peek* y que toleran presiones mucho mayores. Con esta idea, Wei y colaboradores<sup>84</sup> desarrollaron un sistema de diseño muy simple basado en un conexión de 4 vías. La suspensión celular se introdujo a través de un capilar utilizando una bomba de jeringa a un flujo de  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  y se mezcló con dos flujos perpendiculares de hexanol a  $70 \mu\text{L min}^{-1}$ . La fase orgánica contenía además un 20 % de carbonato de dimetilo como reactivo rico en oxígeno para aumentar la combustión y oxidación del hexanol y evitar así la inestabilidad del plasma y la deposición de carbono en los conos. También se añadió un 2,5 % de Span 80, un tensoactivo que ayudó a estabilizar las gotas y reducir su dispersión. Con estas condiciones, se obtuvieron gotas con un diámetro de aproximadamente  $27 \mu\text{m}$  que fueron transportadas directamente al nebulizador a través de un capilar de  $100 \mu\text{m}$  de diámetro interno. El diseño y fabricación del sistema en *PEEK* resiste altas presiones (5000 psi) permitiendo una alta frecuencia de generación de microgotas de  $5 \times 10^5$  gotas  $\text{min}^{-1}$ . Introduciendo una suspensión celular de  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  a un flujo de  $5 \mu\text{L min}^{-1}$  se redujo la probabilidad de encontrar dos células en una gota por debajo del 0,005 %. En la Figura 11 se puede ver un esquema del sistema desarrollado que se aplicó a la cuantificación de la incorporación de nanopartículas de oro en células individuales de cáncer de mama (MCF-7), utilizando para la calibración la propia suspensión de nanopartículas empleada en la incubación con las células diluida con PBS y añadiendo un 2 % de rodamina B para imitar la matriz celular.

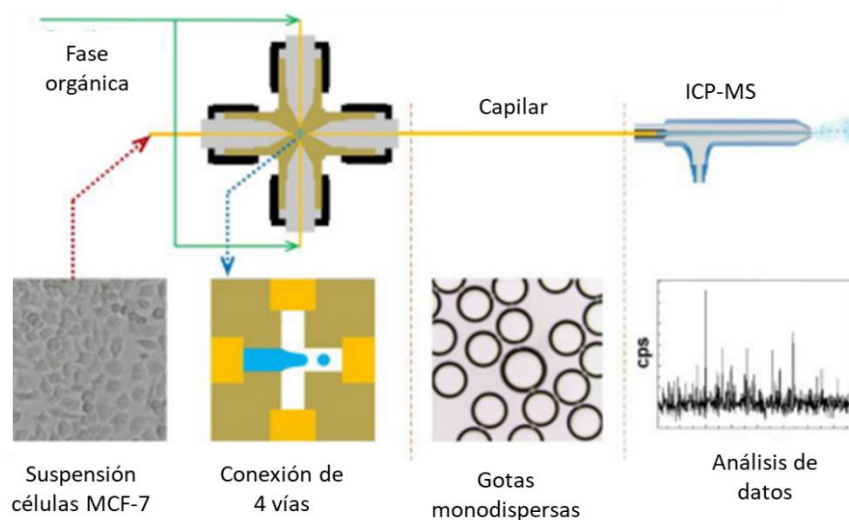


Figura 11. Representación esquemática del generador de microgotas desarrollado por Wei y colaboradores.<sup>84</sup>

Un sistema muy similar fue utilizado para la determinación de plata en células individuales de hepatocarcinoma humano (HepG2) tras su exposición tanto a plata iónica como con nanopartículas de plata.<sup>85</sup> En este caso se consiguieron tamaños de gota en torno a las 25  $\mu\text{m}$  y se utilizó un capilar de sílice fundida de 150  $\mu\text{m}$  de diámetro interno que permitió la visualización de las gotas generadas durante su transporte al ICP-MS y su conexión fácil y directa con el nebulizador, con una eficiencia de transporte de las células cercana al 25 %.

### 1.2.1.3. Análisis de células individuales mediante ablación láser (LA-ICP-MS)

Alternativamente a la introducción “on-line” de células individuales al ICP-MS como son la nebulización neumática o el microdispensador de gotas, existe la posibilidad de emplear sistemas “off-line”, es decir, donde las células no son introducidas en continuo en la fuente de ionización. Estos sistemas implican la inmovilización previa de las células en superficies específicas que luego pueden ser desorbidas a través de acción de algún tipo de radiación, como puede ser la de un láser (LA), y transportadas como un “aerosol sólido” al ICP. El acoplamiento LA-ICP-MS permite el análisis elemental directo de muestras sólidas lo que la convierte en una técnica muy atractiva debido a la poca o nula



necesidad de preparación de muestra. Además, debido a los continuos avances en la resolución espacial y sensibilidad de la técnica, está adquiriendo creciente interés para su aplicación en la obtención de imágenes, tanto cualitativas como cuantitativas, de muestras biológicas y biomédicas, pudiendo utilizarse para evaluar la distribución elemental en tejidos biológicos o incluso en células individuales.

El principio de la técnica se basa en el enfoque pulsos cortos (ns o fs) de gran energía de un haz láser sobre la superficie de una muestra sólida que se encuentra en atmósfera inerte en una celda de ablación. La interacción del láser con la superficie de la muestra provoca el arrancado de material de esta generando un aerosol del sólido. Este aerosol es transportado al ICP-MS con la ayuda de un flujo de gas, generalmente Ar, He o una mezcla de ambos, donde es vaporizado, atomizado e ionizado, para su futura detección por espectrometría de masas. Otras técnicas basadas en espectrometría de masas pueden ser utilizadas para el mapeo cuantitativo, como MALDI, DESI o SIMS. Algunas de ellas, como SIMS, poseen una excelente resolución espacial<sup>86</sup>, sin embargo, LA-ICP-MS destaca por su elevada sensibilidad ( $\text{ng g}^{-1}$ ), reproducibilidad y su mayor rango lineal, características muy apropiadas para el análisis de células individuales.

La técnica de LA-ICP-MS puede ser utilizada para el análisis de células individuales en dos modos de detección diferentes. Se puede utilizar para la obtención de imágenes elementales con resolución subcelular o, alternativamente, para la ablación de células individuales completas con un tamaño del haz de láser mayor. Generalmente, los parámetros utilizados en ambos modos son distintos.<sup>87</sup>

Diferentes avances relacionados con la reducción del diámetro del haz láser, el desarrollo de celdas de ablación con tiempos de evacuación ultrarrápidos y de herramientas para la evaluación y tratamiento de datos ha permitido la obtención de imágenes de células individuales.<sup>88-93</sup> Cuando se pretende evaluar la distribución lateral de un analito en una célula o tejido con resolución subcelular una de las principales limitaciones radica en el propio diámetro del haz del láser. Recientemente, mediante la manipulación del sistema óptico, se ha conseguido disminuir el tamaño del haz hasta  $1 \mu\text{m}$  o incluso por debajo de la micra.<sup>89,94,95</sup> Por otro lado, la disminución del tamaño del haz implica una disminución del material arrancado en cada disparo del láser, lo que conlleva una reducción de la sensibilidad. Además, a medida que se reduce el diámetro

del haz, el tiempo requerido para el análisis de un área de muestra determinada aumenta de forma cuadrática. En este tipo de aplicaciones, el diámetro del haz se optimiza normalmente como compromiso entre la resolución espacial y la sensibilidad requeridas y el tiempo de análisis disponible.<sup>45</sup> La energía del láser se selecciona cuidadosamente para asegurar la ablación completa de la muestra, pero minimizando la contribución de fondo adicional por su interacción con el soporte de la muestra y sin dañar las secciones de muestra adyacentes, lo que puede resultar complejo. Por otro lado, los tiempos de evacuación de las celdas de ablación convencionales son del orden de 0,5-30 s.

Sin embargo, se han desarrollado celdas de ablación con tiempos de evacuación ultrarrápidos<sup>96</sup> donde el aerosol generado por el láser se extrae de manera eficiente hacia el plasma y cuya principal ventaja es la reducción de la dispersión del aerosol, que evita la mezcla de material arrancado por disparos consecutivos del láser incluso trabajando a altas frecuencias de disparo (> 25 Hz). La baja dispersión del aerosol que proporcionan estas celdas ha reducido significativamente la duración de las señales obtenidas a menos de 30 ms.<sup>89,97,98</sup> La llegada del aerosol en un intervalo de tiempo menor provoca un incremento significativo en la relación señal/ruido obtenida. Por ello, con el uso de estas celdas de ablación en combinación con altas frecuencias de disparo del láser, haces de pequeño diámetro y un tiempo de integración bajo en el ICP-MS, se puede conseguir una alta resolución espacial (subcelular) y adecuada sensibilidad para la determinación de elementos traza en muestras sólidas. Sin embargo, para el uso de este tipo de celdas, se necesita de una detección rápida (se discutirá más en detalle en una de las secciones posteriores). El ICP-TOF-MS es el candidato más adecuado debido a la capacidad de análisis multielemental de manera cuasi-simultánea, como se comentará en la sección 1.2.3, que permite adquirir el espectro de masas completo a una velocidad de adquisición de hasta 30 kHz.<sup>99</sup>

Utilizando esta estrategia, Pisonero y colaboradores<sup>88</sup> optimizaron un sistema de ns-LA-ICP-MS equipado con una celda de ablación con tiempo de evacuación ultrarrápidos para estudiar cualitativamente la distribución elemental en células individuales de manera rápida ( $50 \mu\text{m s}^{-1}$ ) y con alta resolución espacial (aprox.  $2 \mu\text{m}$ ). Con este sistema estudiaron la incorporación y distribución intracelular de Au y Cd en fibroblastos de ratón (NIH/3T3) y células humanas de cáncer cervical (HeLa) tras su incubación con

nanopartículas de Au y puntos cuánticos basados en Cd, respectivamente. La resolución obtenida fue suficiente para distinguir adecuadamente entre el fondo, citosol y núcleo de las células, observando la presencia de las nanopartículas y puntos cuánticos utilizados distribuidos por el citosol celular y agregándose en la región perinuclear, pero no en el interior del núcleo como se puede ver en la Figura 12.

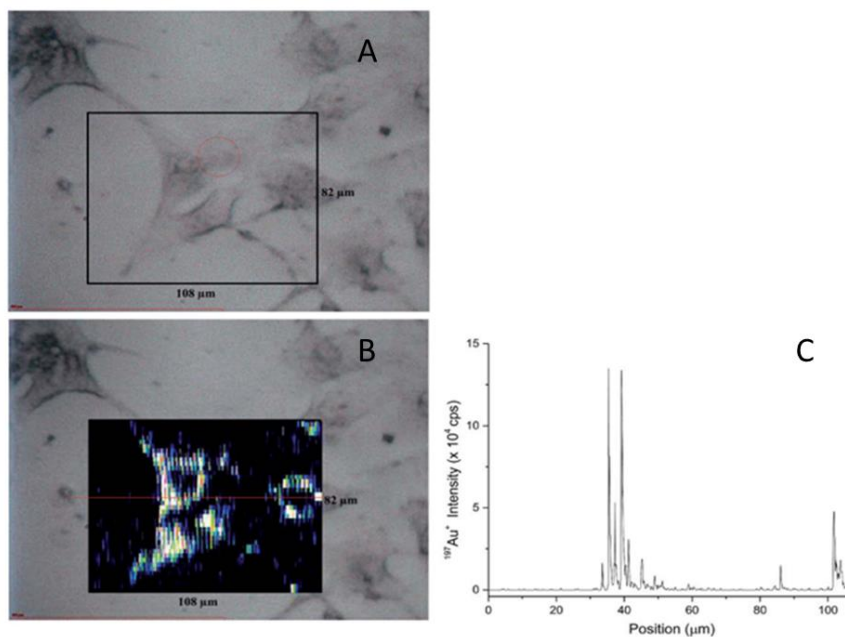


Figura 12. (A) Imagen de campo claro de los fibroblastos NIH/373 fijados, (B) Imagen de LA-ICP-MS para la distribución de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  (distribución de AuNPs) dentro de las células, superpuesta a la imagen anterior y (C) Variación de la señal de  $^{197}\text{Au}^+$  en la línea 20 de la imagen de LA-ICP-MS. Extraída de Pisonero y colaboradores.<sup>88</sup>

Además, se pueden utilizar marcas elementales como complejos de DOTA-lantánido o marcas poliméricas como MAXPAR<sup>TM</sup> para el marcaje de estructuras y componentes celulares para su posterior análisis por LA-ICP-MS.<sup>91,100,101</sup> Por ejemplo, Mueller y colaboradores<sup>91</sup> utilizaron un conjunto de cinco anticuerpos para determinar la fase del ciclo celular de células individuales así como la determinación de beta-actina como marcador de volumen celular en combinación con marcajes metálicos simples, como intercaladores de DNA basados en Ir, que permitieron la visualización directa de las células y su núcleo.

Para obtener resolución subcelular, sin necesidad de un sistema óptico que proporcione pequeños diámetros del láser, se ha desarrollado una técnica conocida como *oversampling*. Esta se basa en irradiar el láser en intervalos más pequeños que el diámetro

del haz, solapando parcialmente los disparos del láser. De esta manera, la señal obtenida se genera solamente de la nueva sección de muestra ablacionada. Para ello, cada disparo del láser debe producir un arrancado total de la muestra, como se muestra en la Figura 13. Así se consigue obtener una resolución espacial menor que el diámetro del láser. Utilizando esta técnica, Drescher y colaboradores<sup>92</sup> estudiaron la distribución de nanopartículas de Au y Ag en fibroblastos de manera individual, obteniendo imágenes cuantitativas con resolución subcelular. Además, se ha propuesto un método de deconvolución para el mapeo submicrométrico utilizando esta estrategia.<sup>102</sup>

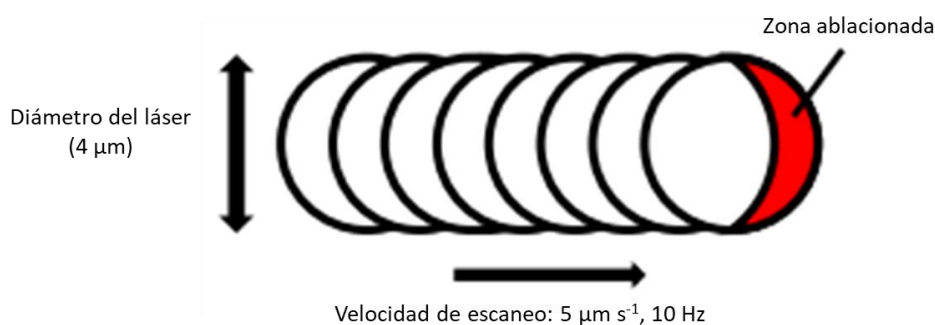


Figura 13. Representación esquemática de la técnica de oversampling. Adaptada de Mueller y colaboradores.<sup>45</sup>

Como alternativa al mapeo elemental con resolución subcelular, la ablación de células completas utilizando un diámetro de haz mayor parece una buena opción para el análisis elemental de células de cualquier tamaño en un tiempo adecuado. En este caso, se utiliza un diámetro de haz ligeramente mayor que la célula de mayor tamaño y la energía del láser es alta para asegurar la ablación completa de la célula en un solo disparo. Recientemente, se ha utilizado esta estrategia para detectar células T CD4+,<sup>103</sup> un tipo de células muy relevante en inmunoterapia. Para ello, las células fueron marcadas en cultivo empleando agentes de contraste utilizados típicamente en estudios de imagen por resonancia magnética basados en gadolinio. Posteriormente, las células fueron fijadas en portaobjetos de vidrio y ablacionadas individualmente utilizando un diámetro del haz de 25 μm, que consiguió la ablación completa de las células, de alrededor de 10 μm, en menos de 1 s. La Figura 14 representa las señales obtenidas, en las que se distingue perfectamente entre células marcadas y no marcadas con Gd. En esta también se pueden visualizar las células antes y después de la ablación.

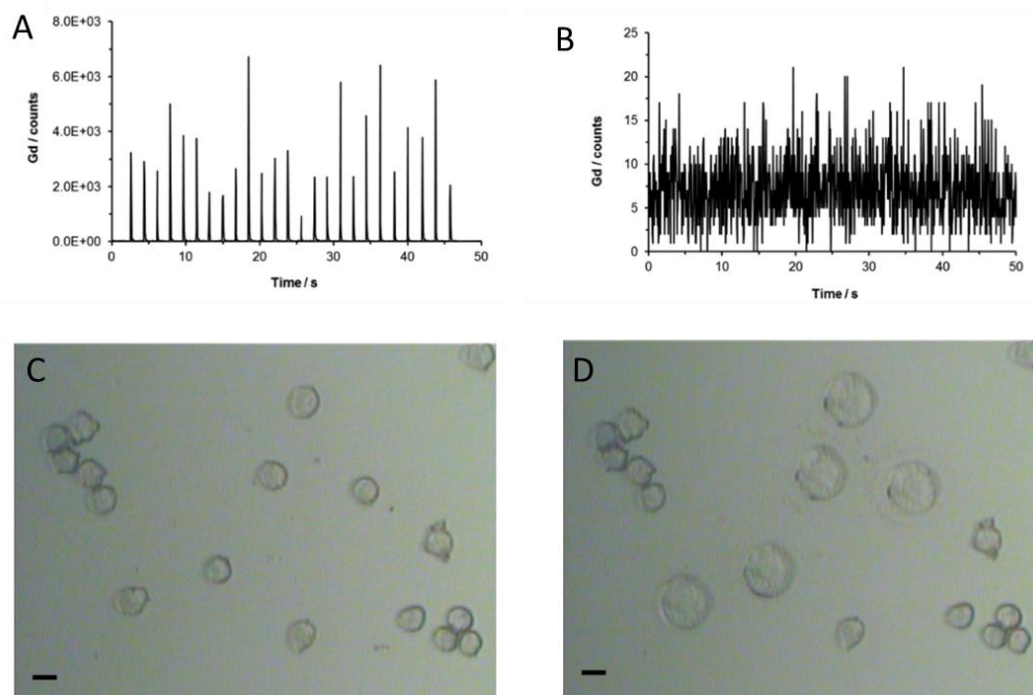


Figura 14. Representación de las señales de  $^{157}\text{Gd}$  obtenidas mediante LA-ICP-MS en (A) 25 células marcadas con Gd-DTPA-BMA, (B) 25 células no marcadas y representación de las células fijadas (C) antes de la ablación y (D) después de la ablación. Adaptada de Managh y colaboradores.<sup>103</sup>

También se utilizó de manera cuantitativa para evaluar el contenido de cobre en células individuales del alga unicelular *Scrippsiella trochoidea*<sup>104</sup> o la incorporación de nanopartículas de oro en células Raw 264.7, monocitos de leucemia de ratón.<sup>105</sup> Asimismo, es posible cuantificar indirectamente proteínas en células individuales mediante su marcaje elemental. Zhai y colaboradores desarrollaron un método basado en LA-ICP-MS para la determinación de integrina  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  en la membrana de células individuales mediante su marcaje con *nanoclusters* de oro funcionalizados con péptidos.<sup>106</sup> La fluorescencia del *nanocluster* fue utilizada para la visualización de la integrina mediante microscopia confocal. Por otro lado, se determinó su composición y estequiometría para determinar el número de integrinas en células individuales mediante LA-ICP-MS, que puede proporcionar información relevante acerca del estado de progresión del cáncer.

La mayor limitación de la técnica con fines cuantitativos es el fraccionamiento elemental e isotópico que se define como la suma de todos los efectos no estequiométricos que se pueden dar durante el proceso de ablación, transporte del

aerosol e ionización en la fuente de ICP. Diferentes parámetros del láser como la longitud de onda, la duración del pulso, la energía o el diámetro del haz influyen en el fraccionamiento elemental. La utilización de pulsos de láser ultracortos (en el orden de los fs) permite un mejor confinamiento de la energía del pulso reduciendo el fraccionamiento y garantizando un aumento de la resolución espacial. Además, la aplicación está limitada a células que puedan identificarse individualmente en el portaobjetos sobre el que han sido depositadas. Desafortunadamente, las células tienden a formar racimos (ver sección inferior derecha de la Figura 12) lo que limita su ablación de forma individual.

Además, la técnica presenta importantes efectos de matriz que hacen necesario el desarrollo de estrategias de calibración como el uso de patrones que imitan la matriz de la muestra. En cuanto al análisis de células individuales, se han desarrollado diferentes estrategias de calibración. En este caso, la mayoría del aerosol generado y transportado al plasma consiste en partículas ricas en carbono, por lo que se han utilizado membranas de nitrocelulosa dopadas con patrones elementales o suspensiones de nanopartículas para la calibración con una matriz similar a la muestra.<sup>92</sup> También se pueden utilizar patrones líquidos embebidos en matrices de gelatina para obtener información cuantitativa<sup>104</sup> intentando imitar el alto contenido proteico de la matriz celular. Por otro lado, Wang y colaboradores utilizaron una impresora de inyección de tinta comercial para la deposición de gotas de los patrones elementales líquidos de volúmenes en el rango de los pL sobre un soporte sólido, con una masa media de patrón de  $18 \pm 1$  ng en cada gota.<sup>105</sup> Además, las gotas contenían un 2 % de rodamina B para imitar el contenido de carbono de una célula y compensar los efectos de matriz.

## **1.2.2. Sistemas de ICP-MS empleados en la detección de células individuales: analizadores de masa**

### **1.2.2.1. Equipos de ICP-MS convencionales**

Una vez revisados los sistemas de introducción de muestra, pieza clave en el análisis de células individuales, se revisarán a continuación los diferentes sistemas de

detección de ICP-MS haciendo un énfasis especial en los analizadores de masas. Hay tres tipos de analizadores de masa utilizados comúnmente en análisis de células individuales mediante ICP-MS: cuadrupolo (ICP-Q-MS), sector magnético o doble enfoque (*sector field*, ICP-SF-MS) y tiempo de vuelo (*time of flight*, ICP-TOF-MS).

Los cuadrupolos están constituidos por cuatro rodillos metálicos de la misma longitud y diámetro dispuestos en paralelo dos a dos y equidistantes en torno a un eje central. Mediante la aplicación de una corriente continua en un par de rodillos y un potencial de radiofrecuencia en el par opuesto, se consigue que solamente los iones de una relación  $m/z$  seleccionada pasen a través del cuadrupolo hacia el detector, mientras que el resto de los iones son expulsados del analizador. Este proceso se repite para cada relación  $m/z$  en un análisis multielemental, lo que conlleva un tiempo de estabilización o *settling time*, necesario para que se estabilicen los campos eléctricos y magnéticos inducidos por el cuadrupolo, que cambian para la medida de diferentes  $m/z$ . Por otro lado, los analizadores de doble enfoque están formados por un sector magnético y un sector electrostático que pueden estar dispuestos de diferentes modos dando lugar a diferentes geometrías. Una de las más típicas es la geometría Nier-Johnson inversa, en la que el sector magnético está situado antes del electrostático. Los iones procedentes de la interfase de extracción son enfocados a una rendija de entrada al analizador de apertura variable. Estos iones son primeramente separados en función de su  $m/z$  en el sector magnético. Manteniendo fijo el voltaje y variando el campo magnético, los iones siguen trayectorias diferentes, cuyo radio depende de su relación  $m/z$ , lo que permite su separación. Una rendija intermedia selecciona los iones de una determinada  $m/z$  que pasan al sector electrostático donde se enfocan en función de su energía cinética. Este tipo de analizadores permite la medida con alta resolución, a través del ajuste del diámetro de las rendijas de entrada y de salida del analizador. Tanto en los analizadores de tipo cuadrupolo como doble enfoque, la medida multielemental de diferentes relaciones  $m/z$  se realiza de forma secuencial.

Los analizadores de tiempo de vuelo se basan en que la energía cinética de los iones,  $E_k$ , depende de su masa ( $m$ ) y velocidad ( $v$ ). Por lo tanto, si un haz de iones es acelerado con la misma energía cinética en un tubo de vuelo, la velocidad de los iones será diferente y dependiente de su relación  $m/z$ . La relación entre el tiempo de vuelo de

un ión y su relación  $m/z$  viene dada por la ecuación (1), siendo  $U$  el voltaje de aceleración y los términos  $t$  y  $D$  el tiempo y la distancia de vuelo, respectivamente. Esto se puede aprovechar para separar los iones de diferente  $m/z$  ya que los iones más ligeros llegarán antes al detector que los más pesados.

$$\frac{m}{z} = \frac{2 U t^2}{D^2} \quad (1)$$

En general, los equipos ICP-SF-MS son los más sensibles y con mayor resolución de masa, sin embargo, puesto que los campos magnéticos presentan un ciclo de histéresis relativamente lento, el análisis multielemental rápido está relativamente limitado.<sup>107,108</sup> Los ICP-Q-MS presentan límites de detección algo inferiores con los equipos de doble enfoque y utilizan celdas de colisión-reacción para evitar interferencias espectrales, siendo además los equipos más simples en cuanto a manejo y mantenimiento y generando señales de barrido multielemental más rápidas que el equipo de ICP-SF-MS.<sup>109</sup> En cualquier caso, la adquisición de señales en estos dos tipos de espectrómetros de masas es secuencial, lo que implica la adquisición de únicamente un isótopo simultáneamente. Esto hace que el tiempo del análisis dependa del número de isótopos analizados. La adquisición secuencial representa una limitación clara para la medida de señales multielementales cortas o de muestras de un volumen limitado ya que el tiempo del análisis solo permite la medida de un número reducido de isótopos. Para el análisis de células individuales, los tiempos de estabilización de los analizadores secuenciales son a menudo comparables a la propia duración del evento celular (nube de iones en el plasma de una sola célula y que corresponde a unos 100-500  $\mu\text{s}$ ),<sup>110</sup> lo que los limita a la monitorización de un solo isótopo en cada medida.

Por el contrario, tanto los ICP-MS de tipo multicolector (MC-ICP-MS) como los ICP-TOF-MS permiten la medida multi-isotópica simultánea los primeros y quasi-simultánea los segundos. Los MC-ICP-MS son equipos basados en analizadores de doble enfoque pero, en este caso, con el sector magnético a continuación del eléctrico, lo que posibilita que cada ion siga una trayectoria de radio diferente al anterior y puedan ser separados en el espacio posibilitando la medida simultánea si se posicionan varios detectores, como multiplicadores de electrones (EMs) y hasta 9 copas de Faraday<sup>111</sup>, en lugar de un único



detector, en diferentes puntos. Esto posibilita la medida de varios isótopos exactamente al mismo tiempo, pero, en la práctica, estos equipos están diseñados para la medida de un número limitado de isótopos y en un rango de masas restringido.<sup>112</sup> Además, la mayor desventaja de las copas de Faraday frente a los EMs es su menor sensibilidad.

Por otro lado, los equipos de ICP-TOF-MS permiten la detección cuasi-simultánea y con alta resolución temporal (en los pocos  $\mu\text{s}$ ) del espectro de masas completo.<sup>113</sup> Esto los convierte en los equipos más adecuados para la medida multielemental de señales transitorias muy cortas como las que se obtienen en el análisis de células o nanopartículas individuales o en la obtención de imágenes elementales de alta resolución mediante LA-ICP-MS. No obstante, la sensibilidad de estos equipos disminuye notablemente, hasta uno o dos órdenes de magnitud menor que en el caso de los equipos de tipo cuadrupolo o doble enfoque.<sup>113</sup> La razón instrumental de esto es la baja transmisión de iones o *duty cycle* que se define generalmente como la fracción de iones que llegan al analizador de masa. En la medida mediante ICP-TOF-MS, los iones generados que atraviesan la interfase de extracción son acelerados al analizador en grupos o paquetes de iones exactamente al mismo tiempo para la adquisición del espectro de masas en pocos  $\mu\text{s}$ . Por lo tanto, la cantidad de iones medidos de cada elemento es significativamente menor que en el caso de ICP-Q-MS o ICP-SF-MS.<sup>114</sup>

A pesar del potencial del ICP-MS para el análisis de células y nanopartículas individuales, este también presenta dificultades como la ocurrencia de interferencias espectrales.<sup>115-117</sup> Para solucionar el solapamiento espectral causado por iones atómicos y poliatómicos que presentan la misma  $m/z$  que el analito, se han desarrollado diferentes estrategias como el uso de instrumentos de alta resolución.<sup>118,119</sup> Alternativamente, el uso de celdas de colisión-reacción (*collision/reaction cell*, CRC) en equipos basados en analizadores de tipo cuadrupolo es una tecnología versátil para evitar las interferencias espectrales, siendo aún más prometedora desde la introducción de los analizadores de triple cuadrupolo (ICP-TQ-MS) en 2012.<sup>120,121</sup> Estos permiten un mejor control de los procesos que ocurren en la CRC como resultado de la doble selección de masa que permite la presencia de un cuadrupolo adicional situado antes de la CRC. Sin embargo, se ha visto que la presurización de la celda con gases de colisión-reacción tiene un efecto en la señal obtenida. Se comprobó que la utilización de un gas inerte, como el He, en la celda

para evitar interferencias mediante discriminación por energía cinética (*kinetic energy discrimination*, KED) influía en la duración de los eventos obtenidos en nanopartículas individuales.<sup>116</sup> Recientemente, Bolea y colaboradores demostraron el efecto de la introducción de un gas en la CRC en la duración de los eventos para diferentes tipos de nanopartículas afectadas por interferencias espectrales, como de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , causando un incremento significativo de 0,5 ms hasta 6 ms.<sup>122</sup> Una ilustración gráfica de este efecto se puede ver en la Figura 15. El impacto es mayor con la utilización de gases más pesados, como el  $\text{NH}_3$ , en comparación con otros gases más ligeros, como el He o  $\text{H}_2$ . Asimismo, la duración de las señales obtenidas se prolonga en mayor medida para mayores flujos de gas utilizados en la celda y mayores diámetros de partícula.<sup>122</sup> El aumento del ancho de los eventos obtenidos afecta negativamente a las características analíticas de la técnica, obteniendo mayores límites de detección, aumentando la probabilidad de eventos múltiples y afectando a la precisión y exactitud de las medidas.

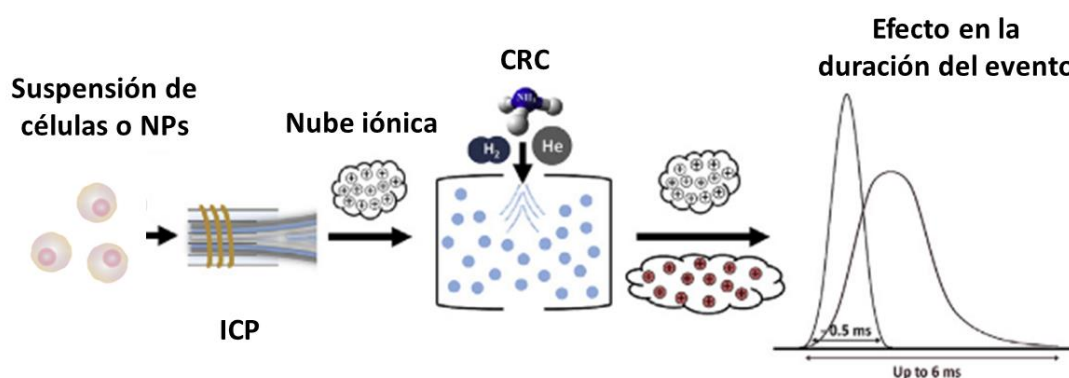


Figura 15. Representación del efecto del uso de celdas de colisión-reacción en la duración de los eventos obtenidos en el análisis de nanopartículas y células individuales mediante ICP-MS. Adaptado de Bolea y colaboradores.<sup>122</sup>

### 1.2.2.2. Citometría de masas (CyTOF)

Las ventajas comentadas del ICP-TOF-MS en cuanto a la posibilidad de análisis multielemental en células individuales, llevaron al grupo del Profesor Tanner a desarrollar una variante de este tipo de analizador masas y cuyo campo de aplicación está básicamente centrado en el análisis multiparamétrico de biomarcadores células individuales mediante la utilización de anticuerpos con marcas isotópicas.<sup>43</sup> El interés en este tipo de aplicación viene derivado del hecho de que la identificación funcional y

fenotípica de células en poblaciones heterogéneas requiere de determinaciones cuantitativas de varios biomarcadores de forma simultánea en células individuales.<sup>123</sup> La misma necesidad de realizar ensayos multiparamétricos se da en investigaciones de proteómica y genómica con el objeto de estudiar la compleja interacción entre genes, proteínas y metabolitos que pueden transformar una célula normal en una célula causante de enfermedad. La citometría de flujo empleando anticuerpos con marcas fluorescentes es la técnica más utilizada para el análisis multiparamétrico en células individuales.

La citometría de flujo para este tipo de estudios requiere la disponibilidad de anticuerpos específicos para cada antígeno diana, que no presenten reactividad cruzada con otros antígenos. Estos anticuerpos se marcan con fluoróforos que deben emitir en diferentes longitudes de onda. Tras la reacción del anticuerpo con los antígenos en las células, estas se hacen pasar de manera individual a través de un haz de láser que excita los fluoróforos unidos a los anticuerpos. La medida de la luz transmitida y dispersada del láser proporciona información del tamaño y granulosidad de las células y, por otro lado, la emisión fluorescente de las marcas depende de la presencia y cantidad de antígeno en la célula. Sin embargo, la técnica se ve limitada al análisis de alrededor de 10 parámetros simultáneamente aunque, como caso excepcional, se han llegado a monitorizar hasta 17 parámetros en células mononucleares de sangre periférica.<sup>124</sup> Estas limitaciones se deben principalmente al solapamiento espectral entre las marcas fluorescentes utilizadas<sup>125</sup>, que pueden ser desde fluoróforos orgánicos hasta puntos cuánticos, estos últimos con la ventaja de presentar bandas de emisión más estrechas.<sup>126</sup> También se pueden encontrar otras limitaciones como la inactivación de la fluorescencia o la propia autofluorescencia que pueden presentar las células.

Por ello, el desarrollo de una tecnología que minimice las actuales limitaciones de la citometría de flujo es altamente deseable. Así surge la denominada citometría de masas o CyTOF en su versión comercial que se basa en el marcaje de anticuerpos con marcas elementales, en lugar de fluorescentes, y el uso del ICP-TOF-MS para la detección, aprovechando su alta resolución, sensibilidad y rapidez de análisis. Debido a la gran variedad de isótopos estables que se pueden utilizar como marcadores, se pueden detectar simultáneamente una gran variedad de biomarcadores a través de la

cuantificación de los isótopos unidos al biomarcador diana mediante la reacción antígeno-anticuerpo.

Los citómetros de masas no dejan de ser un ICP-MS adaptado para el análisis de células individuales. El ICP-MS fue utilizado por primera vez como detector en inmunoensayos por Baranov y colaboradores que demostraron la posibilidad de utilizar anticuerpos con marcas elementales, como Au<sup>127</sup> o lantánidos.<sup>128</sup> La adaptación de estos inmunoensayos a estudios celulares sentaron las bases para el desarrollo del citómetro de masas. Este se puede dividir en tres partes: el sistema de introducción de muestra, la fuente de ICP y el analizador de masa de tipo tiempo de vuelo (TOF-MS). El sistema de introducción de muestras ya se describió en la sección 1.1.2. y posee una eficiencia de transporte final de un 30-40 %. Como en cualquier ICP-MS, las células que llegan al plasma se vaporizan completamente y atomizan, y los iones formados pasan la interfase para llegar al analizador. Una vez en el TOF, los iones son acelerados a un potencial determinado, por lo que los iones viajan a una velocidad inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su masa. Esto permite su separación en función de su relación m/z para finalmente llegar al detector, fijado para medir m/z en el rango de 80-200, lo que representa un aspecto diferencial a otros analizadores de TOF en los que se puede analizar todo el espectro de masas.<sup>129</sup>

En citometría de masas no se puede registrar la transmisión y dispersión de luz como en el caso de la citometría de flujo por lo que se suelen utilizar especies marcadoras de ADN para identificar eventos celulares. Típicamente se utilizan compuestos que se intercalan en el ADN basados en Rh<sup>130</sup> o Ir.<sup>131</sup> Sin embargo, también se pueden utilizar compuestos de Pt como el cisplatino para marcar el ADN.<sup>132</sup> El CyTOF permite la medida de unos 100 isótopos estables de metales pero actualmente se pueden encontrar hasta 40 marcas isotópicas disponibles, que posibilitan el análisis simultáneo de alrededor de 40 parámetros, incluyendo el contenido en ADN, viabilidad celular y tamaño celular.<sup>129</sup> Entre estas, son comunes los isótopos de lantánidos, debido a su alta sensibilidad en ICP-MS y a su baja abundancia en sistemas biológicos, lo que garantiza un fondo bajo en las medidas. Respecto a la citometría de flujo, presenta ventajas en términos de sensibilidad, en el número de parámetros que pueden ser detectados simultáneamente, así como la posibilidad de cuantificación. Para corregir la deriva de la señal durante largos periodos

de medida o variaciones entre diferentes días, se añaden a la muestra perlas de poliestireno cargadas de lantánidos que son estables durante largos periodos de tiempo, por lo que se pueden utilizar como patrón interno.<sup>129</sup> En cambio, el rendimiento de la técnica se ve limitado por el número de células que pueden ser analizadas (“throughput”) que está alrededor 1000 células  $s^{-1}$ , mientras que los citómetros de flujo llegan hasta 20000 células  $s^{-1}$ . Además, la eficiencia de introducción de muestra del citómetro de masas (30-40 %) es superada notablemente por los citómetros de flujo donde se consiguen eficiencias de prácticamente 100 %.<sup>133</sup>

Las etapas del protocolo general de trabajo en citometría de masas son muy similares a las de citometría de flujo convencional y se esquematizan en la Figura 16. Las células se conjugan con anticuerpos específicos de los antígenos diana que están marcados con isótopos metálicos, típicamente de lantánidos en su forma monoisotópica.<sup>134,135</sup> Como se explicó anteriormente, las células se tiñen a la vez con moléculas que se intercalan en el ADN y que contienen elementos como el Rh o Ir para confirmar la detección de eventos celulares y obtener, a su vez, información del contenido en ADN y viabilidad celular.<sup>136</sup> Las células individuales marcadas son nebulizadas en gotas de un aerosol y llevadas al plasma. Las nubes iónicas formadas se transfieren inmediatamente al alto vacío del espectrómetro de masas. Finalmente, la utilización de un ICP-TOF-MS permite la medida cuasi-simultánea de los isótopos utilizados como marcas en las cortas señales transitorias que genera cada célula.

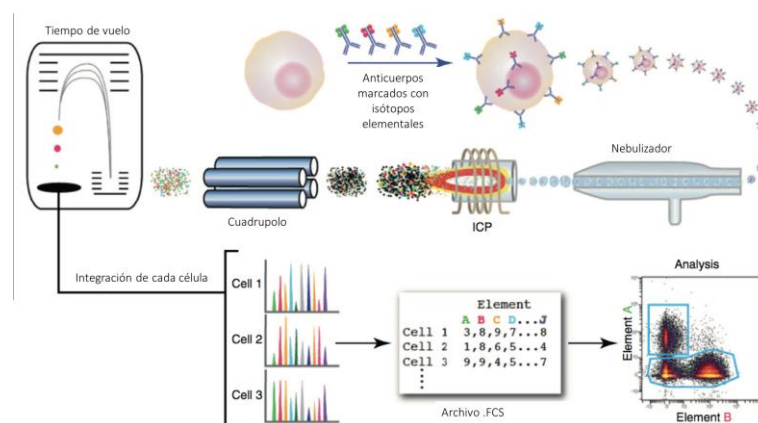


Figura 16. Protocolo de trabajo general en citometría de masas. Adaptado de Bendall y colaboradores.<sup>133</sup>

Como todo el material celular es ionizado, se producen iones atómicos de elementos típicos de las células (C, N, O) además de los de los lantánidos. Para separar los iones de las marcas, generalmente lantánidos, de los iones de estos elementos mucho más abundantes, el citómetro de masas dispone de un cuadrupolo previo al analizador de tiempo de vuelo (*quadrupole-time-of-flight*, qTOF). El cuadrupolo actúa directamente como un filtro que solo permite a los iones elementales más pesados, que son los empleados como marcas, pasar al TOF que posee un intervalo de barrido menor y permite obtener el espectro de masas con  $m/z$  entre 80 y 200 y ser finalmente cuantificados. Esto junto con un poder de resolución menor, proporcionan al CyTOF una sensibilidad superior que en los ICP-TOF-MS convencionales<sup>70</sup> pero limita su aplicabilidad general, particularmente para aquellos elementos de  $m/z < 80$ .

La citometría de masas ha sido ampliamente utilizada en el estudio del perfil de ARN y patrones de expresión proteica en células individuales siendo aplicada en una gran variedad de aplicaciones biológicas como la identificación de poblaciones y subpoblaciones celulares patológicas,<sup>137-141</sup> análisis de heterogeneidad celular,<sup>142-144</sup> caracterización fenotípica de las células<sup>145</sup> o el estudio de interacción entre virus y sus células hospedadoras,<sup>146</sup> por ejemplo.

Para aumentar el campo de aplicación la citometría de masas se puede utilizar en combinación con otras técnicas. Por ejemplo, puede ser utilizado como técnica de imagen mediante el acoplamiento con un sistema de ablación láser. A este acoplamiento se le denomina *imaging mass cytometry* (IMC) y permite el mapeo multianalito simultáneo de biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas con resolución subcelular.<sup>147</sup> Por ejemplo, utilizando una celda de ablación con un tiempo de evacuación de 30 ms, que proporcionó una resolución lateral de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , se consiguió el mapeo de 32 proteínas y sus modificaciones en tejidos de cáncer de mama con resolución subcelular.<sup>148</sup>

### **1.2.3. Resolución temporal: tiempo de integración**

Como se ha establecido anteriormente, para el análisis de células individuales mediante ICP-MS es necesario introducir al plasma suspensiones de células altamente diluidas para que lleguen al plasma de forma individual. Así, en el plasma se generan

plumas o nubes iónicas que corresponden a células individuales y que producen señales transitorias muy cortas que se conocen como eventos, de una duración de 100-500  $\mu$ s para una célula típica, como se mencionó anteriormente.<sup>43,44</sup> Por lo tanto, la adquisición de señales en este tipo de análisis requiere de una alta resolución temporal, es decir, que el detector recoja señales diferenciadas de eventos independientes. La detección de iones en ICP-MS se realiza normalmente en intervalos de tiempo definidos conocidos como *dwell time* o tiempo de integración. Por lo tanto, el tiempo de integración determina la frecuencia de adquisición de datos. Además, en equipos con analizadores secuenciales como el cuadrupolo, hay que tener en cuenta el *settling time*, tiempo empleado en la estabilización de las diferentes condiciones de medida de masas diferentes.

En el análisis tanto de células como de nanopartículas individuales se utilizan tiempos de integración de 10 ms o menores. Dada la duración de los eventos, el uso de tiempos de integración en el rango de los milisegundos implica la adquisición de un único punto o dato por evento. Además, entre dos ventanas de integración adyacentes puede haber un tiempo de estabilización o un tiempo muerto del detector<sup>37</sup> donde no se adquiere la señal provocando pérdidas en el conteo de iones. Por esta razón, se pueden dar diversas situaciones que se esquematizan en la Figura 17. La situación ideal es la presencia de una única célula en una misma ventana de integración (situación A). Sin embargo, también se puede dar la coincidencia de una o más células en una misma ventana de integración (situación B), siendo detectadas como una sola con una intensidad del elemento de interés mucho mayor. Otra opción, es la presencia de una célula entre dos tiempos de integración adyacentes, lo que puede provocar su detección parcial o como dos células con menor intensidad del elemento medido, sesgando su determinación cuantitativa (situaciones C). Finalmente, también es posible la situación menos deseada que es en la que el evento celular se produce fuera del tiempo de integración y no es detectado (situación D). Esto refleja la influencia del tiempo de integración en la calidad de los resultados obtenidos.

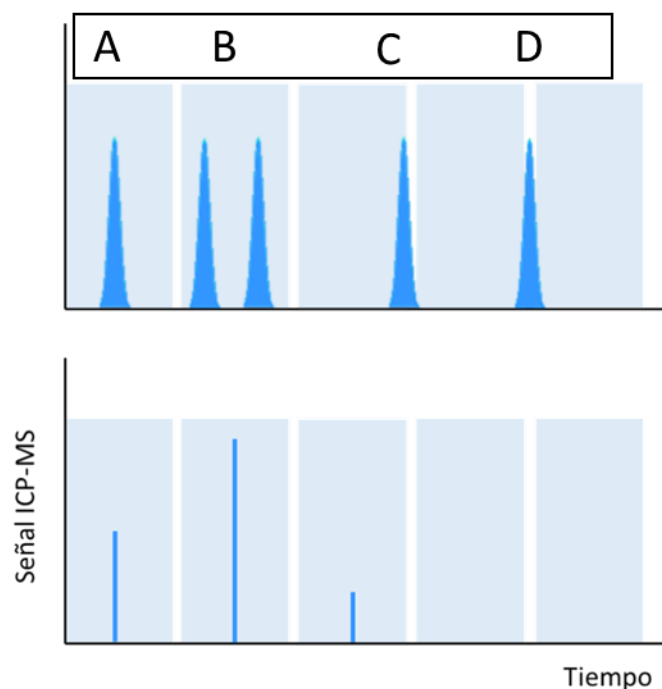


Figura 17. Efecto del tiempo de integración en la media de células/nanopartículas individuales.

La probabilidad de que ocurran las situaciones representadas en la Figura 17 dependen del tiempo de integración utilizado. La llegada de células individuales al plasma es aleatoria por lo que la probabilidad de detectar eventos múltiples producidos por la llegada de dos o más células en una misma ventana de integración se puede calcular mediante la distribución de Poisson.<sup>44</sup> Utilizando tiempos de integración en el rango de los milisegundos, esta probabilidad disminuye cuando se aumenta la resolución temporal, es decir, se reduce el tiempo de integración. Esto permite aumentar la frecuencia de introducción de células que está determinada por el número de células en la muestra y el flujo de introducción de muestra, pero también por la eficiencia de transporte. No obstante, la frecuencia de introducción de células al plasma de manera individual evitando eventos múltiples siempre estará limitada por la duración de la generación de la nube iónica. Para una pluma iónica de 100-500  $\mu\text{s}$  la limitación teórica para detectar las células como eventos diferentes es de 500-2000 células  $\text{s}^{-1}$ .<sup>44</sup> Por otro lado, también en el rango de los milisegundos, la probabilidad de detectar el evento de una célula individual dividido en dos ventanas de integración adyacentes aumenta a medida que se reduce el tiempo de integración.



Para solucionar este tipo de artefactos en la medida se pueden utilizar tiempos de integración menores a la duración del evento, en el rango de los microsegundos. En este caso es posible la adquisición de varios puntos de medida por evento celular, pudiendo seguir su perfil y relacionar el área del pico resultante con la masa del elemento en la célula. Sin embargo, el uso de estos tiempos de integración añade complejidad a la adquisición, almacenamiento y tratamiento de datos. Los continuos avances en la instrumentación disponible están haciendo cada vez más común el uso de estos tiempos de integración para el análisis tanto de células<sup>65,149</sup> como de nanopartículas<sup>110,150,151</sup> individuales.

Por otro lado, el tiempo de integración tiene una influencia muy significativa en la sensibilidad de la medida. Como se puede ver en la Figura 18, cuando se utilizan tiempos de integración de milisegundos, mayores que la duración del evento, la señal de cada célula individual se mide como un evento promediado con la contribución del fondo en la misma ventana de integración, al que influyen el fondo instrumental y la concentración de especies disueltas. La señal continua del fondo aumenta proporcionalmente con el tiempo de integración,<sup>44,152</sup> lo que no pasa con la señal de los eventos. Además, este aumento de la señal del fondo afecta negativamente al límite de detección de la medida. A medida que se reduce el tiempo de integración la relación señal/ruido de la medida mejora notablemente al disminuir la contribución del fondo a la señal del evento celular, especialmente en el rango de los microsegundos. Esto a su vez facilita la discriminación de eventos celulares del fondo, favoreciendo el análisis de muestras con mayores concentraciones del elemento medido en su forma iónica.

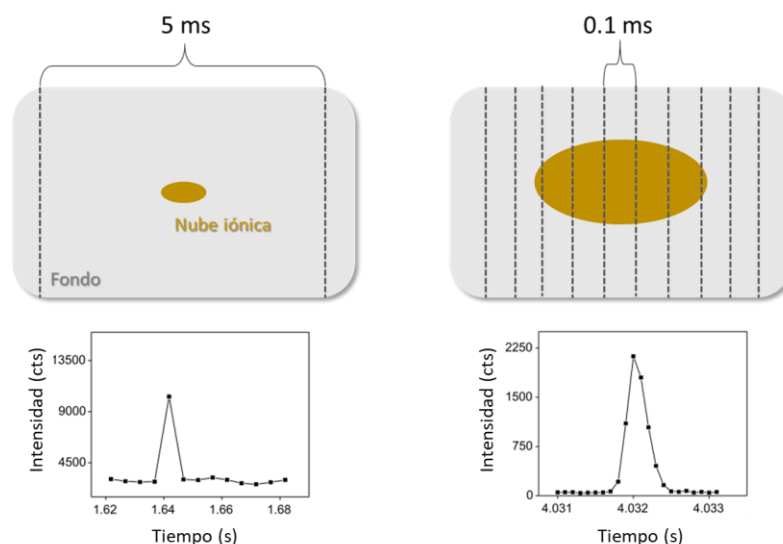


Figura 18. Efecto del tiempo de integración en la relación señal/ruido de la medida. Figura adaptada de Liu y colaboradores.<sup>149</sup>

Instrumentalmente, algunos de los instrumentos ICP-Q-MS o ICP-SF-MS comerciales están todavía limitados en cuanto resolución temporal, permitiendo reducir el tiempo de integración a 1-10 ms, aunque los equipos más modernos permiten utilizar tiempos de integración en el rango de los  $\mu$ s. Para mejorar la resolución temporal en la medida mediante ICP-MS, se han desarrollado diferentes sistemas de medida de intensidad de corriente externos que permitan la lectura de señales analógicas y digitales directamente de detectores de tipo multiplicador de electrones secundarios (*secondary electron multiplier*, SEM). Por ejemplo, Gschwind y colaboradores<sup>76</sup> e Iwai y colaboradores<sup>153</sup> utilizaron un osciloscopio de almacenamiento digital para la lectura directa de señales analógicas del detector con el objetivo de obtener tiempos de integración más cortos, incluso por debajo de los 10  $\mu$ s. Miyashita y colaboradores<sup>65</sup> emplearon un sistema de conteo de iones externo para la lectura directa de señales conectado al SEM a través de un generador de señales sin tiempo muerto, que permite la adquisición de señales con un tiempo de integración de 50  $\mu$ s.

Las ventajas del uso de tiempos de integración de microsegundos se aprecia perfectamente la Figura 19, que muestra los resultados obtenidos por Miyashita y colaboradores<sup>65</sup> para la medida de  $^{31}\text{P}$  en células del alga unicelular *C. merolae* 10D utilizando tiempos de integración desde 10 ms hasta 0,05 ms. Mediante la reducción del tiempo de integración pasaron de obtener tan solo un punto de medida por evento a una

media de 3,4 puntos. Por otro lado, redujeron la probabilidad de la presencia de dos células en la misma ventana de integración de un 1,8 % a un 0,00004 % para una suspensión celular de  $80 \text{ células } \mu\text{L}^{-1}$  introducida a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Finalmente, se mejoró la relación señal/ruido entre 12,9 y 22 veces en la medida de  $^{31}\text{P}$  para diferentes tipos de células microbianas.

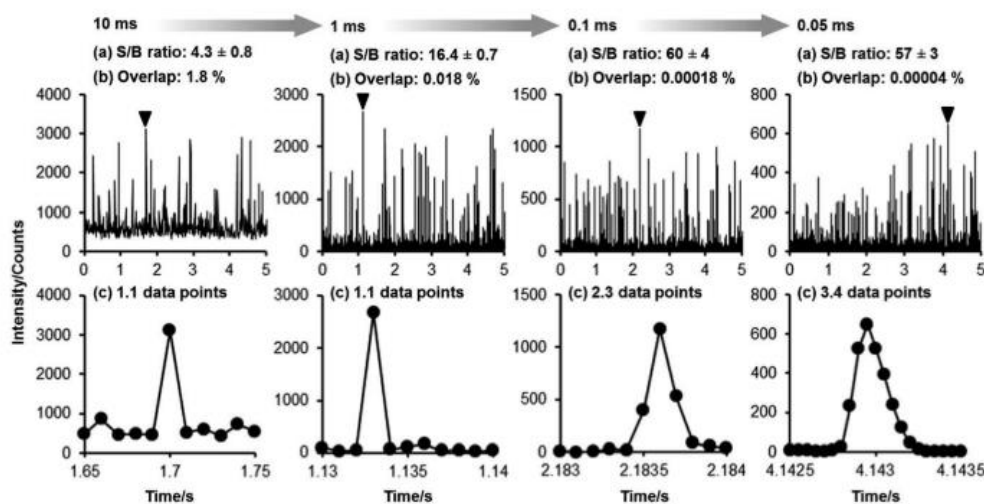


Figura 19. Relación entre el tiempo de integración y: (a) relación señal/ruido, (b) probabilidad de eventos múltiples, (c) número de puntos por eventos. Extraída de Miyashita y colaboradores.<sup>65</sup>

Por otro lado, es de destacar que el grupo de investigación de Engelhard y colaboradores<sup>154</sup> desarrolló una unidad de adquisición de datos para la lectura de señales de un SEM con una resolución temporal de  $5 \mu\text{s}$  y que permite la adquisición de datos de manera continua durante cualquier tiempo de medida. Con estos sistemas se consigue reducir el *settling time* a valores prácticamente despreciables (por debajo de 10 ns).

### 1.2.4. Calibración y eficiencia de transporte

En la sección 1.2 se explicó que la intensidad de los eventos obtenidos en *single cell* ICP-MS era proporcional a la masa del elemento presente en las células o nanopartículas individuales. Cuando el objetivo del análisis es la determinación cuantitativa del elemento en cada célula, se necesita de estrategias de calibración de la señal que permitan transformar la intensidad de los eventos en la masa del elemento por célula. La calibración se puede llevar a cabo utilizando patrones líquidos<sup>63,149</sup> o patrones

de nanopartículas bien caracterizadas<sup>49,155</sup> que pueden ser embebidas en gotas individuales monodispersas cuando se utilizan dispensadores de microgotas.<sup>77,81</sup>

En la calibración de la señal mediante el uso de nanopartículas, se tienen en cuenta las características de estas, como tamaño, geometría y densidad, para calcular la masa o el número de átomos del elemento de interés que contienen. Posteriormente, las nanopartículas se introducen al ICP-MS en las mismas condiciones experimentales que las células, lo que implica su dilución en la misma matriz y medida utilizando el mismo flujo de introducción de muestra y tiempo de integración. Así, se puede establecer una relación entre la intensidad obtenida (cuentas) para los eventos de las nanopartículas con el número de átomos que contienen del elemento. Esta relación de intensidad por átomo del elemento se puede aprovechar para transformar la intensidad de los eventos celulares en la cantidad del elemento presente en cada célula individual. La calibración de la señal mediante nanopartículas requiere de patrones de nanopartículas monodispersas del elemento a medir que, además, deben estar bien caracterizados y que no siempre están comercialmente disponibles. Además, deben tener un tamaño adecuado, suficientemente pequeño como para garantizar su completa atomización en ICP-MS<sup>156</sup> y suficientemente grande para la obtención inequívoca de señales por encima del fondo.

El uso de patrones elementales líquidos para la cuantificación en células individuales implica la medida de un calibrado externo del elemento en las mismas condiciones experimentales que las células, como en el caso anterior. Tras obtener la recta de calibrado, la masa del elemento en cada célula individual se puede obtener utilizando la ecuación (2):<sup>49</sup>

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \quad (2)$$

Donde  $m_c$  es la masa del elemento medido en la célula,  $\eta$  es la eficiencia de transporte del patrón inorgánico (diferente a la eficacia de transporte de las células),  $F$  es el flujo de introducción de muestra,  $t$  es el tiempo de integración,  $I$  es la intensidad del evento (a la que se le resta la intensidad del fondo para evitar cualquier contribución de especies disueltas del elemento en la muestra) y  $b$  es la pendiente de la curva de calibración obtenida. Esta estrategia se utiliza a menudo en SC-ICP-MS y asume que los iones elementales presentes en una célula individual y los iones de los patrones líquidos

se forman de manera similar en el plasma, lo que implica que la señal obtenida depende solo de la masa del elemento transportada al plasma.<sup>62</sup> Hay que destacar que cuando se utilizan tiempos de integración menores a la duración del evento (en el rango de los  $\mu\text{s}$ ), se obtienen varios puntos por evento. En este caso, la cuantificación implica la integración de la señal obtenida y la ecuación (2) se transforma en la ecuación (3)<sup>149</sup>, donde A representa el área del pico resultante:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot A}{b_1} \quad (3)$$

Por otro lado, este tipo de calibración requiere la determinación de la eficiencia de transporte de los patrones elementales líquidos. La eficiencia de transporte se define como la relación entre la cantidad de analito que alcanza el plasma y llega al detector y la cantidad de analito aspirado.<sup>50</sup> La eficiencia de transporte de los patrones líquidos se puede estimar de manera indirecta mediante la comparación del volumen de muestra introducido con el volumen de drenaje producido en un periodo de tiempo.<sup>157</sup> Este método se complica cuando se utilizan sistemas de transporte de alta eficiencia que utilizan cámaras de nebulización de pequeño volumen sin sistema de drenaje.

La eficiencia de transporte de los patrones líquidos también se puede estimar mediante la determinación de la eficiencia de transporte de nanopartículas, asumiendo que tanto los patrones inorgánicos como las nanopartículas se comportan igual en su transporte al plasma. El tamaño y la concentración de las partículas pueden afectar a dos procesos en ICP-MS, la eficiencia de transporte de la suspensión de nanopartículas al plasma y la eficiencia del plasma para ionizarlas.<sup>158</sup> Se ha comprobado que la pérdida selectiva de nanopartículas en la cámara de nebulización se produce para partículas mayores de 2-5  $\mu\text{m}$ .<sup>159-161</sup> Además, concentraciones de partículas altas entre 0,1-1 % (m/v) pueden afectar a la eficiencia de transporte influyendo en el proceso de nebulización.<sup>162,163</sup> Esto no supone un gran problema en esta técnica donde se utilizan suspensiones altamente diluidas de partículas nanométricas. Para el rango de tamaños y concentraciones utilizados en la introducción de nanopartículas individuales, el plasma presenta una eficiencia de ionización similar para las partículas y las correspondientes especies disueltas.<sup>159,160</sup> Todo ello hace que la anterior presunción sea aceptable.

Existen diferentes formas de evaluar la eficiencia de transporte de nanopartículas. La primera de ellas es mediante el método indirecto de recogida del drenaje, mencionado anteriormente para los patrones líquidos. Este método no requiere la utilización de un patrón de nanopartículas bien caracterizado, sin embargo, es menos preciso que los métodos directos ya que es muy sensible a pérdidas en la recuperación del drenaje y no tiene en cuenta la evaporación del aerosol en la cámara de nebulización.<sup>164</sup> Por otro lado, Pace y colaboradores<sup>164</sup> desarrollaron dos métodos directos para la determinación de la eficiencia de transporte sin necesidad de instrumentación específica.<sup>165</sup> Ambos métodos requieren el uso de nanopartículas bien caracterizadas como los materiales de referencia certificados del NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Ejemplo de estos son los materiales RM 8012 y 8013, nanopartículas de oro con un diámetro nominal de 30 y 60 nm, respectivamente. El primero de los métodos, utiliza nanopartículas de tamaño conocido e implica la obtención de dos curvas de calibrado, una realizada con las nanopartículas y otra con patrones inorgánicos del mismo elemento. Este método calcula la eficiencia de transporte como la relación entre las pendientes obtenidas para el calibrado iónico y el calibrado realizado con las nanopartículas.<sup>164</sup>

El otro método directo utiliza una suspensión de nanopartículas de concentración numérica conocida. La cantidad de nanopartículas puede ser proporcionada por el fabricante o calculada mediante la concentración total del elemento por el que está formada y el diámetro de nanopartícula. Sabiendo la cantidad de partículas en la suspensión,  $N_p$ , el flujo de introducción de muestra,  $F$ , y la frecuencia de eventos detectados,  $f(N_d)$ , se puede calcular fácilmente la eficiencia de transporte,  $\eta$ , mediante la ecuación (4):

$$\eta = \frac{f(N_d)}{F \cdot N_p} \quad (4)$$

Recientemente ha sido desarrollado un nuevo método para el cálculo de la eficiencia de transporte de nanopartículas que no requiere de materiales de referencia.<sup>166</sup> Se conoce como el método del flujo másico dinámico. Es una adaptación del método de recogida del drenaje en el que este se recircula continuamente al recipiente de la muestra. La eficiencia de transporte se calcula mediante la relación de las pendientes generadas mediante la monitorización continua de la masa de muestra que llega al plasma y de la

masa de muestra aspirada. Sin embargo, es una metodología que requiere de mucho más tiempo que los métodos anteriores.

Finalmente, para la caracterización del sistema de introducción de muestras utilizado puede ser muy interesante la determinación de la eficiencia de transporte de las células, que no tiene porque ser igual a la de los patrones líquidos o las nanopartículas. Dicha eficiencia puede ser calculada de manera sencilla mediante la ecuación (4), comparando el número de eventos celulares detectados con, en este caso, el número de células en la muestra. Esto implica conocer el número de células en la suspensión introducida al plasma para lo que es necesario utilizar técnicas de recuento celular. El conteo de células en suspensión se realiza convencionalmente mediante el uso de una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Este no es más que un portaobjetos de vidrio con dos zonas ligeramente deprimidas a una profundidad conocida sobre el que ha sido marcada una cuadrícula de dimensiones también conocidas, llamada retículo de Neubauer. La muestra se introduce manualmente por capilaridad entre el hemocitómetro y un cubreobjetos y el conteo se realiza de manera visual utilizando un microscopio óptico con la ayuda de la cuadrícula. Al conocer todas las dimensiones de la cámara, tras el conteo se obtiene de forma directa la concentración de células en la muestra.<sup>167</sup> Sin embargo, a pesar de seguir siendo el método de conteo más habitual en laboratorios de cultivo celular, errores de hasta un 20-30 % son muy comunes<sup>168</sup> debido a factores como el pipeteo, dilución de la muestra, ajuste de la dilución óptima para el conteo o volumen de muestra realmente introducido en la cámara, entre otros. Un conteo celular más preciso se puede realizar utilizando la citometría de flujo mediante la medida de la luz transmitida y dispersada que causan las células a su paso de manera individual por el haz láser,<sup>169</sup> que depende de su tamaño y granulosidad como se explicó en la sección 1.2.2.1. Las muestras celulares se pueden mezclar con suspensiones de microesferas fluorescentes de concentración conocida disponibles comercialmente que sirven para calibrar el sistema. En este caso la mezcla se mide en el citómetro de flujo programado para parar el análisis tras contar un número determinado de microesferas, que se diferencian fácilmente de las células por su fluorescencia. Como la concentración de estas es conocida, se puede calcular fácilmente el volumen de la muestra introducida y, junto con el número de eventos celulares registrados, determinar la concentración de células de la muestra.

Una segunda opción es la medida del flujo de introducción de muestra, simplemente mediante la pesada de un líquido como agua destilada antes y después de ser introducido al citómetro de flujo durante un tiempo determinado.

Por último, tanto para la determinación cuantitativa de la masa del elemento medido en células individuales como para el cálculo de eficiencias de transporte, el tratamiento de datos precisa de una discriminación previa entre los datos que corresponden a eventos causados por una célula o una nanopartícula y los datos de la línea de base que incluyen la contribución del fondo y especies disueltas. Esto implica la determinación de un valor de intensidad límite o *threshold* por encima del cual se encontrarán los eventos y por debajo la señal de fondo. Para ello se han desarrollado diferentes algoritmos, basados a menudo en procedimientos iterativos que consideran una señal como evento si es mayor de un número de veces la desviación estándar sobre la media del conjunto de datos entero, filtrando los eventos y repitiendo el procedimiento hasta que no quede ningún punto que cumpla este requisito. Se han utilizado valores de desde 3 veces la desviación estándar<sup>63,115,164</sup> hasta 5 veces,<sup>170</sup> y también otros métodos más complejos que implican la deconvolución de la señal.<sup>171</sup> Sin embargo, cuando se usan tiempos de integración de pocos microsegundos, se obtienen generalmente pocas cuentas por tiempo de integración, por lo que estos datos podrían no ajustarse a una distribución normal. Para diferenciar los eventos del fondo se sugiere utilizar en estos casos la distribución de Poisson.<sup>172</sup>

### **1.2.5. Influencia de las características celulares en su análisis mediante SC-ICP-MS**

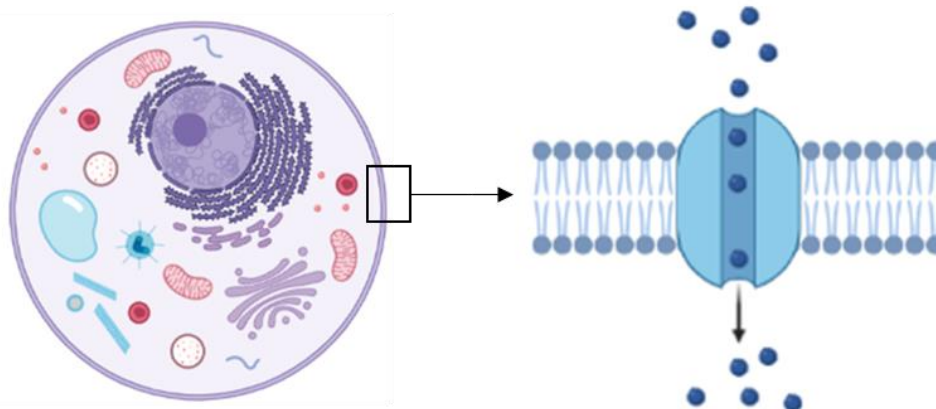
La técnica de *single cell* ICP-MS ha sido aplicada a diferentes tipos de sistemas unicelulares como líneas celulares humanas<sup>63,173,174</sup> y de otros mamíferos<sup>59,62</sup>, bacterias,<sup>42,65</sup> levaduras<sup>77,149</sup> y algas unicelulares.<sup>49,65,68,175</sup> Parámetros como el tamaño o la estabilidad de las células utilizadas, determinada por su estructura y la composición de su envoltura celular, son críticos a la hora de evaluar su transporte hacia el plasma, donde



la integridad celular debe ser preservada al máximo. A continuación, se exponen las características más relevantes de cada tipo celular.

Las líneas celulares animales y humanas son cultivos celulares establecidos que proliferan indefinidamente si se les proporciona medio de cultivo fresco y espacio.<sup>176</sup> Se usan ampliamente en investigación básica y biomédica, ya que constituyen un modelo simple y representativo para numerosos estudios, como los de incorporación celular de sustancias como metalofármacos y nanopartículas tras su exposición a las células. Para ello se utilizan técnicas de cultivo celular que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, y posibilitando el estudio de las células libres de las variaciones sistémicas que se dan en el ser vivo.

Cada línea celular tiene características únicas que pueden ser aprovechadas para estudios específicos y que pueden ser muy diferentes entre células de diferentes tejidos y organismos. Su tamaño también es muy variable, por ejemplo, entre las células humanas se pueden encontrar desde glóbulos rojos con un diámetro de 7  $\mu\text{m}$  aproximadamente o hepatocitos de alrededor de 20  $\mu\text{m}$ , hasta óvulos de 150  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, estructuralmente todas ellas constan de una membrana celular que rodea el citoplasma donde se encuentran los orgánulos celulares, entre los que se encuentra un núcleo celular definido y delimitado por una membrana nuclear, característica típica de las células eucariotas. La membrana celular es una bicapa lipídica, es decir, una estructura que consta de dos capas de fosfolípidos. Estos se orientan en la bicapa con las cadenas hidrocarbonadas hidrófobas hacia el interior y los grupos hidrofílicos hacia el exterior (el citoplasma en la capa interna y el medio extracelular en la capa externa), como se muestra en la Figura 20. Además, en la membrana celular se pueden encontrar proteínas y otros tipos de lípidos, cuya naturaleza y proporción puede cambiar según el tipo de célula. Las proteínas se unen a la membrana citoplasmática mediante interacciones hidrofóbicas entre sus dominios hidrofóbicos y los lípidos de membrana. Estas pueden sobresalir solamente por un lado de la bicapa o tener dominios expuestos en ambos lados, proporcionando una asimetría funcional a la membrana. También se pueden encontrar azúcares, generalmente en la superficie exterior de la membrana y unidos a proteínas o lípidos, formando glicoproteínas y glicolípidos, respectivamente.



*Figura 20. Diagrama de una célula animal típica y detalle de la membrana celular donde se aprecia su estructura de bicapa lipídica con proteínas asociadas.*

La membrana celular protege y delimita la célula y, además, es una barrera semipermeable que regula el paso de sustancias a su través. Las pequeñas moléculas hidrofóbicas son capaces de difundir a través de la bicapa rápidamente, al igual que pequeñas moléculas hidrofílicas que lo hacen de manera más lenta. Sin embargo, moléculas altamente cargadas como iones o moléculas de mayor tamaño no pueden atravesar la membrana mediante difusión simple y su transporte se realiza mediante proteínas de membrana específicas, que pueden formar canales o actuar como transportadores,<sup>177</sup> y conlleva un gasto de energía metabólica.

El uso de células de animales y humanas en investigación requiere de técnicas de cultivo celular. La mayoría de las células de animales y humanas que se mantienen en cultivo en un laboratorio son adherentes, lo que significa que necesitan adherirse a una superficie sólida para su crecimiento. Las células pueden ser cultivadas en diferentes tipos de superficie como botellas de cultivo, placas multipocillo o placas Petri. El cultivo empieza por la siembra de un número de células inicial que depende del área del recipiente utilizado y del tipo celular. A continuación, las células se adhieren a la superficie mediante proteínas de adhesión. Además, la superficie del recipiente suele estar tratada para favorecer esta adhesión. Una vez adheridas, las células empiezan a crecer y a dividirse. A un tiempo fijo tras la siembra o tras alcanzar un cierto porcentaje de confluencia se realiza el tratamiento que puede ser, por ejemplo, la exposición de las células a cierta dosis de un fármaco que se añade al medio de cultivo fresco. Tras el tratamiento, dependiendo de la aplicación, se puede necesitar el arrancado de las células

de la superficie en la que crecen adheridas. En el caso del análisis de células individuales en ICP-MS mediante nebulización neumática, se precisa de la obtención de una suspensión celular manteniendo al máximo la integridad de las células y evitando la formación de agregados celulares.

Para despegar las células del sustrato se pueden utilizar métodos físicos, como un raspado suave del sustrato, o bioquímicos, normalmente mediante el uso de bajas concentraciones de tripsina, enzima que hidroliza las proteínas de adhesión celular a la superficie. La actividad proteolítica de la tripsina puede dañar las células mediante la escisión de proteínas de membrana<sup>178</sup> por lo que se debe realizar cuidadosamente para evitar comprometer la integridad celular. Además, una vez obtenida la suspensión celular su análisis debe ser rápido para evitar la degradación de las células. Todas estas precauciones afectan fundamentalmente a la manipulación de células eucariotas humanas.

Sin embargo, el manejo de otras especies celulares como levaduras, bacterias o microalgas es, a priori, más sencillo mediante la técnica SC-ICP-MS. Las levaduras son microorganismos unicelulares también eucariotas que pertenecen al reino fungi. Existen miles de especies de levadura cuyos tamaños varían, pero típicamente presentan diámetros de 3-4  $\mu\text{m}$ , aunque pueden llegar a medir hasta 40  $\mu\text{m}$ .<sup>179</sup> Las levaduras poseen una bicapa lipídica que funciona como membrana celular y una segunda envoltura, la pared celular, separadas por un espacio periplásmico con gran concentración de proteínas. La pared celular es un componente estructural que tiene diferentes funciones como mantener la turgencia celular, preservar su morfología y estabilizar las condiciones osmóticas internas de la célula. Esta protege a la célula contra el daño físico proporcionando una considerable resistencia mecánica. También evita la degradación por proteínas extrañas y la deshidratación a la vez que sirve como andamiaje de proteínas externas.<sup>180,181</sup>

La pared celular representa alrededor del 10-25 % del peso seco de levaduras<sup>182</sup> como *Saccharomyces cerevisiae*. Está compuesta de polisacáridos, proteínas y lípidos. Además, en la pared hay pequeñas cantidades de quitina, polisacárido de N-acetilglucosamina lo que aumenta la capacidad de formación de puentes de hidrógeno con polímeros adyacentes, aumentando la resistencia de la membrana. La proporción de

los componentes de la pared celular puede variar según las condiciones de cultivo y recogida de las levaduras<sup>182</sup> y, sobre todo, de la cepa de levadura<sup>183</sup> pero es de alrededor del 35-40 % de manoproteínas, 50-55 %  $\beta$ -1,3-glucanos, 5-10 %  $\beta$ -1,6-glucanos y un 2 % de quitina.<sup>184</sup> En la Figura 21 se representa la estructura de la pared celular de las levaduras con todos sus componentes. La resistencia mecánica de la pared se debe principalmente a la capa más interna de esta, constituida principalmente por  $\beta$ -1,3-glucanos y quitina. Esta característica hace que el análisis de este tipo de estructuras mediante estrategias de SC-ICP-MS sea más sencillo puesto que el riesgo de ruptura de la membrana prácticamente desaparece minimizando las pérdidas y el aumento del fondo.

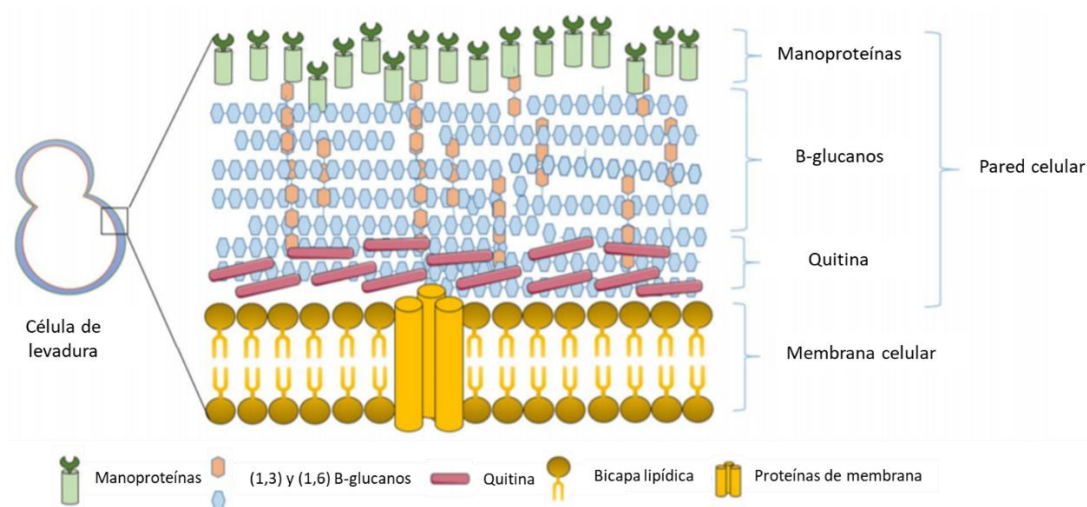


Figura 21. Estructura de la pared celular de las levaduras. Adaptada de Anwar y colaboradores.<sup>184</sup>

Otro tipo de estructuras especialmente favorables para su análisis empleando SC-ICP-MS son las bacterias, microorganismos unicelulares procariotas comprenden un dominio muy heterogéneo de diferentes morfologías y pequeño tamaño. El tamaño medio de la mayoría de las bacterias se encuentra entre 0,2-2  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo, *Escherichia coli* tiene un diámetro aproximado de 0,5  $\mu\text{m}$  y un volumen celular de 0,6-0,7  $\mu\text{m}^3$ .<sup>185</sup> Como organismos procariotas, carecen de un núcleo celular con el material genético delimitado por una membrana. El citoplasma celular está rodeado por una envoltura celular que consta de membrana citoplasmática, pared celular y, en algunos casos, una segunda membrana externa. Entre sus diferentes funciones interesa aquí el aporte de resistencia mecánica y robustez morfológica de la célula, protegiéndola ante condiciones adversas como un choque osmótico, por ejemplo.<sup>186</sup> La membrana celular

bacteriana es una bicapa lipídica típica en la que se intercalan diferentes proteínas involucradas en el transporte de nutrientes y síntesis de otras proteínas necesarias para la célula. Rodeando la membrana citoplasmática se encuentra la pared celular, separadas por el periplasma.<sup>186</sup> Según el tipo de envoltura celular, se puede distinguir entre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Figura 22) denominadas así por presentar diferente coloración en la tinción de Gram. Las primeras presentan solamente la membrana citoplasmática y una pared celular de peptidoglicano gruesa que contiene otros polímeros secundarios como ácidos teicoicos y otros tipos de polisacáridos. Las Gram-negativas poseen una pared celular más fina y una segunda bicapa lipídica, la membrana citoplasmática externa, que rodea la pared celular y contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. En estas la pared de peptidoglicano presenta un espesor de 3-6 nm, mientras que en las Gram positivas típicamente es de 10-40 nm.<sup>187,188</sup> Como en el caso anterior, el manejo de estas estructuras para ser analizadas mediante SC-ICP-MS resulta más sencillo dada la robustez de dicha envoltura celular.

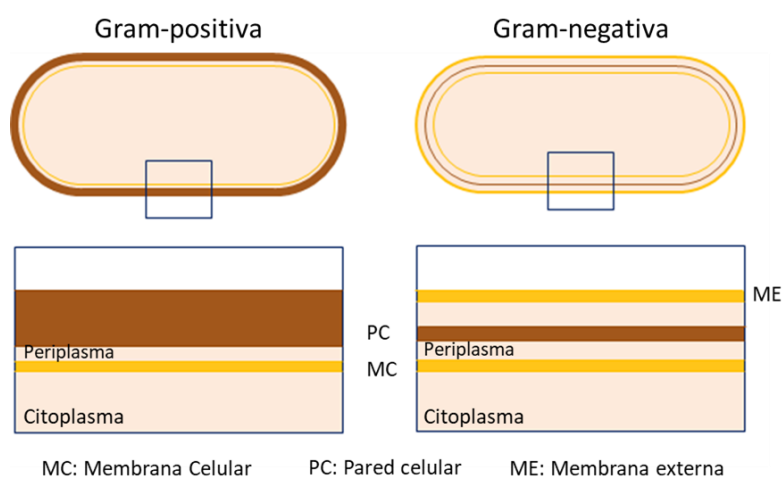


Figura 22. Diferencias entre la envoltura celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Adaptada de Egan y colaboradores.<sup>189</sup>

Finalmente, las algas son un grupo filogenético muy heterogéneo de organismos eucariotas que contiene clorofila y la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica. Pueden ser unicelulares o pluricelulares e incluyen algas verdes, algas pardas, algas rojas y varios grupos de organismos unicelulares como dinoflagelados o diatomeas, lo que refleja la gran diversidad de este tipo de organismos. Las algas unicelulares o microalgas son microorganismos de un tamaño variable que suelen presentar pared celular (a

excepción de las euglenas). Por ejemplo, existen especies como *Chroomonas sp* con un tamaño de 5-7  $\mu\text{m}$ , *Cryptomonas ovata* de 20-30  $\mu\text{m}$  o *Gonyostomum semen* de 50-70  $\mu\text{m}$ .<sup>68</sup> La estructura y composición de las paredes celulares de las algas varían considerablemente. En muchas de ellas, la pared está compuesta principalmente de fibras de celulosa y, en menor medida, otros polisacáridos como xilano, pectina, mananos, ácidos algínicos o ácido fucínico.<sup>190</sup> Este es el caso de las algas verdes como *Chlamydomonas*, dinoflagelados, algas rojas y algas pardas. A veces la pared se ve además fortalecida por la deposición de carbonato cálcico, dando lugar a paredes calcáreas. En otras, el componente mayoritario de la pared celular es el silicio al que se añaden proteínas y polisacáridos, como en el caso de las diatomeas.<sup>191</sup> Estas paredes se mantienen intactas incluso después de la muerte del alga, lo que da idea de la robustez de la misma.

La presencia de pared celular en levaduras, bacterias y algas unicelulares proporciona una estabilidad a las células que permite su manipulación previa al análisis sin especiales precauciones. Esto permite su lavado mediante centrifugación y su dilución previa a la medida sin pérdida de células integrales, lo que hace común su utilización en el desarrollo y caracterización de nuevas metodologías y sistemas de introducción de células individuales. Sin embargo, cuando se trabaja con líneas celulares humanas, su propia dilución en agua puede causar la ruptura de la membrana celular debido al choque osmótico. Esta estabilidad también facilita el transporte de las células con pared celular al nebulizador y el mantenimiento de su integridad durante el proceso de nebulización, lo que contribuye a mejorar la eficiencia de transporte.

Por otro lado, se ha visto una relación inversa entre el tamaño de célula y su eficiencia de transporte al plasma,<sup>65</sup> probablemente debido a la mayor tendencia de las células de mayor tamaño a la deposición a través del sistema de introducción de muestra o a su peor ionización en el plasma, lo que también perjudica a las líneas celulares animales o humanas, generalmente de mayor tamaño. Una alternativa para resolver los problemas de estabilidad de líneas celulares es la fijación de la estructura celular en suspensión con diferentes fijadores.<sup>192</sup> La fijación de las células es muy útil cuando se necesita prolongar el tiempo entre su recogida y su análisis mediante ICP-MS sin comprometer la integridad celular o cuando la preparación de muestra para una

determinada técnica puede comprometer la estructura celular, siendo muy empleada como paso a previo al marcaje celular con anticuerpos.<sup>67</sup> La fijación celular ayuda a preservar la arquitectura y composición de las células ya que proporciona rigidez mecánica y previene de la descomposición, putrefacción y autólisis celular.<sup>193</sup> Además, bajo las condiciones ideales, la fijación de células y tejidos debe alterar mínimamente la estructura y composición química de la célula. Existe una gran variedad de fijadores entre los que los fijadores químicos son los más utilizados, en concreto, aquellos que establecen enlaces cruzados como el formaldehído. El uso de formaldehído es un método de fijación celular ampliamente utilizado que produce el entrecruzamiento entre proteínas y ácidos nucleicos en la células.<sup>194,195</sup> La química de las reacciones entre el formaldehído y las proteínas es compleja.<sup>196</sup> Este forma enlaces cruzados entre proteínas reaccionando con grupos amino, guanidino, tiol, fenol, imidazol o indol y forma derivados hemiacetales. Si el hemiacetal está próximo a otra proteína, reacciona por condensación para formar puentes de metileno químicamente estables que entrecruzan las proteínas.<sup>196</sup> Con este entrecruzamiento se consigue preservar la estructura celular eficazmente en un amplio rango de células y tejidos.<sup>195</sup>

### 1.3. Single cell ICP-MS: Aplicaciones

Las diversas configuraciones de sistemas de introducción de muestra y equipos explicados en las secciones anteriores se pueden utilizar en dos tipos principales de aplicaciones:

- Cuantificación elemental directa. Se puede distinguir entre la determinación de elementos constitutivos o presentes de forma natural en las células o elementos introducidos artificialmente.
- Cuantificación molecular indirecta. Se refiere a la cuantificación de una proteína u otro tipo de biomolécula marcada selectivamente con algún elemento medible mediante ICP-MS.

Los continuos avances instrumentales de la técnica han permitido su aplicación en una gran variedad de investigaciones. Estas aplicaciones se pueden clasificar según el objeto de estudio en: elementos celulares constitutivos, incorporación celular de

metalofármacos, presencia de nanopartículas en la célula o análisis de componentes celulares marcados elementalmente.

### 1.3.1. Medida de elementos constitutivos

Los elementos traza endógenos, tanto metales como el Fe, Co, Cu, Mn o Zn, como no metales como P y S, son constituyentes celulares esenciales involucrados en una gran variedad de funciones celulares debido a sus propiedades catalíticas, estructurales o reguladoras.<sup>197</sup> Algunos de estos que actúan como cofactores o reguladores en numerosas enzimas, están sujetos a mecanismos de regulación homeostática. Esto hace que si sus niveles en las células son anormales, tanto por defecto como por exceso, se pueda exponer el ambiente celular a una actividad redox descontrolada.<sup>197,198</sup> En los últimos años ha aumentado notablemente la investigación en el desarrollo de estrategias analíticas para la determinación de elementos metálicos y no metálicos en células individuales. Sin embargo, este tipo de análisis sigue presentando varios desafíos. El principal de ellos es la cantidad extremadamente baja del elemento traza a medir en una única célula. Pero, además, hay diferentes factores que pueden contribuir a un límite de detección demasiado alto para estas medidas. Por un lado, la compleja matriz celular puede provocar interferencias en ICP. Por otro lado, la desolvatación parcial de las células provoca una incompleta atomización e ionización de elementos intracelulares, afectando a la sensibilidad, exactitud y precisión de la detección. Además, una eficiencia de transporte baja influye directamente en el consumo de muestra y rendimiento de la técnica.<sup>199</sup>

En este sentido, Groombridge y colaboradores analizaron el contenido de elementos traza en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.<sup>64</sup> Con un sistema de introducción de células de alta eficiencia en un equipo con analizador de cuadrupolo y utilizando su mínimo tiempo de integración de 10 ms, obtuvieron eventos de Mg, P, Ca, Mn, Fe, Cu y Zn. Además, estimaron el tamaño de las células mediante un sistema de difracción láser y la distribución de tamaños obtenida fue muy similar a la distribución de la intensidad de los eventos de <sup>24</sup>Mg. Por otro lado, realizaron medidas utilizando un ICP-TOF-MS que permitió el análisis multielemental cuasi-simultáneo y realizar análisis de



correlación entre los diferentes elementos. Se obtuvieron correlaciones relativamente fuertes entre P y Zn, con un coeficiente de correlación de 0,69, entre P y Mg (0,63) y entre Mg y Zn (0,63). Utilizando un generador de microgotas, Shigeta y colaboradores obtuvieron señales de Cu, Zn y Se en células de levadura, en este caso, enriquecida en selenio con una sensibilidad desde 0,7 cuentas por ag para Se hasta 10 cuentas por ag para Zn.<sup>77</sup>

Liu y colaboradores, determinaron cuantitativamente el contenido en K, Mg, Zn, Mn y Cu mediante ICP-MS, también en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta determinación se llevó a cabo tanto a nivel de célula individual, utilizando patrones elementales disueltos para la calibración, como mediante nebulización convencional después de la digestión de las células, obteniendo resultados comparables que validan la técnica.<sup>149</sup> Reduciendo el tiempo de integración hasta 100  $\mu$ s aumentaron la relación señal/ruido y disminuyeron los límites de detección (0,02 fg por célula para <sup>63</sup>Cu). Además, fueron capaces de distinguir entre dos poblaciones en la distribución de la señal de <sup>63</sup>Cu en una mezcla de células no tratadas (distribución centrada en 1,8 fg célula<sup>-1</sup>) y tratadas con 100 ng mL<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> durante 4 h (distribución centrada en 5,6 fg célula<sup>-1</sup>).

Asimismo, como ya se mencionó anteriormente, Miyashita y colaboradores monitorizaron elementos constitutivos biológicamente relevantes como C, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe y Zn en células individuales de levaduras y otros microorganismos como cianobacterias (*Synechocystis* sp. PCC 6803), algas rojas (*Cyanidioschyzon merolae* 10D, *Galdieria sulphuraria*), y algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii* CC-125).<sup>65</sup> En este caso se obtuvo una similitud entre la distribución del volumen celular, calculado mediante el diámetro de las células que se obtuvo mediante un sistema de difracción láser, y la distribución de la intensidad de señales de <sup>31</sup>P. Esta correlación se debe a que el P es un componente estructural presente en los fosfolípidos de las membranas celulares y en importantes biomoléculas como los ácidos nucleicos o el ATP. Este elemento se utilizó también para el conteo de eventos obtenidos y cálculo de eficiencia de transporte.

El alga verde *Chlorella vulgaris* fue utilizada como modelo para la cuantificación de metales en células individuales. Se utilizó el Mg como marcador celular por ser el elemento más abundante en estas células, como componente esencial de la clorofila. La frecuencia de eventos de Mg fue utilizada para el conteo celular. Se determinó el

contenido de Mg en células individuales utilizando tanto patrones disueltos como nanopartículas de MgO y, también, de manera global tras la digestión ácida de las células. Se obtuvieron contenidos de Mg en el rango de  $10^8$  átomos por célula. También se detectaron otros metales presentes a niveles de ultratrazas como Cu o Mn. Además, se utilizó el alga para realizar un estudio de la cinética de incorporación de Cr mediante la incubación de las células con  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{3+}$  y en tiempos de incubación crecientes, sin necesidad de separar las células de la solución de  $\text{Cr}^{3+}$ .<sup>49</sup> De manera similar, se utilizó el protozoo eucariota unicelular *Tetrahymena melaccensis* para la cuantificación de mercurio en células individuales, por su papel esencial en la bioacumulación del Hg. El método propuesto por Shi y colaboradores permitió la evaluación cuantitativa de Hg con un límite de cuantificación de  $3,8 \times 10^{-15}$  g por célula. El protozoo fue expuesto a concentraciones crecientes de  $\text{Hg}^{2+}$  de entre 30 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  que supusieron tasas de supervivencia de 68-100 %. Los resultados obtenidos mostraron una gran heterogeneidad en la incorporación de Hg entre las células individuales, que fue más notable a mayor concentración de exposición.<sup>200</sup>

El contenido de elementos intracelulares puede ser un biomarcador del estado celular. Por ello, la exposición de las células a estímulos externos puede afectar al contenido de los elementos constitutivos de la célula. Así, se utilizó el Mg como marcador celular de células del alga *Microcystis aeruginosa* y se atribuyó la disminución del número de eventos de dicho elemento a la lisis celular provocada por la exposición de las células a diferentes algas basadas en cobre.<sup>175</sup> Además, el contenido en Mg en células de alga aumenta en función del volumen celular. Lau y colaboradores observaron que la pendiente de la correlación entre la intensidad de los eventos de Mg obtenidos para células individuales del alga *Chlorella vulgaris* con el volumen celular es mayor cuando las células se exponen a Cr(VI), muy tóxico para ellas.<sup>201</sup> Esto significa que el aumento en contenido en Mg con el volumen celular es mayor bajo el efecto del Cr(VI). También observaron una fuerte correlación lineal entre la intensidad de Mg y la intensidad de Cr incorporado en la célula. Este trabajo demuestra la validez del método para caracterizar respuestas celulares a estímulos externos.

La técnica de *single cell* ICP-MS también ha sido utilizada para evaluar elementos constitutivos en líneas celulares humanas. Así, Wang y colaboradores determinaron el

contenido de Fe, Cu, Zn, Mn, P y S en dos líneas celulares de cáncer, la línea HeLa de cáncer cervical y la línea A-549 de cáncer de pulmón, y una línea celular normal de epitelio bronquial (16HBE). Tras la calibración utilizando patrones elementales líquidos, obtuvieron una masa de Fe, Zn, Cu, Mn, P y S significativamente mayor en las células de la línea HeLa que, además, presentaron la variabilidad más alta en el contenido de estos elementos entre las diferentes células individuales. Por otro lado, la línea no tumoral 16HBe presentó la distribución más homogénea de elementos traza entre células individuales.<sup>63</sup> Estos resultados pueden ser una evidencia de que las células tumorales precisan de una mayor cantidad de los elementos analizados para mantener su crecimiento y proliferación, como se ha visto previamente.<sup>202,203</sup> Además, la heterogeneidad obtenida podría ser utilizada para distinguir entre células normales y tumorales.

El cromo es uno de los elementos esenciales para la vida, sin embargo, en altas concentraciones puede resultar tóxico. Wei y colaboradores utilizaron las líneas HeLa y MCF-7 para investigar la incorporación de cromo en las células tras su cultivo en un medio enriquecido con concentraciones crecientes de Cr(III) o Cr(VI).<sup>174</sup> Estas son las principales formas inorgánicas de cromo encontradas en el medio ambiente y, a niveles altos, pueden ser tóxicos y carcinogénicos para los seres humanos. Se obtuvieron niveles de Cr de 0,027-0,182 pg por célula en los cultivos expuestos a Cr(III) y de 0,026-2,536 pg por célula en los expuestos Cr(VI).

Cao y colaboradores consiguieron la evaluación cuantitativa de Cu en glóbulos rojos individuales mediante un sistema de introducción de muestra que permitió la introducción de las células con un 100 % de eficiencia.<sup>73</sup> Se utilizó CH<sub>4</sub> como gas de reacción en la celda, obteniendo un límite de detección de 0,043 fg para el <sup>63</sup>Cu. Mediante SC-ICP-MS se determinó un contenido de 0,20-0,40 fg de Cu por célula, valor que concuerda con el obtenido mediante ICP-MS convencional tras la digestión de las células (0,266 fg por célula).

En otros trabajos, se midieron elementos constitutivos junto con el elemento en estudio (metal inorgánico, metalofármaco, nanopartícula, etc.). En este sentido, la medida de elementos constitutivos es una buena opción para el cálculo de la eficiencia de transporte. Así, Meyer y colaboradores utilizaron un equipo de triple cuadrupolo para

determinar la eficiencia de transporte mediante la medida de P y S en células A549.<sup>60</sup> Además, el uso de un analizador de masas simultáneo como el TOF permitiría la medida simultánea de elementos constitutivos de la célula y elementos constituyentes de la sustancia incorporada. En el caso de estudios de incorporación de nanopartículas artificiales, esto permitiría distinguir entre nanopartículas asociadas a las células y nanopartículas libres, mediante la presencia de ambos tipos de elementos en el mismo evento.

### **1.3.2. Medida de incorporación de metalofármacos**

El ingrediente activo de los metalofármacos es un átomo metálico. Estos se utilizan desde tiempos muy antiguos con fines terapéuticos. Los iones metálicos presentan una amplia variedad de números de coordinación y geometrías que permiten su unión a dianas biológicas específicas. Además, el potencial redox del metal puede influir en el estado redox celular afectando a la viabilidad celular. Dada la elevada toxicidad de estos fármacos su concentración intracelular será, en general, muy baja, por lo que representa un reto aún mayor que el del análisis de elementos no tóxicos presentes naturalmente en las células. El contenido intracelular de metalofármacos influye en los efectos citotóxicos que causa y también en problemas asociados a su utilización como el desarrollo de resistencia, por lo que se hace necesario el desarrollo de técnicas analíticas que permitan su determinación precisa.

Se ha utilizado la técnica de *single cell* ICP-MS, por ejemplo, para estudiar la incorporación celular y citotoxicidad de fármacos basados en arsénico, utilizados durante mucho tiempo como agentes antitumorales. El trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ , ATO) es un agente terapéutico frente a la leucemia promielocítica aguda (APL).<sup>204</sup> Este provoca la muerte por apoptosis en células APL entre otros efectos como la estimulación de la diferenciación, inhibición de la proliferación o inhibición de la angiogénesis.<sup>205</sup> Por ello, este compuesto fue aprobado para el tratamiento de APL por la FDA (*Food and Drug Administration*). El ATO puede provocar la muerte celular de otros tipos de células tumorales lo que abre nuevas posibilidades de aplicación terapéutica, sin embargo, los efectos son menores a los niveles de concentración alcanzables debido a su toxicidad por

lo que surge el desarrollo de nuevos compuestos orgánicos de arsénico para aumentar la eficacia antitumoral. Un ejemplo es el ZIO-101 (dimetilarsénico conjugado con glutatión) que ya ha sido sometido a ensayos clínicos de fase I/II mediante administración intravenosa y oral.<sup>206</sup> El estudio de la incorporación celular y del mecanismo de acción de estos fármacos puede aportar información valiosa para el desarrollo de nuevos fármacos de arsénico más eficaces.

Zhou y colaboradores evaluaron la incorporación y citotoxicidad de ATO y ZIO-101 en función de las diferentes fases del ciclo celular en células individuales de leucemia (líneas NB4 y HL60).<sup>207</sup> Las células tumorales son muy sensibles a perturbaciones en el ciclo celular debido a su rápida tasa de replicación.<sup>208</sup> Durante cada fase del ciclo celular, la célula desempeña diferentes funciones que pueden alterar la cinética de incorporación del fármaco en la célula.<sup>209</sup> Para llevar a cabo este estudio, sincronizaron ambas líneas celulares utilizando el método de doble bloqueo con timidina que permite parar las células en fase S temprana.<sup>210</sup> Posteriormente, recogieron las células a diferentes tiempos después de su sincronización y las incubaron con ATO y ZIO-101 ( $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ , 1,5 h). Finalmente, se recogieron las células y se cuantificó la cantidad de As incorporado en células individuales. Por otro lado, utilizaron la citometría de flujo para el análisis del ciclo celular mediante la tinción del ADN con yoduro de propidio, para la medida de apoptosis en cada fase con el objetivo de determinar la citotoxicidad y para evaluar los niveles de expresión de AQP9 y xCT, proteínas transportadoras de ATO y ZIO-101, respectivamente. Comprobaron que la incorporación de ambos compuestos de arsénico era mayor en la fase G2/M (fases relacionadas con la mitosis y su preparación) y menor en la fase S (síntesis de ADN), siendo la diferencia más pronunciada para ATO.. El mismo grupo de investigación estudió la relación entre la incorporación celular de ATO y su citotoxicidad en células individuales de las mismas líneas.<sup>211</sup> Para ello, utilizaron cisplatino como marcador de viabilidad celular, aprovechándose de su entrada rápida en las células con membranas celulares dañadas, y quelantes cargados con Dy y Nd para marcar dos proteínas relacionadas con diferenciación (anticuerpo anti-CD11b) y apoptosis (Anexina V), respectivamente. Analizando los eventos obtenidos para  $^{75}\text{As}$ ,  $^{195}\text{Pt}$ ,  $^{163}\text{Dy}$  y  $^{146}\text{Nd}$  de manera secuencial con un equipo de tipo cuadrupolo, obtuvieron una correlación positiva entre el contenido de As intracelular, apoptosis y células muertas, lo que implica que el

diseño de nuevos fármacos de arsénico debe intentar aumentar la incorporación celular para mejorar su eficacia.

También se estudió la incorporación celular de arsenito (iAs(III)) en células individuales de la línea A549<sup>60</sup>, que son células epiteliales de adenocarcinoma pulmonar. Se incubaron las células con 25 y 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de arsenito sódico durante diferentes tiempos entre 0-48 h para la posterior cuantificación de As en células individuales. Para ello, utilizaron un equipo de triple cuadrupolo obteniendo un LOD de 0,35 fg por célula ( $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$ ). Asimismo, Mavrakis y colaboradores<sup>69</sup> evaluaron la incorporación esta vez de arseniato (iAs(V)) en células individuales del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Además, utilizaron técnicas complementarias como espectrometría de masas mediante ionización por spray sónico ambiental (*easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry*, EASI-MS) para evaluar el efecto del As en el perfil lipídico directamente en células depositadas en un portaobjetos de vidrio. Se obtuvieron valores promedio de 2,7-4,1 fg As por célula para las 3 concentraciones de incubación utilizadas (15, 22,5 y 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por otro lado, se observó que concentraciones crecientes de arseniato provocan cambios en el grado de saturación de los lípidos de membrana.

Durante décadas se han utilizado fármacos de bismuto, como el subcitrate de bismuto coloidal (CBS) o el citrato bismuto de ranitidina (RBC), conjuntamente con antibióticos para el tratamiento de la úlcera péptica causada por la infección bacteriana de *Helicobacter pylori*.<sup>212,213</sup> También se ha utilizado el ICP-MS en modo *single cell* para estudiar la cinética de incorporación de CBS en células individuales de dicha bacteria.<sup>155</sup> La aplicabilidad de la técnica se demostró mediante la medida de  $^{24}\text{Mg}$  por ser el catión divalente más abundante en estas células, pudiendo cuantificar un promedio de  $2,85 \times 10^7$  átomos de Mg por célula. Posteriormente, se cuantificó  $^{209}\text{Bi}$  en células tratadas con 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CBS tras diferentes tiempos de incubación, obteniendo un incremento gradual de la concentración intracelular de Bi con el tiempo de incubación hasta las 8 h, donde se estabiliza.

Por otro lado, se han demostrado los efectos anticancerígenos de la curcumina, que induce la apoptosis de las células tumorales a la vez que inhibe su proliferación y metástasis.<sup>214,215</sup> El uso de la curcumina está limitado por su baja solubilidad y biodisponibilidad. Para solventar esta limitación se han propuesto diferentes

transportadores para el fármaco como complejos con metales de transición capaces de formar enlaces de coordinación con la curcumina. Así, Sun y colaboradores investigaron la incorporación y excreción de un complejo basado en cobalto mediante la medida de  $^{59}\text{Co}$  en células individuales de las líneas HepG2 (hepatocarcinoma) y MCF-7 (cáncer de mama), y en medio de cultivo fresco tras ser utilizado para el cultivo de células previamente tratadas con dicho complejo.<sup>216</sup> La incorporación del complejo en las células HepG2 aumentó con la concentración en el medio hasta un determinado punto donde se estabilizó. En el caso de las células MCF-7 el aumento de la incorporación del complejo con la concentración en el medio fue exponencial. Bajo las mismas condiciones, las células HepG2 acumularon una mayor cantidad del fármaco que las células MCF-7.

En clínica destaca el uso de metalofármacos basados en platino en tratamientos de quimioterapia del cáncer. Durante la presente Tesis Doctoral se utilizará el cisplatino como modelo para el desarrollo de un método que permita estudiar la incorporación celular de metalofármacos en células individuales. Desde su aprobación por la FDA en 1978, el cisplatino o cis-diaminodicloroplatino (II) es uno de los metalofármacos más comúnmente utilizados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como el de ovario, testículo o pulmón.<sup>217</sup>

El cisplatino se administra por vía intravenosa en disolución de suero salino en dosis que varían normalmente entre 20 y 140 mg m<sup>-2</sup>. El cisplatino circula por el torrente sanguíneo pudiendo interactuar con algunas proteínas. El resto del fármaco libre permanece en su forma neutra debido a la alta concentración de iones cloruro del torrente sanguíneo. Su mecanismo de acción empieza con su entrada en la célula que tiene lugar tanto por difusión simple<sup>218</sup> como mediante mecanismos activos utilizando transportadores de membrana involucrados en el transporte de cobre como los transportadores de cobre 1 y 2 (CTR1 y CTR2).<sup>219</sup> Una vez dentro de la célula, donde la concentración de cloruros disminuye respecto al torrente sanguíneo, la labilidad de las uniones Pt-Cl provoca que se produzcan fácilmente reacciones de hidrólisis que conllevan a la formación de aquo- o hidroxio- derivados. Estos complejos son sumamente reactivos, presentando una fuerte tendencia a sustituir los ligandos de agua o hidroxilo por otros ligandos nucleofílicos, como son el azufre o el nitrógeno, donadores de electrones por los que el Pt(II) tiene una gran afinidad. Esto hace que los derivados formados en el citosol

celular tengan una gran tendencia a reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN, siendo estas su principal diana terapéutica. La unión del cisplatino con el ADN se realiza preferencialmente a través del nitrógeno en posición 7 (N7) del anillo imidazol de las bases nitrogenadas guanina y adenina<sup>220</sup>, ya que son los átomos con mayor densidad electrónica y más accesibles al ataque electrofílico del cisplatino. Además, esta coordinación se ve favorecida con las guaninas situadas en el surco mayor de la doble hélice.

Sin embargo, el uso de cisplatino en quimioterapia presenta dos inconvenientes principales. Uno de ellos es la toxicidad que viene dada por la interacción del fármaco con células sanas de diferentes órganos además de las cancerosas, con las que pueden compartir características como la rápida multiplicación celular. Además, la unión del fármaco a diferentes biomoléculas puede afectar a su función, alterando las rutas metabólicas en las que se encuentran involucradas y dando lugar a posibles patologías durante el tratamiento con el fármaco.<sup>221</sup>

El otro gran problema es la resistencia al fármaco. Todos los factores que dificulten la interacción entre el cisplatino y su diana, en este caso el ADN, pueden contribuir al desarrollo de resistencia al fármaco. Así, esta se puede dar por una combinación de eventos que alteren la acumulación celular del fármaco bien por una disminución en su incorporación o un aumento de su eliminación.<sup>222</sup>

Investigar las causas y mecanismos de resistencia al cisplatino puede proporcionar información valiosa para la identificación de marcadores predictivos de respuesta al tratamiento o al desarrollo de nuevos fármacos que disminuyan la resistencia de los existentes. Como se ha comentado, una fuente importante de resistencia puede ser una acumulación disminuida de cisplatino en las células cancerosas, que ha sido observada frecuentemente en células resistentes.<sup>223</sup> Por ello, la determinación intracelular de platino parece un importante parámetro a tener en cuenta para detectar resistencia celular al mismo.<sup>224</sup> En este sentido, la cuantificación de la incorporación de platino en cultivos celulares tratados con cisplatino se ha llevado a cabo mediante ICP-MS de manera global o en *bulk*, tras la digestión de la muestra.<sup>225,226</sup> Sin embargo, parece mucho más interesante la evaluación cuantitativa de la incorporación del fármaco a nivel de célula individual, a través de la medida de Pt mediante ICP-MS ya que no todas las células de una



población se comportan homogéneamente ante el tratamiento con el fármaco, pudiendo aparecer subpoblaciones resistentes.

En este sentido, Zheng y colaboradores desarrollaron un método basado en nebulización neumática para la determinación cuantitativa de una nueva nanopartícula de gadolinio,  $Gd@C82(OH)22$ , y cisplatino en células individuales de las líneas HeLa (células humanas de cáncer cérvico uterino) y 16HBE (células epiteliales transformadas del bronquio humano) tras su tratamiento utilizando diferentes dosis ( $0,5-50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) y tiempos de exposición (2-24 h).<sup>61</sup> Demostraron la aplicabilidad de la metodología a la determinación de metalofármacos en células individuales mediante la validación del método por comparación con la medida de Pt en ICP-MS tras la digestión de las células. Con esta metodología obtuvieron un contenido de Pt de entre 0,003 y 2,4 pg por célula en las diferentes condiciones de tratamiento utilizadas. Asimismo, se utilizó la citometría de masas para evaluar la incorporación de cisplatino, su distribución intratumoral y su efecto en el ciclo celular en células individuales de cáncer de páncreas y cervical (líneas BxPC-3 y ME-180, respectivamente).<sup>227</sup> También se utilizó un anticuerpo anti-EF5 como indicador de hipoxia marcado con  $^{176}\text{Yb}$  y un agente intercalante del ADN basado en iridio para el reconocimiento de eventos celulares.

Por otro lado, se ha propuesto el uso de cisplatino como marcador de viabilidad celular en citometría de masas.<sup>228</sup> En citometría de flujo convencional se utilizan reactivos fluorescentes impermeables a la membrana celular, como el azul de tripano, que solo son capaces de penetrar y teñir en las células no viables con la membrana dañada. Como estos reactivos no pueden ser utilizados en citometría de masas, se comprobó la eficacia del uso de cisplatino para distinguir entre células viables y no viables. Para ello, se realizaron incubaciones de tan solo 1 min a una concentración de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  tanto en células adherentes como en suspensión. Con esta incubación tan corta el cisplatino solo marcó las células no viables produciendo una señal cuantificable mediante citometría de masas y obteniendo porcentajes de viabilidad celular similares a los obtenidos mediante citometría de flujo convencional. Además, no se observó ningún daño en el ADN ni respuesta apoptótica.

### 1.3.3. Estudios de incorporación de nanopartículas

Un nanómetro (nm) es una unidad del Sistema Internacional de Unidades (S.I.) que representa  $10^{-9}$  metros de longitud. En principio, los nanomateriales (NMs) se describen como materiales con al menos una dimensión en el rango de los nm, sin embargo, a menudo se definen como aquellos con un diámetro entre 1 y 100 nm.<sup>229</sup> Dentro de los NMs, se consideran las nanopartículas (NPs) como aquellos materiales con las tres dimensiones externas comprendidas dentro de la nanoescala.

La importancia de los NMs y NPs reside en las interesantes propiedades que les confieren su elevada área superficial y su pequeño tamaño, que son diferentes a las de la misma sustancia fuera de la nanoescala. Entre estas, destacan sus propiedades ópticas y electrónicas, que están relacionadas entre sí. El pequeño tamaño de las nanopartículas hace que los electrones sean confinados y se produzca un efecto cuántico, lo que les aporta propiedades ópticas especiales. Las NPs metálicas poseen propiedades ópticas y eléctricas únicas debido al fenómeno de resonancia de plasmón superficial (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). Así, las NPs de metales nobles como las de Au, Ag o Cu presentan una ancha banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético. La frecuencia de resonancia y la anchura de banda de absorción del plasmón depende fuertemente del tamaño de partícula y también de su forma. Por ejemplo, las nanopartículas de oro (AuNPs) muestran colores y características dependientes de su forma y tamaño (Figura 23).

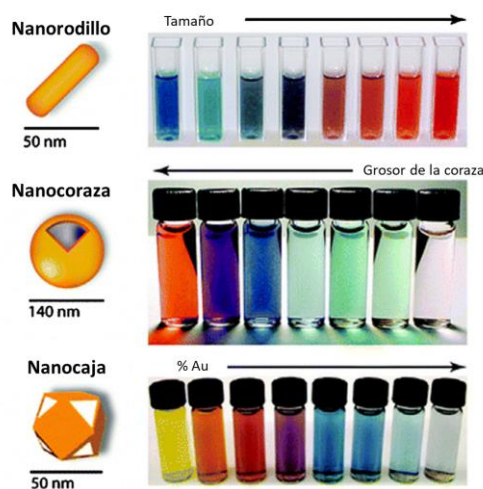


Figura 23. Dependencia del color de nanomateriales de Au en función de su tamaño y forma. Adaptado de Dreaden y colaboradores.<sup>230</sup>

Al reducir un material a la nanoescala también se reduce significativamente su área superficial. Esta es inversamente proporcional al diámetro de partícula y su aumento incrementa notablemente la reactividad del material. Utilizando el oro como ejemplo, mientras que el oro metálico es prácticamente inerte, en su forma nanoparticulada es capaz de formar enlaces covalentes con diferentes biomoléculas o incluso adquirir propiedades catalíticas. Esta facilidad de funcionalización en su superficie junto con las propiedades ópticas mencionadas anteriormente hace que las NPs sean ideales para su aplicación en biosensores y técnicas de imagen.<sup>230</sup>

Los rápidos avances en la nanotecnología en las últimas décadas y sus especiales propiedades han aumentado notablemente la utilización de nanomateriales como las nanopartículas en un amplio rango de aplicaciones, dando lugar a una gran variedad de nuevas posibilidades en campos como la electrónica, óptica, diagnóstico y terapia médica y estando también presentes en numerosos productos de uso cotidiano como los textiles y cosméticos. Las NPs utilizadas en aplicaciones comerciales son mayoritariamente sintetizadas artificialmente, para lo que se utilizan métodos físicos<sup>231</sup>, químicos<sup>232</sup> o biológicos.<sup>233</sup> Actualmente se pueden encontrar nanomateriales en productos de uso cotidiano como cosméticos y cremas solares actuando como antioxidantes<sup>234</sup> y antireflectantes.<sup>235</sup> Además de cosméticos, se han utilizado NPs en una gran variedad de productos comerciales incluyendo desde productos de cuidado personal hasta pinturas. Por ejemplo, las NPs de TiO<sub>2</sub> forman parte de un gran número de productos de consumo siendo declarado el aditivo alimentario E171 por la Unión Europea. Así, se han encontrado contenidos de entre  $6,75 \times 10^{11}$  y  $7,28 \times 10^{11}$  partículas de TiO<sub>2</sub> en un solo chicle y en un rango de tamaños de 30-200 nm aproximadamente.<sup>236</sup> Otro ejemplo es la presencia de nanopartículas de plata, AgNPs, así como de plata iónica en productos textiles como calcetines deportivos.<sup>237</sup>

Las NPs pueden entrar en el organismo humano por vía respiratoria, digestiva y dérmica. Su capacidad de absorción y distribución por todo el organismo se ve favorecida por su pequeño tamaño llegando a alcanzar diferentes órganos y tejidos, incluso muy distantes de la vía de entrada, donde pueden presentar reactividad causando efectos tóxicos. La toxicidad de los nanomateriales y nanopartículas depende de numerosos factores. Primeramente, dependen de la dosis y el tiempo de exposición ya que la cantidad

de NPs que pueden entrar en las células depende directamente de la concentración de estas en el medio adyacente y del tiempo en el que estén en dicho medio.<sup>238</sup> Por otro lado, su estado de agregación también influye en su toxicidad. Finalmente, otros parámetros que afectan a la toxicidad de las NPs son su forma, área superficial, estructura cristalina y su recubrimiento y funcionalización superficial.<sup>239</sup>

Las nanopartículas se pueden clasificar siguiendo varios criterios. Por ejemplo, según su composición se pueden encontrar NPs basadas en carbono entre las que destacan los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs) o los fulerenos que son nanocápsulas esféricas de carbono. Además, se puede distinguir entre nanopartículas inorgánicas y orgánicas. Las primeras incluyen las NPs metálicas (como Au o AgNPs) y de óxidos metálicos (como TiO<sub>2</sub> y ZnO), pero también de materiales semiconductores, con propiedades entre los metales y no metales, y NPs cerámicas que son de naturaleza no metálica. Las NPs orgánicas son aquellas formadas mayoritariamente por materia orgánica entre las que se encuentran estructuras típicas como dendrímeros, micelas, liposomas o NPs poliméricas. También se pueden clasificar según su origen, pudiendo distinguir entre nanopartículas naturales, accidentales y artificiales.<sup>229</sup> Las nanopartículas naturales (*naturally occurring nanoparticles*) son producidas debido a fenómenos y procesos naturales como pueden ser tormentas de arena, incendios, cenizas volcánicas, etc. Además, también se pueden encontrar nanopartículas naturales en diferentes organismos vivos como microorganismos o plantas. Las nanopartículas accidentales (*incidental nanoparticles*) tienen un origen antropogénico, pero se producen de manera no intencionada. Suelen ser el resultado de procesos de combustión, pulido, trituración, fricción o desgaste de materiales como es el caso de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> generadas a partir de prótesis metálicas. Por último, las nanopartículas artificiales (*engineered nanoparticles*) son aquellas sintetizadas intencionadamente para explotar alguna propiedad específica en diferentes aplicaciones. Son el tipo de nanopartículas más diverso existiendo gran variedad de ejemplos de estas.

### 1.3.3.1. Nanopartículas artificiales

Una de las áreas de investigación más importantes y con mayor proyección de futuro dentro de la nanotecnología es la utilización de nanomateriales en biomedicina, como herramientas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades.<sup>240</sup> Entre los diferentes tipos de nanomateriales, las nanopartículas de oro, tienen un gran interés ya que pueden ser sintetizadas en diferentes formas y tamaños, presentan una adecuada biocompatibilidad, son estables y su superficie puede ser funcionalizada fácilmente debido a la afinidad del oro con otros átomos como en el azufre o el nitrógeno, pero también se puede modificar su superficie mediante interacciones electrostáticas o fuerzas de van der Waals.

Las propiedades ópticas de las NPs y otras nanoestructuras de oro son altamente sintonizables, pudiendo ajustarse a longitudes de onda deseables mediante la alteración de la forma y la composición de las nanopartículas.<sup>241</sup> Por ello, pueden ser utilizadas en técnicas de imagen empleadas, por ejemplo, en el diagnóstico *in situ* del cáncer.<sup>242</sup> Otra aplicación muy relevante es el uso de AuNPs como sistemas de distribución de fármacos. Uno de los problemas de cualquier fármaco en su forma aislada es su interacción inespecífica con células y tejidos sanos, lo que puede acarrear graves efectos secundarios. Este problema se podría resolver mediante el uso nanopartículas como nanotransportadores de fármacos. Para estudiar la distribución del fármaco en un tejido específico se ha funcionalizado la superficie de las NPs con diferentes ligandos y biomoléculas como polímeros, péptidos, moléculas de ácidos nucleicos o anticuerpos.<sup>243</sup> Se han utilizado AuNPs para la distribución de fármacos antitumorales como el paclitaxel,<sup>244</sup> fármacos basados en platino<sup>245</sup> o doxorubicina.<sup>246,247</sup> Además de fármacos, también se han utilizado nanoestructuras de oro como vehículos de oligonucleótidos y siARN (*small interfering RNA*) para terapia génica<sup>241</sup> y en terapia fototérmica.<sup>248</sup>

Junto con el uso cada vez mayor de las AuNPs en aplicaciones biomédicas y otros tipos de aplicaciones, surgen grandes preocupaciones sobre sus posibles consecuencias adversas tanto para el medio ambiente como para la salud humana. En este tipo de aplicaciones, las AuNPs utilizadas deben tener características muy controladas en términos de tamaño, forma y modificación superficial. Además, se deben definir muy bien sus implicaciones biológicas para legitimar su utilización. Existen diversos estudios *in vitro*

con AuNPs en los que se encontraron diferentes efectos adversos como daño mitocondrial, estrés oxidativo<sup>249</sup> o autofagia.<sup>250</sup> Paralelamente, en ensayos *in vivo* también se han encontrado efectos como la bioacumulación de las nanopartículas en diferentes órganos,<sup>251,252</sup> inflamación,<sup>253</sup> hepatotoxicidad<sup>254</sup> y efectos genotóxicos.<sup>255</sup>

Antes de alcanzar un órgano o tejido, las nanopartículas de Au pueden sufrir modificaciones en el torrente sanguíneo. Las AuNPs interactúan con proteínas séricas formando un recubrimiento conocido como la corona proteica. La corona influye en la internalización, biodistribución y potencial citotoxicidad de la nanopartícula.<sup>256</sup> Esta corona proteica se forma también en la incubación de las nanopartículas con células *in vitro*.<sup>257</sup> Posteriormente, se puede producir la entrada accidental o intencionada de las nanopartículas en las células, de hecho, esta es la premisa de su utilización en aplicaciones biomédicas. Tras la entrada de las nanopartículas en las células, estas pueden sufrir cambios. Para investigar estos cambios es común la utilización de técnicas de separación acopladas al ICP-MS. Así, se pudo distinguir entre Au en forma nanoparticulada y especies de Au de bajo peso molecular mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.<sup>258,259</sup> También se utilizó el acoplamiento con electroforesis capilar para evaluar los cambios de AuNPs en el citosol celular.<sup>260</sup> La cantidad de nanopartículas incorporadas por las células, su estado químico dentro de ellas y su localización, que puede afectar a la función de estructuras subcelulares, son parámetros cuyo conocimiento es imprescindible para legitimar su utilización.

Para estudiar la incorporación celular existen diferentes técnicas que se pueden distinguir en dos grupos, dependiendo del objetivo. Para la visualización de la incorporación de nanopartículas se utilizan técnicas de microscopía entre las que se encuentran la microscopía confocal de fluorescencia,<sup>261</sup> microscopía confocal láser de barrido,<sup>262</sup> o microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM).<sup>258,263</sup> Sin embargo, si se pretende la cuantificación de las nanopartículas incorporadas, el método predominante es ICP-MS. El uso de ICP-MS en modo *single cell* permite evaluar la incorporación celular de nanopartículas a nivel de célula individual. Así, se ha utilizado para estudiar la interacción entre diferentes tipos de nanopartículas y de tipos celulares.

Se han incubado monocitos de la línea THP-1 y sus parcialmente diferenciados macrófagos con concentraciones de 0,1 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de nanopartículas de plata de 50 nm con tiempos de incubación de 4 y 24 horas para estudiar su incorporación celular. La incorporación de AgNPs fue significativamente mayor para la dosis de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y en las células diferenciadas.<sup>173</sup> También se comparó el contenido en plata en células individuales de la línea HepG2 tras su incubación con 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de plata iónica,  $\text{Ag}^+$ , y nanopartículas de Ag, AgNPs, con un diámetro de  $51 \pm 6$  nm. Se obtuvo una incorporación de Ag de  $6,1 \pm 0,6$  fg y  $7,6 \pm 0,9$  fg, respectivamente, lo que manifiesta la mayor incorporación de Ag en su forma nanoparticulada. Además, se obtuvo una variabilidad más amplia en el contenido de Ag en las células incubadas con AgNPs. También se monitorizó Zn como elemento constitutivo para calcular el porcentaje de células que incorporaron Ag mediante comparación de los eventos detectados en la medida de ambos elementos, obteniendo porcentajes cercanos al 100 % tanto para  $\text{Ag}^+$  como para AgNPs en todos los tiempos de incubación estudiados (6-24 h).<sup>85</sup> En ambos trabajos se utilizó la suspensión de AgNPs para la calibración de la metodología.

Mediante citometría de masas, se desarrolló un método para obtener el número absoluto de AgNPs en células individuales utilizando como modelo los macrófagos diferenciados de la línea THP-1. La tinción del ADN con un agente intercalador de Ir permitió diferenciar entre AgNPs libres y asociadas a las células.<sup>264</sup> Ivask y colaboradores, demostraron el potencial de la citometría de masas para analizar el contenido de Ag, a nivel de célula individual, en linfocitos T humanos expuestos previamente a diferentes dosis de AgNPs de diferentes tamaños (10-60 nm) y diferentes recubrimientos (polietilenimina ramificada y citrato).<sup>265</sup> Como en el caso anterior, tiñeron el ADN para reconocer los eventos celulares y calibraron el sistema con una disolución de  $\text{AgNO}_3$  para calcular Ag en cada evento celular, obteniendo una heterogeneidad entre células individuales de casi un orden de magnitud. Además, trataron las células con una mezcla de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Este tratamiento permite la oxidación de la plata elemental ( $\text{Ag}^0$ ) a  $\text{Ag}^+$ ,<sup>266</sup> disolviendo el núcleo metálico de las AgNPs y permitiendo diferenciar entre AgNPs intracelulares y asociadas a la membrana celular. Tras esto, el contenido de Ag por célula disminuyó un 66,5 % en promedio.

Asimismo, existen varios trabajos que estudian la incorporación de nanopartículas de oro, AuNPs. Wei y colaboradores cultivaron células de la línea MCF-7 (cáncer de mama) en medio de cultivo al que se añadieron AuNPs de 12 nm de diámetro a una concentración de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Después de diferentes tiempos de exposición entre 1 y 8 h, recogieron las células mediante tripsinización y se lavaron 3 veces mediante centrifugación antes de su análisis. Utilizando la suspensión de nanopartículas como patrón de calibración obtuvieron masas de Au en las células individuales de 2,27-6,05 fg que corresponden a 130 y 346 AuNPs por célula, respectivamente.<sup>84</sup> Siguiendo un procedimiento similar, se incubaron células de una línea de leucemia humana (K562) con concentraciones crecientes de AuNPs entre 0,1 y  $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ , obteniendo eventos de Au de mayor intensidad a medida que aumentaba la concentración de AuNPs en el medio de cultivo.<sup>72</sup>

Wang y colaboradores estudiaron la incorporación de AuNPs de diferentes tamaños (15, 30 y 60 nm) y con diferentes recubrimientos (ácido cítrico y ADN). Para ello realizaron incubaciones con diferentes dosis de nanopartículas entre  $0,01$  y  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  durante diferentes tiempos de exposición hasta 24 h. La incorporación celular aumentó con la concentración y el tiempo de exposición y se observó una gran influencia del recubrimiento de las nanopartículas en su incorporación. Así, a concentraciones y tiempos bajos la incorporación de las AuNPs modificadas con ADN fue mayor, mientras que, al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, las células incorporaron una mayor cantidad de AuNPs recubiertas de citrato. Por otro lado, el número de AuNPs incorporadas disminuyó con su tamaño. Además de Au, monitorizaron Zn como elemento constitutivo esencial de las células para calcular el porcentaje de células que habían incorporado AuNPs, observando que, para nanopartículas del mismo tamaño, las recubiertas de ADN alcanzan su incorporación en el 100 % de las células en dosis más bajas y tiempos de incubación más cortos.<sup>83</sup> Por otro lado, Merrifield y colaboradores compararon la entrada de Au disuelto y AuNPs de 60 nm en células individuales del alga *Cryptomonas ovata*.<sup>68</sup> Como en el caso comentado anteriormente para la Ag, la incorporación fue mayor y más rápida para las AuNPs en comparación con Au disuelto a concentraciones similares de ambas especies.

Finalmente, se ha utilizado SC-ICP-MS para investigar la incorporación de otros tipos de nanopartículas. Wang y colaboradores cuantificaron zinc en células individuales



de la línea HepG2 incubadas con nanopartículas de ZnO de 200 nm aproximadamente (1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 24 h). Obtuvieron un contenido promedio de 21,7 fg de Zn por célula, similar al valor obtenido tras la digestión ácida de las células (25,0 fg por célula). En los histogramas de intensidad de los eventos obtenidos se observaron 4 poblaciones en diferentes proporciones que correspondían a células que no habían incorporado ZnO NPs (71 %), y células que incorporaron una, dos o tres NPs (29 %).<sup>82</sup> También se ha analizado la incorporación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> de 7 y 20 nm en células Neuro-2a mediante diferentes técnicas, utilizando la ablación láser para su estudio a nivel de célula individual.<sup>93</sup> Por otro lado, se ha determinado la concentración intracelular de otro tipo de nanomateriales como los puntos cuánticos (*Quantum Dot*, QD). Zheng y colaboradores investigaron la cinética de incorporación de QDs de CdSeS de 7 nm de diámetro en células Raw 264.7 tras su incubación durante 2-12 h a una concentración de 30 nmol L<sup>-1</sup>. Mediante la medida de <sup>111</sup>Cd y utilizando patrones elementales se cuantificó el número de QDs por célula. Gracias a la propia fluorescencia de los QDs los resultados se pudieron comparar con dos métodos alternativos, medidas globales de ICP-MS tras la digestión de las células y citometría de flujo convencional, obteniendo en todas las técnicas un aumento en la incorporación de QDs en las primeras 8 h de incubación que se estabiliza a las 8-12 h.<sup>62</sup>

Los nanomateriales también se han utilizado como marcadores para la detección de células individuales. Así, se utilizaron QDs de CdSe/ZnS para la detección y visualización de células HepG2 tras su captura utilizando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos.<sup>267</sup> Con este mismo objetivo, se utilizó un aptámero para el reconocimiento de células tumorales de la línea MCF-7 marcado con AuNPs.<sup>268</sup> El método fue mejorado mediante la amplificación del ADN del aptámero por el método del círculo rodante y aplicado al conteo de celular tumorales circulantes (CTCs).<sup>269</sup>

### **1.3.3.2. Nanopartículas naturales o biogénicas**

Además de las nanopartículas sintetizadas artificialmente, se pueden encontrar diferentes tipos de nanoestructuras en organismos vivos. Estos comprenden desde microorganismos unicelulares como bacterias, algas, hongos o levaduras, hasta organismos complejos como plantas, insectos o animales.

La caracterización y determinación de las nanoestructuras presentes en microorganismos es importante para su posterior uso en diferentes tipos de aplicaciones. Genéricamente, las bacterias pueden acumular metales pesados tóxicos en su forma soluble y precipitarlos, produciendo NPs metálicas. La bacteria *Pseudomonas stutzeri* A2549 fue la primera bacteria usada para producir, en este caso, AgNPs.<sup>270</sup> Posteriormente se utilizaron diferentes especies y cepas bacterianas para la biosíntesis de nanopartículas metálicas como AuNPs,<sup>271</sup> de aleaciones metálicas,<sup>272,273</sup> o puntos cuánticos de sulfuros metálicos como CdS<sup>274</sup> o ZnS.<sup>275</sup> Los actinomicetos, que son un filo heterogéneo de bacterias Gram positivas que generalmente forman filamentos similares a los micelios de los hongos, también son capaces de producir NPs. Especies como *Thermomonospora sp.* y *Rhodococcus sp.* fueron utilizadas para la síntesis de AuNPs monodispersas.<sup>276</sup> Este tipo de síntesis biológica parece ser muy útil para la utilización de las NPs producidas en aplicaciones biomédicas ya que suelen presentar una toxicidad celular menor que las sintetizadas químicamente.<sup>277</sup> Sin embargo, también presenta inconvenientes respecto a los métodos de síntesis físicos y químicos como el bajo rendimiento, necesitando de más tiempo, dificultad de purificación y menor reproducibilidad.<sup>278</sup>

A parte de las bacterias, se ha demostrado la capacidad de otros tipos de microorganismos para producir NPs biogénicas como algas, hongos o levaduras. Se han utilizado algas unicelulares para producir NPs, como la síntesis de AgNPs por el alga verde *Chlorella vulgaris*<sup>279</sup> o de CdS con recubrimientos peptídicos como las fitoquelatinas por *Phaeodactylum tricornium*.<sup>280</sup> De manera similar, los hongos se consideran buenos candidatos para la síntesis de NPs metálicas y de sulfuros metálicos. Estos contienen una gran variedad de enzimas que pueden mediar la síntesis de NPs y que son fáciles de manejar, lo que ofrece la posibilidad de producir NPs de diferentes tamaños y formas. Se han utilizado hongos como *Fusarium oxysporum* y *Verticillium sp.* en la síntesis de AuNPs y AgNPs,<sup>272,281</sup> y enzimas del primero en la síntesis de puntos cuánticos de CdS.<sup>282</sup> Por último, levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* fueron involucradas en la síntesis de nanocristales de PbS<sup>283</sup> y también se aprovecharon propiedades especiales de cepas de levaduras como la tolerancia a la plata de la cepa MKY3 para la síntesis de AgNPs.<sup>284</sup>

Estas partículas biogénicas pueden presentar interesantes propiedades. En concreto, las nanopartículas de selenio (SeNPs) sintetizadas por diferentes microorganismos como bacterias, hongos o levaduras tienen propiedades antibacterianas, antivirales y antioxidantes.<sup>285,286</sup> Se cree que las levaduras son capaces de sintetizar nanopartículas de Se como mecanismo de detoxificación de este elemento.<sup>287</sup> La formación de estas nanopartículas se basa en la reducción de los oxoaniones selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) y selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) a selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ), con menor solubilidad, siendo menos biodisponibles y, por tanto, menos tóxicas para el microorganismo. Esto resulta en la formación de SeNPs tanto intracelulares como extracelulares típicamente de forma esférica y con un diámetro de 50-400 nm.<sup>288,289</sup> La capacidad de las levaduras de acumular selenio tiene interés biotecnológico. Estas tienen la capacidad de transformar el selenio inorgánico en forma de selenito en selenoaminoácidos, en particular selenometionina.<sup>290</sup> Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* crecidas en medio de cultivo enriquecido en selenio pueden acumular hasta 3000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de selenio y han sido utilizadas como suplemento alimenticio<sup>290</sup> y en dosis altas (> 200  $\mu\text{g}$  de Se por día) en tratamientos de prevención de cáncer de colon y próstata.<sup>291</sup> El análisis de las diferentes especies de selenio presentes en estas levaduras es importante ya que la verificación de estos productos requiere de un contenido de al menos 60 % del selenio en forma de selenometionina y menos de un 2 % del selenio inorgánico utilizado para enriquecer el medio de cultivo.<sup>292</sup> Para la calibración de instrumentos y validación de métodos para la determinación de selenio total, metionina y selenometionina en muestras de levadura, existe un material de referencia de levadura enriquecida en selenio o selenizada, llamado SELM-1.<sup>293</sup>

Aunque se han detectado nanopartículas biogénicas en células, sobre todo de microorganismos, mediante otras técnicas como TEM<sup>288,289,294,295</sup> difracción de rayos X (*X-ray diffraction*, XRD)<sup>296</sup> o microscopía de fuerza atómica (*Atomic force microscopy*, AFM),<sup>295,296</sup> existen pocos trabajos en la actualidad en los que se utilice el ICP-MS en modo *single cell* o *single particle* para su detección y caracterización, en comparación con los estudios de incorporación de nanopartículas artificiales.

Se demostró la capacidad de cuatro especies de hongos (*Aureobasidium pullulans*, *Mortierella humilis*, *Trichoderma harzianum* y *Phoma glomerata*) de reducir  $\text{SeO}_3^{2-}$  y

TeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> a selenio y telurio elemental formando nanopartículas de ambos elementos. Para ello, las formas inorgánicas de ambos elementos se añadieron al medio de cultivo en una concentración de 1 mmol L<sup>-1</sup> lo que, tras varios días de cultivo, provocó un cambio de coloración a rojo y negro, constituyendo un primer indicio de la formación de Se<sup>0</sup> y Te<sup>0</sup>, respectivamente. Las nanopartículas liberadas al medio de cultivo se detectaron y se caracterizaron en tamaño mediante ICP-MS en modo *single particle* monitorizando <sup>78</sup>Se y <sup>125</sup>Te. Tras 10 días de incubación dos de las especies produjeron nanopartículas de Se de diámetros entre 48-60 nm, que aumentaron con los días de incubación hasta 78 nm aproximadamente. La formación de nanopartículas de Te comenzó tras 20 días de incubación y la mayoría de ellas presentó diámetros entre 40-70 nm.<sup>297</sup>

Por otro lado, Lamana y colaboradores desarrollaron un método basado en *single particle* ICP-MS para la detección y caracterización de nanopartículas de selenio biogénicas en células de levadura crecidas en medios de cultivo enriquecidos con diferentes concentraciones de selenio inorgánico. Obtuvieron un límite de detección de 18 nm para SeNPs utilizando H<sub>2</sub> en la celda para la medida de <sup>80</sup>Se, el isótopo más abundante, con un tiempo de integración de 100 μs. Para extraer las posibles SeNPs de las células de levadura sin provocar cambios en su tamaño o morfología realizaron una larga digestión enzimática de las células. El lisado celular obtenido fue analizado mediante TEM y EDX para confirmar la presencia de nanopartículas esféricas compuestas de selenio elemental. Con esta información, los eventos obtenidos mediante el análisis del lisado celular mediante SP-ICP-MS se pudieron transformar en tamaño de nanopartícula obteniendo una distribución de tamaños centrada en 108 ± 4 nm, valor que concuerda con el tamaño observado por TEM.<sup>298</sup>

En ambos trabajos se refleja la importancia del uso de técnicas complementarias para caracterizar las nuevas nanopartículas sintetizadas de forma natural por las células de los microorganismos. Se necesita de técnicas que proporcionen información acerca de su composición química, estructura cristalina, morfología, distribución de tamaños y estado de aglomeración.

### 1.3.4. Medida de componentes celulares mediante el uso de anticuerpos marcados

La detección de biomoléculas se puede realizar de manera directa mediante ICP-MS si estas contienen un heteroátomo (elemento diferente de C, H, O y N), como puede ser P o S, o tras la unión de marcas artificiales a la biomolécula de interés. Alternativamente, se puede detectar de manera indirecta mediante el uso de un anticuerpo específico marcado mediante un inmunoensayo. Para ello, se unen marcas metálicas a los anticuerpos que reconocen la biomolécula de interés de manera específica a través de la reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, la detección de la marca unida al anticuerpo mediante ICP-MS permite la identificación, cuantificación y, en el caso de técnicas de imagen, distribución de la biomolécula diana en la muestra.

Para el marcaje se utilizan normalmente ligandos bifuncionales que contienen dos partes, un quelante macrocíclico como el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) o el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y un grupo reactivo que lo une al anticuerpo.<sup>299</sup> Tanto el DOTA como el DTPA forman complejos de inclusión muy estables con iones trivalentes como los de los lantánidos en un amplio rango de pH y de concentraciones salinas (Figura 24). Se suelen utilizar lantánidos como marca ya que poseen bajos potenciales de ionización lo que permite su medida mediante ICP-MS con gran sensibilidad. Además, son elementos raros que no se encuentran típicamente en muestras biológicas descartando problemas de fondos. Estos complejos se pueden modificar con un grupo reactivo capaz de formar enlaces covalentes con el anticuerpo. Un ejemplo típico es el grupo maleimida que es capaz de formar enlaces covalentes con grupos tiol, según la reacción que se esquematiza en la Figura 24 (b).

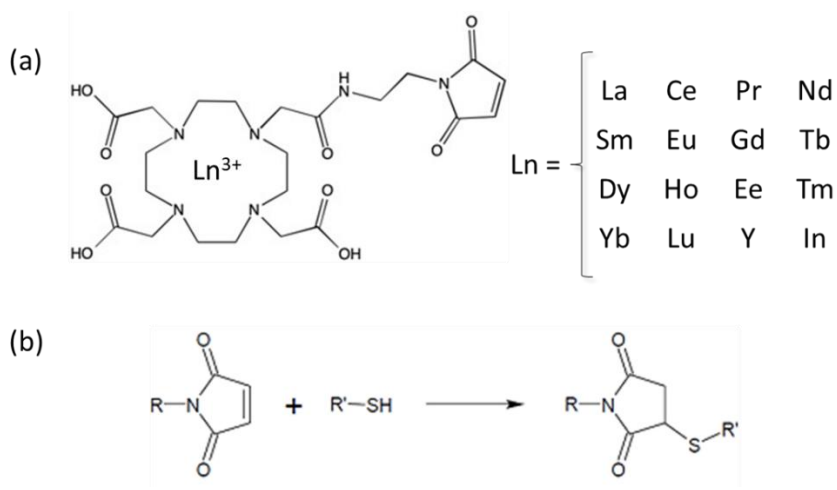


Figura 24. (a) Estructura del complejo DOTA-lantánido modificado con el grupo maleimida, (b) reacción entre el grupo maleimida y grupos tiol.

En este tipo de marcaje, cada marcador contiene solamente un elemento detectable. Dependiendo de la estequiometría de la unión, se añaden entre 1 y 4 átomos detectables por anticuerpo.<sup>300</sup> Para el análisis de analitos en muy baja concentración como en el análisis a nivel de célula individual, la sensibilidad del ICP-MS puede no ser suficiente utilizando este tipo de marcaje. Por ello, se han desarrollado nuevas marcas poliméricas como el MAXPAR®.<sup>134</sup> Estos polímeros presentan varios sitios de unión que resultan en hasta 30 átomos metálicos por marcador. La unión al anticuerpo se consigue mediante un grupo maleimida que se enlaza con los grupos tiol libres del anticuerpo después de la reducción parcial de sus puentes disulfuro. Se han propuesto estequiometrías de unión de hasta 4 marcas poliméricas por anticuerpo lo que aumenta significativamente la sensibilidad de la medida permitiendo su aplicación en células individuales.<sup>43</sup> Una desventaja de este tipo de bioconjugación entre la marca y el anticuerpo es la necesidad de reducir parcialmente el anticuerpo. Por ello, tras su marcaje se debe validar la especificidad de unión entre el anticuerpo y el correspondiente antígeno. Además, se pueden formar fragmentos de anticuerpo que pueden presentar diferente grado de marcaje. Esto complica la cuantificación, para la que es necesario saber previamente el número exacto de marcas por anticuerpo y el número de anticuerpos capaces de unirse al antígeno.<sup>301</sup>

En este sentido, Corte y colaboradores desarrollaron un método basado en el uso de anticuerpos marcados para la determinación de receptores de transferrina (TfR1) en células individuales de líneas celulares de cáncer de mama de diferente malignidad (MCF-

7 y MDA-MB-231, siendo las últimas el fenotipo más maligno).<sup>67</sup> La metodología desarrollada tiene como objetivo la cuantificación únicamente de los receptores presentes en la membrana celular. Para ello se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-TfR1 que se marcó con el quelante polimérico MAXPAR<sup>®</sup> cargado con <sup>142</sup>Nd. Las células fueron introducidas al ICP-MS de manera individual utilizando un sistema de introducción de alta eficiencia y obteniendo eventos de <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup> como marcador celular y <sup>142</sup>Nd<sup>+</sup> como resultado del marcaje. En este trabajo se obtuvieron valores promedio de 2,3x10<sup>4</sup> receptores por célula en la línea más maligna MDA-MB-231 y de 6,4x10<sup>3</sup>, casi 4 veces menos, en las células MCF-7. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos con el ELISA comercial de manera global. Además, con la diferencia entre los resultados de ambas técnicas, consiguieron distinguir entre receptores de membrana e intracelulares.

También se han utilizado anticuerpos marcados para el reconocimiento de células específicas. Así, Yang y colaboradores estudiaron la incorporación de AuNPs selectivamente en diferentes tipos celulares de tejido pulmonar de ratón. Mediante el uso de citometría de masas y anticuerpos marcados con nueve lantánidos diferentes para la identificación de marcadores de membrana, consiguieron la distinción fenotípica de las células. Pudieron observar diferencias en el contenido de oro en macrófagos alveolares, células dendríticas y células B/T.<sup>302</sup> De manera similar, Liang y colaboradores utilizaron cinco anticuerpos policlonales marcados con quelantes tipo DOTA cargados con cinco lantánidos diferentes para el reconocimiento específico y simultáneo de cinco cepas típicas de bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae* y *Vibrio parahemolyticus*) en una mezcla bacteriana. Las bacterias fueron introducidas de manera individual al ICP-MS para su detección.<sup>303</sup>





---

## ***2. Objetivos***

---



## 2.1. Objetivos generales

En la introducción se han puesto de manifiesto las diferentes causas y formas de heterogeneidad celular y su relevancia como fuente de variabilidad entre las células individuales de una población celular. Esto hace que los estudios realizados en poblaciones celulares de manera global tras la lisis o digestión celular puedan ofrecer una información no representativa de las células individuales que la componen. Por ello, el desarrollo de técnicas y métodos para el análisis, tanto a nivel molecular como elemental, en células individuales está acaparando un creciente interés. La espectrometría de masas elemental es una buena candidata para la detección de elementos metálicos y no metálicos en pequeñas estructuras como células y nanopartículas individuales debido a sus excelentes características analíticas. Sin embargo, el análisis de células individuales mediante ICP-MS es un campo aún en desarrollo debido a los desafíos que supone, relacionados con la baja concentración de analitos presentes en una célula, la compleja matriz que las células constituyen y la baja eficiencia de los sistemas de introducción de muestra convencionales en ICP-MS.

Por ello, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es:

*“El desarrollo y aplicación de métodos analíticos basados en espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) y técnicas complementarias para el análisis de pequeñas estructuras como células y nanopartículas individuales”*

Para abordar dicho objetivo, se aplicarán diferentes estrategias de análisis basadas en ICP-MS provistos con diferentes tipos de analizadores (cuadrupolo simple, triple cuadrupolo y tiempo de vuelo) y se perseguirá el desarrollo de sistemas de introducción de muestra de alta eficiencia. Además, se utilizarán técnicas complementarias para la determinación y caracterización de nanopartículas, el contaje celular, la evaluación de la citotoxicidad celular y cambios en el metaboloma de las células. Este objetivo general se abordará a través de los siguientes objetivos parciales, que se detallarán de forma individual en cada capítulo de la Tesis Doctoral:

1. Desarrollo y caracterización de un método basado en nebulización neumática para la introducción de células individuales al ICP-MS con alta eficiencia. Para ello se optimizará y caracterizará un sistema de introducción de muestras basado en un nebulizador de microflujos y una cámara de nebulización de pequeño volumen. El método desarrollado se aplicará a la evaluación cuantitativa de la incorporación de cisplatino en células de cáncer de ovario sensibles y resistentes al fármaco. Los resultados se validarán mediante comparación con los resultados obtenidos mediante ICP-MS tras la digestión ácida de las células. Por otro lado, el mismo sistema se utilizará para investigar el contenido de cobre en esporas individuales de diferentes cepas de la bacteria *Streptomyces coelicolor*.

2. Puesta a punto de estrategias analíticas basadas en ICP-MS para el análisis de pequeñas estructuras. Se evaluará un nuevo sistema de introducción de muestra de alta eficiencia para el análisis tanto de células como de nanopartículas individuales. Este se utilizará para cuantificar la incorporación de selenio en células individuales de levaduras cultivadas en presencia de diferentes fuentes de este elemento y para investigar la presencia de nanopartículas biogénicas de selenio en estas células. Además, se utilizará el acoplamiento HPLC-ICP-MS y técnicas de microscopía para la detección y caracterización de nanopartículas en un mayor rango de tamaños. Estas mismas estrategias se utilizarán para el estudio de la degradación de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato en tejidos animales tras su administración por vía intraperitoneal.

3. Evaluación del impacto celular generado por la exposición a nanopartículas de oro de diferentes recubrimientos en cultivos celulares. Para llevar a cabo este objetivo se desarrollará una metodología basada en ICP-TOF-MS para evaluar la incorporación de las nanopartículas en células individuales. Se aprovechará la posibilidad de análisis multielemental cuasi-simultáneo de este equipo para distinguir entre nanopartículas libres y asociadas a las células. Por otro lado, se evaluará la citotoxicidad de las nanopartículas de oro empleadas y su influencia en el metaboloma celular, mediante un experimento de metabolómica dirigida basado en la medida mediante un espectrómetro de masas de alta resolución (orbitrap) con fuente de electrospray tras la separación de los metabolitos por cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica

## 2.2. General Objectives

In the introduction, the different causes and forms of cellular heterogeneity and their relevance as a source of variability between single cells of a cell population have been revealed. This means that the studies carried out in bulk in a whole cell population after cell lysis or digestion can provide information that is not representative for potential variations in individual cells. Therefore, the development of analytical strategies for the analysis, both at the molecular and elemental level, in single cells is attracting great interest. Elemental mass spectrometry is a good candidate for the detection of elements in small objects like single cells and nanoparticles due to its excellent analytical characteristics. However, the analysis of single cells by ICP-MS is still an active research field due to the remaining challenges. These are related to the low concentration of the analytes in an individual cell, its complex matrix and the low transport efficiency of conventional ICP-MS sample introduction systems.

Therefore, the **general objective** of the present Doctoral Thesis is:

*“The development and application of analytical methods based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and complementary techniques for the analysis of small objects such as single cells and nanoparticles”.*

To address this objective, analytical strategies based on ICP-MS instruments with different types of mass analysers (single quadrupole, triple quadrupole and time-of-flight) will be applied and the development of highly efficient sample introduction systems will be emphasized. In addition, complementary techniques will be used for the detection and characterization of nanoparticles, cell counting, evaluation of cytotoxicity, and changes in the cell metabolome. This general objective will be addressed through the following partial objectives, which will be detailed in each chapter of the present Doctoral Thesis:

1. Development and characterization of a method based on pneumatic nebulization for the introduction of single cells into the ICP-MS with high transport efficiency. For this aim, a sample introduction system based on a microflow nebulizer and a total consumption spray chamber will be optimized and characterized. The developed method will be applied to the quantitative evaluation of the cisplatin uptake in sensitive

and drug resistant ovarian cancer cells. The results will be validated by comparison with those obtained by bulk ICP-MS analysis after the acid digestion of the cells. On the other hand, the same system will be used to investigate the copper content in single spores of different strains of *Streptomyces coelicolor*.

2. Development of analytical strategies based on ICP-MS for the analysis of small objects. A new highly efficient sample introduction system will be evaluated for the analysis of both, single cells and nanoparticles. This system will be applied to quantify the incorporation of selenium in single yeast cells grown in the presence of different sources of this element and to investigate the cellular presence of biogenic selenium nanoparticles. In addition, the HPLC-ICP-MS coupling and microscopy techniques will be used for the detection and characterization of nanoparticles in a wide size range. The same strategies will be applied to study the degradation of citrate-stabilized gold nanoparticles in rat tissues after their intraperitoneal injection.

3. Evaluation of the cellular impact generated by the exposure to gold nanoparticles with different coatings. To carry out this partial objective, a method based on ICP-TOF-MS will be developed to evaluate the uptake of nanoparticles in single cells. The capability of quasi-simultaneous multielement analysis of this instrument will be exploited to distinguish between free and cell-associated nanoparticles. On the other hand, the cytotoxicity of the gold nanoparticles and their influence on the cell metabolome will be evaluated, the latter by means of a targeted metabolomics approach based on high resolution mass spectrometry detection (orbitrap) with an electrospray source after the separation of the metabolites by hydrophilic interaction liquid chromatography.

---

## ***3. Experimental***

---





## 3.1. Instrumentación

### 3.1.1. Equipos de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

#### Equipo de ICP-MS con analizador de masas de tipo cuadrupolo

**Agilent 7700x** (Agilent Technologies, Tokio, Japón): equipo de ICP-MS con analizador de tipo cuadrupolo y provisto de un octapolo como celda de colisión-reacción para la eliminación de interferencias poliatómicas mediante su presurización con gases como He o H<sub>2</sub>. El equipo está equipado convencionalmente con un nebulizador de tipo Meinhard y una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott con un sistema de refrigeración que lo mantiene a 2º C. Los conos de extracción de la interfase son de níquel. Los orificios de estos son de 1 mm en el caso del *sampler* y 0,4 mm en el caso del *skimmer*. El detector es de tipo multiplicador de electrones secundarios (SEM). Este detector funciona en dos modos diferentes, digital y analógico, dependiendo de la intensidad de la señal.

Las condiciones de medida fueron optimizadas diariamente utilizando una disolución multielemental de concentración 1 µg L<sup>-1</sup> para obtener la máxima señal con la mínima formación de óxidos y especies doblemente cargadas, que se evaluó mediante la determinación de la relación  $^{140}\text{Ba}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ba}^+$  y  $^{140}\text{Ba}^{2+} / ^{140}\text{Ba}^+$ , respectivamente.

#### Equipo de ICP-MS con analizador de masas de tipo triple cuadrupolo

**Thermo iCAP-TQ** (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania): Equipo de ICP-MS con analizador de triple cuadrupolo y detector tipo SEM. Convencionalmente equipado con un nebulizador de vidrio concéntrico MicroMist y una cámara de nebulización de cuarzo de geometría ciclónica y refrigerada por efecto peltier (ambos de ESI Elemental Service & Instruments GmbH, Maguncia, Alemania). La antorcha es también de cuarzo y el inyector presenta un diámetro interno de 2,5 mm. Los conos de extracción son de níquel y los orificios del *sampler* y el *skimmer* son de 1,1 y 0,5 mm de diámetro, respectivamente.

Para la introducción de muestras convencional se usó la propia bomba peristáltica del equipo y el automuestreador ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, EE.

UU.). Como en el caso anterior, el equipo fue optimizado diariamente utilizando una disolución multielemental de concentración  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

El analizador de masas de triple cuadrupolo consiste en dos cuadrupolos (Q1 y Q3) colocados antes y después de una celda de colisión-reacción (CRC, Q2). Esto permite un mejor control de los procesos que ocurren en la celda, mejorando los límites de detección de elementos que sufren de grandes interferencias espectrales. Mediante la presurización de la celda con diferentes gases se puede convertir una interferencia poliatómica en otra especie no interferente o el propio analito en un ión no interferido. El equipo se puede utilizar tanto en modo cuadrupolo simple como triple cuadrupolo. En el primer modo, el Q1 actúa simplemente como una guía de iones permitiendo la entrada de todos los iones a la CRC, que puede estar presurizada con un gas o no, seleccionando solamente en el Q3 la  $m/z$  que llega al detectar. En el modo triple cuadrupolo, se selecciona una  $m/z$  tanto en el Q1 como en el Q3. Estos pueden estar fijados para escanear la misma  $m/z$  si las interferencias reaccionan con el gas de la celda (*on-mass approach*) o en diferentes  $m/z$  si se hace reaccionar a los iones del analito (*mass-shift approach*). En este último modo solo el analito y sus interferencias entran en la celda, donde el analito reacciona con el gas formando un nuevo ión producto cuya masa se fija en el Q3. Las interferencias de este ión producto han sido previamente eliminadas en el Q1. Este modo ha sido utilizado para la medida de elementos muy afectados por interferencias espectrales en ICP-MS como  $^{31}\text{P}$  o  $^{80}\text{Se}$ , utilizando  $\text{O}_2$  como gas de reacción. En la Figura 25 se representa la medida de  $^{31}\text{P}$  en este modo.

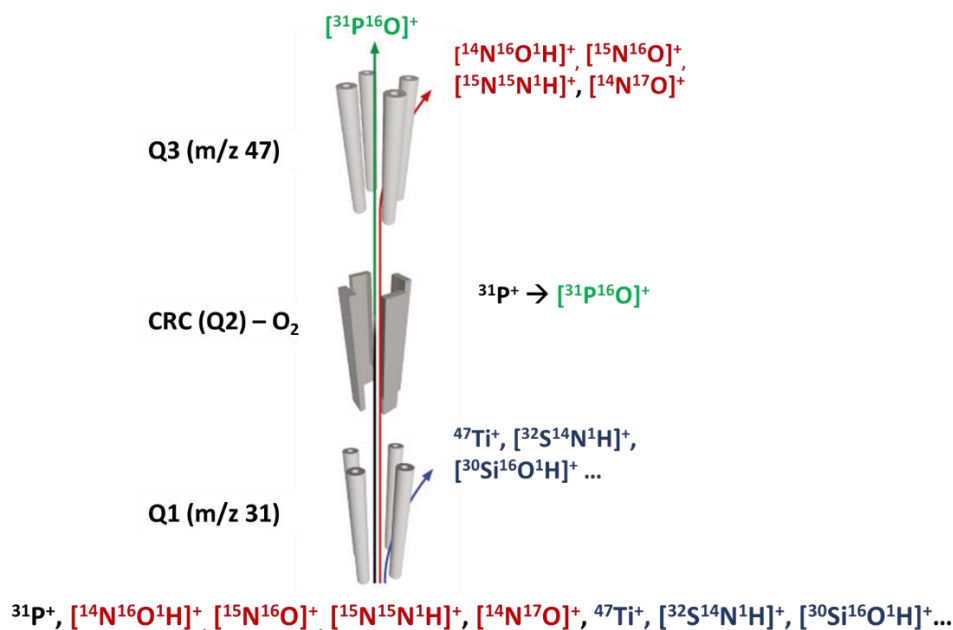


Figura 25. Medida de  $^{31}\text{P}$  mediante ICP-MS en modo triple cuadrupolo utilizando  $\text{O}_2$  como gas de reacción.

### Equipo de ICP-MS con analizador de masas de tipo tiempo de vuelo

**icpTOF 2R** (TOFWERK, Thun, Suiza): Este equipo se basa en la combinación de un equipo de ICP-MS de cuadrupolo (iCAP Q, Thermo Fisher Scientific) y un analizador de masas de tiempo de vuelo (Tofwerk) acoplados mediante una interfase y un software adecuados. Convencionalmente presenta un nebulizador concéntrico de vidrio de borosilicato y una cámara de nebulización ciclónica. El equipo está equipado con inyector de 2,5 mm de diámetro interno. Los conos de extracción son de níquel. El *sampler* posee un orificio de 1,1 mm de diámetro y el *skimmer* de 0,5 mm. Además de la alta resolución ( $R = 6000$ ), el analizador TOF permite realizar análisis a una alta velocidad, siendo capaz de adquirir el completo espectro de masas ( $m/z$  6-280) cada 30  $\mu\text{s}$  y permitiendo así el análisis multielemental en señales muy cortas.

Para la introducción de las muestras celulares, soluciones de limpieza y patrones de calibración a bajo flujo se utilizó el automuestreador MVX-7100 (Teledyne CETAC Technologies). Este permite mantener las muestras en un soporte enfriado donde solamente el volumen necesario para la media es aspirado y llevado al *loop* o bucle de inyección. Posteriormente se utiliza un flujo de, en este caso,  $\text{HNO}_3$  al 2 % para transportar

la muestra al sistema de introducción de muestras del ICP-MS y como solución de lavado entre diferentes muestras. Todas las partes internas de este automuestreador son inertes y libres de metales para el análisis elemental de ultratrazas.

Para el desarrollo de métodos de análisis de células individuales y su aplicación a diferentes tipos de muestras, se han equipado todos los instrumentos de ICP-MS descritos con diferentes sistemas de introducción de muestra. Estos serán detallados en los correspondientes capítulos.

### **3.1.2. Equipo de espectrometría de masas con fuente de ionización por electrospray (ESI-MS)**

**Espectrómetro de masas de alta resolución modelo Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™** (Thermo Fisher Scientific) con fuente de ionización de electrospray. Este equipo combina un cuadrupolo segmentado que actúa como filtro de masas para lograr un aislamiento de iones precursores más preciso con un analizador de masas Orbitrap de alta resolución. Además, presenta una alta velocidad de barrido de hasta 18 Hz. Este equipo se utilizó en modo *Full Scan* en un rango de  $m/z$  de 65-900 Da para el análisis de pequeños metabolitos, con una resolución de 120000 y cambio de modo positivo-negativo.

El orbitrap utiliza dos electrodos, uno externo y uno interno coaxial, para atrapar los iones en el campo electrostático formado entre ellos. El filamento interno consiste en una barra en forma de huso. Los iones entran de forma perpendicular y adquieren un movimiento radial alrededor del huso combinado con un movimiento axial periódico cuya frecuencia depende de la relación  $m/z$  del ión. La señal registrada es una señal compleja conocida como interferograma formada por la combinación de las señales senoidales de distintas frecuencias (iones de distinta  $m/z$ ) e intensidades de cada uno de los iones. El espectro de masas resultante se consigue mediante la aplicación a esta señal de la transformada de Fourier, un método matemático que permite separar los componentes de una señal periódica compleja como la que se obtiene en este caso. Este tipo de

analizadores posee una alta precisión de masa ( $< 1$  ppm) y resolución de masa (hasta 600000).

### 3.1.3. Equipos de cromatografía de alta resolución (HPLC)

**Equipo de HPLC-VIS-UV convencional**, modelo Agilent 1260 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), que consta de una bomba binaria, un desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostatación de las columnas y detector de diodos (*Diode-Array Detector*, DAD). La fuente luz del DAD es una lámpara de deuterio y el rango operativo de longitud de onda cubierto es de entre 190 y 640 nm. Una matriz de 1024 diodos se encarga de la detección.

**Equipo de HPLC** compuesto por dos bombas de doble pistón (LC-20AD, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) para su acoplamiento con los equipos de ICP-MS mediante una válvula de inyección de 6 vías modelo Rheodyne 3125 (Cotati, CA, EE. UU.) con un bucle de inyección de 20  $\mu$ L de capacidad. Todas las conexiones y el bucle de inyección utilizados fueron de PEEK.

La conexión de los dos sistemas cromatográficos anteriores con los equipos de ICP-MS se realizó de forma directa mediante un tubo de PEEK que une la salida de la columna cromatográfica con la entrada del nebulizador utilizado. La longitud del tubo debe ser reducida al mínimo posible para minimizar el volumen muerto y el ensanchamiento de los picos cromatográficos.

**Equipo Vanquish DUO UHPLC (Thermo Fisher Scientific)**. Este equipo dispone de un sistema de inyección doble, dos bombas binarias y dos compartimentos de columnas. Soporta altas presiones de hasta 1500 bar y un intervalo de flujos de trabajo de hasta 8 mL  $\text{min}^{-1}$ . Este sistema cromatográfico se utilizó acoplado al espectrómetro de masas con fuente de electrospray mencionado en el apartado anterior.

### 3.1.4. Instrumentación complementaria

**Citometría de flujo:** Citómetro de flujo FC 500 series y Cytotflex S, ambos de Beckman Coulter (California, EE. UU.).

**Microscopía electrónica de transmisión (TEM):** Microscopio MET JEOL-2000 (Tokio, Japón) utilizado a un voltaje de aceleración de 160 kV y microscopio de alta resolución MET JEOL JEM-2100 F (Tokio, Japón) que opera a un voltaje de aceleración de 200 kV. Este alcanza una resolución de 2,3 Å entre puntos y 1,0 Å entre líneas. Además, está equipado con un microanalizador de energía dispersiva de rayos-X (EDX) que permite el análisis de la composición elemental de la muestra.

**Lector de placas modelo Cytation 3** de Biotek Instruments (Vermont, EE. UU.).

**Balanza analítica modelo XB 220 A** de Precisa (Dietikon, Suiza).

**pH-metro modelo micro-pH2000** de Crison Instruments S.A. (Barcelona, España).

**Agitador vortex modelo zx3** de VELP Scientifica (Usmate, Italia).

**Centrífuga modelo Heraeus** de Biofuge Stratos (Hanau, Alemania).

**Microcentrífuga Eppendorf® modelo MiniSpin Plus®** de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

**Bomba de jeringa SP10li** (Florida, EE. UU.) equipada con una jeringa Hamilton™ de 1 mL (Nevada, EE. UU.).

**Baño de ultrasonidos modelo Ultrasons 30000514** de J.P. Selecta (Barcelona, España).

**Baño de agua termostatzado** de control digital modelo Digiterm 100 de J.P. Selecta.

**Liofilizador** modelo LyoLab 3000 de Thermo Scientific.

**Placa calefactora modelo RCT basic** de IKA (Staufen, Alemania), equipado con una sonda digital para el control de la temperatura modelo ETS-D4 fuzzy de IKA.

**Destilador de ácidos** modelo DST-1000 de Savillex (París, Francia) para destilación lenta de ácidos “*sub-boiling*”.

## 3.2. Materiales, reactivos y disoluciones

Se enumeran a continuación los materiales, reactivos y disoluciones preparadas a partir de ellos más utilizados durante la presente Tesis Doctoral:

- Columna de HPLC de fase reversa Nucleosil 1000-7 C18 (250 x 4,6 mm, 7 µm de tamaño de partícula, 1000 Å de tamaño de poro) de Macherey-Nagel (Düren, Alemania).
- Columna de HPLC polimérica de interacción hidrofílica SeQuant® Zic® pHILIC (150 x 2,1 mm, 5 µm de tamaño de partícula) de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania).
- Filtros Millex-GV de 0,22 µm de un solo uso de Millipore (Darmstadt, Alemania).
- Agua ultrapura (> 18 MΩ) obtenida de dos sistemas: Milli-Q System Advantage de Millipore (Bedford, MA, EE. UU.) y PURELAB flex 3 de ELGA VEOLIA (Londres, Reino Unido) para la preparación de todas las disoluciones y suspensiones acuosas.
- Ácido nítrico de alta pureza obtenido a partir de ácido nítrico concentrado al 65 % (p/v) de calidad pro-análisis (Merck) mediante destilación lenta *sub-boiling*.
- Peróxido de hidrógeno al 30 % (p/v) de alta pureza (Suprapur®, Merck).
- Reactivos de grado analítico para la preparación de las distintas fases móviles utilizadas en las diferentes separaciones cromatográficas: acetato de amonio, dodecilsulfato sódico (SDS), bicarbonato amónico (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), amoniaco (25 % p/v) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) de Fluka (Viena, Austria) y ácido acético (Fisher Scientific, Madrid, España).
- Disolventes de grado HPLC para la preparación de fases móviles para cromatografía: metanol y acetonitrilo, ambos de Fisher Scientific.

- Disolución patrón de fósforo de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (Merck), a partir del cual se prepararon los diferentes patrones mediante dilución en HNO<sub>3</sub> al 2 % o agua ultrapura.
- Disolución patrón de oro de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (Merck).
- Disolución patrón de platino de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (Merck).
- Disolución patrón de selenio de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (Merck).
- Disolución patrón de cobre de 1000 mg L<sup>-1</sup> en HNO<sub>3</sub> al 2 % (SPEX CertiPrep, Metuchen, NJ, EE. UU.).
- Cisplatino (cis-diaminodichloroplatino (II)), de Sigma-Aldrich, disuelto diariamente en agua para obtener una disolución de 1 mg mL<sup>-1</sup>.
- Nanopartículas de oro estabilizadas con citrato de 10, 30 y 60 nm de diámetro (RM 8011, 8012 y 8013, respectivamente), utilizadas para la estimación de eficiencias de transporte y calibración de separaciones cromatográficas, del NIST (Gaithersburg, MD, EE. UU.).
- Nanopartículas de oro de 40 nm estabilizadas con citrato de Nanovex Biotechnologies S.L. (Llanera, España).
- Nanopartículas de oro de 30 nm recubiertas de polietilenglicol (PEG) modificado con grupos amino (Nanovex Biotechnologies).
- Nanopartículas de oro de 30 nm recubiertas de polietilenglicol (PEG) modificado con grupos carboxilo (Nanovex Biotechnologies).
- Nanopartículas de selenio de 50 nm de diámetro de Nanocs (NY, EE. UU.).
- Complejo de Tb-DTPA obtenido mediante incubación de ácido dietilenaminopentaacético (DTPA) y TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, ambos de Sigma-Aldrich.
- Medios de cultivo y suplementos para el cultivo celular: DMEM® (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) de LabClinics (Barcelona, España) y RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) de Gibco (Thermo Fisher Scientific)
- Tripsina-EDTA 10x de LabClinics (Barcelona, España). Suero fetal bovino de Invitrogen (Fisher Scientific) y plasmocin para evitar la contaminación por micoplasma de InvivoGen (San Diego, EE.UU.).
- Corning™ CellStripper Dissociation Reagent (Fisher Scientific).
- Disolución tampón de fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) de pH 7,4 (Fisher Scientific).



- Disolución tampón de TBS (*Tris buffered saline*) de Sigma-Aldrich, para la manipulación de células y la posterior medida de fósforo.
- Tinción Celltiter-blue® para ensayos de citotoxicidad de Promega (Madison, WY, EE. UU.).
- Tinción rojo neutro (neutral red, NR) para ensayos de citotoxicidad de Sigma-Aldrich.
- Formaldehído 4 % para la fijación celular de VWR Chemicals (Pensilvania, EE. UU.).
- Compuestos de selenio: L-selenometionina (97 %), selenito sódico ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , 97 %) y selenato sódico decahidratado ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) de Sigma Aldrich.
- Material de referencia certificado de levadura selenizada SELM-1, desarrollado por el NCCR (*National Research Council of Canada*, Ottawa, Canadá).
- Sulfito sódico de Sigma Aldrich.
- Microesferas fluorescentes para la calibración del contaje mediante citometría de flujo BD Trucount Tubes de BD Biosciences (NJ, EE. UU.).
- Perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro para la lisis de levaduras, de Sigma-Aldrich.
- Patrón interno de metabolitos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  extraídos de *Pichia pastoris* de ISOTopic solutions (Viena, Austria).
- Patrones de metabolitos obtenidos de Sigma-Aldrich y Carbosynth (Berkshire, Reino Unido).
- Reactivos para la preparación de la disolución de extracción de metabolitos de cultivos celulares: metanol, formiato amónico y N-etilmaleimida (NEM) de Sigma-Aldrich.
- Gases: Ar, O<sub>2</sub> y He (99,999 % de pureza) suministrados por Air Liquide (Madrid, España).

### 3.3. Muestras

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron diferentes tipos de muestras celulares, desde líneas celulares humanas hasta muestras de levaduras. Se detallan a continuación

los tipos de células utilizadas, así como los aspectos más importantes para su mantenimiento y manipulación.

En cuanto a líneas celulares humanas, se han utilizado 4 líneas diferentes a lo largo de la Tesis:

- Línea celular A-2780 de carcinoma de ovario.
- Línea celular A-2780cis, línea de carcinoma de ovario resistente a cisplatino, derivada de la anterior mediante exposición continuada al fármaco.
- Línea HT-29 de adenocarcinoma colorrectal.
- Línea Caco-2 de adenocarcinoma colorrectal.

La línea A-2780 fue proporcionada por el Dr. J. M. Pérez Freije (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo) y fue autenticada por la Unidad de Ensayos Biotecnológicos y Biomédicos de los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. La línea celular A2780cis se adquirió de la Colección Europea de Cultivos Celulares a través de Sigma-Aldrich. Las líneas celulares HT-29 y Caco-2, utilizadas en una estancia de investigación en la Universidad de Viena, fueron adquiridas de la ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, EE. UU.).

Las células A-2780 y A-2780cis se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 5 mg L<sup>-1</sup> de Plasmocin profiláctico. Las células HT-29 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina-estreptomina para evitar la contaminación. Para las células Caco-2 también se utilizó el mismo medio DMEM añadiendo como suplemento un 1 % de piruvato sódico y 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de transferrina. Todas las células crecieron en un incubador a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

De manera general, para los tratamientos con cisplatino, Tb-DTPA o nanopartículas, cada compuesto fue diluido en medio de cultivo fresco previamente a su utilización a la concentración requerida. Posteriormente, se añadió el medio de cultivo suplementado con el tratamiento al cultivo celular para conseguir un contacto

homogéneo entre el tratamiento y las células. En todos los casos se utilizaron también células control no sometidas al tratamiento.

Además, se utilizaron muestras de levaduras enriquecidas en selenio o levadura selenizada. Por un lado, se utilizó el material de referencia SELM-1, certificado en contenido de selenio total, metionina y selenometionina cuyos valores se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores certificados del material de referencia certificado de levadura enriquecida en selenio SELM-1.<sup>293</sup>

Analito	Valores certificados (mg kg <sup>-1</sup> )
Selenio Total	2059 ± 64
Selenometionina	3431 ± 157
Metionina	5758 ± 277

El resto de las muestras de levaduras selenizadas utilizadas en esta Tesis fueron obtenidas a partir de un cultivo inicial de *Saccharomyces cerevisiae*. Para el cultivo se utilizó un matraz cerrado con un tapón de espuma estéril y un incubador a 28 °C con agitación orbital (120 rpm). En el tercer día de crecimiento, diferentes cultivos se inocularon con 25 ppm de selenito sódico (muestra a la que nos referiremos como Se-levadura1) o 25 ppm de selenato sódico (Se-levadura2). Además, se mantuvo un cultivo control no tratado con ninguna fuente de selenio (Levadura1). En el día 7 de cultivo en estas mismas condiciones, las células de levadura se recogieron mediante centrifugación, se lavaron dos veces con agua ultrapura y se congelaron a -80 °C. Finalmente, se liofilizaron para su conservación hasta su análisis. Todas las muestras de levaduras fueron proporcionadas por el Dr. Z. Mester (*National Research Council of Canada*).

También se utilizaron dos ratas Wistar adultas (peso de 180-200 g) obtenidas de Charles River Laboratories (L'Arbresle, Francia) para estudiar la degradación de nanopartículas de oro en tejidos tras su inyección intraperitoneal. La manipulación, tratamiento y extracción de muestras de los animales fueron realizados en colaboración con los doctores C. López Chaves, C. Sánchez González y J. Llopis, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada. Por último, se analizaron muestras de esporas de la bacteria *Sptreptomyces coelicolor* proporcionadas por el Dr. A. Manteca (Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo).

## 3.4. Procedimientos Experimentales

Se describen a continuación los procedimientos experimentales más relevantes para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

### 3.4.1. Digestión ácida de muestras de cultivos celulares

Para la medida de incorporación de Tb-DTPA de manera global las células fueron sometidas a una digestión ácida. Para ello, tras su tratamiento y lavado en la superficie de cultivo, se recogieron mediante tripsinización en una suspensión de PBS. Dado que la concentración final de Tb de los análisis debe ser normalizada al número de células para su comparación con los resultados obtenidos a nivel de célula individual, en este punto se contaron las células mediante citometría de flujo. Se utilizó la citometría de flujo en lugar de un hemocitómetro convencional para realizar el conteo de la manera más exacta posible. Tras este paso, se liofilizaron las células. A continuación, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  al 65 % purificado mediante destilación *sub-boiling* al pellet celular obtenido y se calentó la mezcla en un baño de agua a 70  $^\circ\text{C}$ . Tras 1 h, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % y se mantuvo la mezcla a la misma temperatura durante 3 h más. Finalmente, las disoluciones obtenidas tras la digestión se diluyeron 1:10 con agua Milli-Q para su análisis mediante ICP-MS.

### 3.4.2. Lisis de levaduras

Como se comentó en la introducción, las células de levadura presentan una pared celular aparte de la membrana que les confieren su gran rigidez y resistencia mecánica. Para romper su envoltura celular sin afectar a posibles nanopartículas en el interior de la célula no se pueden utilizar digestiones ácidas. Su rigidez tampoco permite la utilización de métodos menos agresivos como ciclos de congelación/descongelación. Por ello, se utilizan normalmente largas digestiones enzimáticas que rompen la membrana celular.<sup>298</sup> En esta Tesis Doctoral se propone un método mecánico rápido basado en el uso de perlas de vidrio de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro. Para ello, se mezclaron las perlas de vidrio (850 mg

aproximadamente) con 1 mL de la suspensión de células de levadura lavada previamente mediante centrifugación. Esta mezcla se sometió a un baño de ultrasonidos durante 10 min y, posteriormente, se agitó en el vórtex a máxima velocidad durante 5 min. Ambos pasos se repitieron nuevamente para aumentar la eficiencia de la lisis celular. Finalmente, la mezcla obtenida se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar las perlas de vidrio y posibles restos celulares. La suspensión obtenida se diluyó adecuadamente para su análisis mediante SP-ICP-MS y HPLC-ICP-MS.

### 3.4.3. Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas de oro en cultivos celulares se utilizaron dos ensayos diferentes que permiten evaluar la viabilidad celular después del tratamiento mediante diferentes mecanismos. El primero de ellos conocido como *Alamar Blue* (AB) se basa en el uso de la resazurina y permite evaluar la viabilidad celular utilizando el poder reductor de las células viables. El segundo ensayo utilizado es el ensayo de captación de rojo neutro (*Neutral Red*, NR), colorante incorporado solamente por las células viables mediante transporte activo.

Para llevar a cabo ambos ensayos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, donde se llevaron a cabo los tratamientos pertinentes. Para el ensayo AB se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 120  $\mu\text{L}$  a cada pocillo del colorante, preparado previamente mediante una dilución 1:10 del reactivo Celltiter-blue® con medio de cultivo DMEM sin indicador de pH (rojo fenol) ni suplementación con suero fetal bovino. Tras dos horas de incubación del colorante con las células a 37 °C se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  de cada pocillo a una nueva placa negra de 96 pocillos y se midió la fluorescencia en un lector de placa utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 560 nm, respectivamente.

Para el ensayo del rojo neutro, el colorante se preparó mediante una dilución 1:100 de una disolución de 40 mg mL<sup>-1</sup> del reactivo NR en medio de cultivo. La mezcla se incubó durante una noche a 37 °C y, posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 600 g para eliminar el colorante precipitado. Tras el tratamiento de las células, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del colorante por pocillo. Tras una incubación de

3 h, se eliminó la disolución del colorante y se lavó cada pocillo con 150  $\mu\text{L}$  de PBS. Finalmente, se añadió 150  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de una disolución de desteñido (50:50:1 etanol absoluto, agua destilada, ácido acético glacial) y se sometió la placa a agitación orbital durante 10 min a 500 rpm. Para la medida, se transfirieron 130  $\mu\text{L}$  de la solución de desteñido a una nueva placa de 96 pocillos para la medida de la absorbancia a 540 nm en un lector de placas.

### 3.4.4. Extracción de metabolitos de cultivos celulares

Para los estudios de metabolómica, se sembraron las células (HT-29 y Caco-2) en placas de 12 pocillos. Después de los tratamientos con nanopartículas de oro de diferentes recubrimientos (PEG-NH<sub>2</sub> y PEG-COOH) y el cultivo de células control por triplicado, se aspiró el medio de cultivo y se lavó cada pocillo tres veces con 1 mL de PBS. Como el metaboloma celular es un sistema muy dinámico, el tratamiento de muestras en metabolómica debe incorporar un paso de parada de las reacciones metabólicas para conseguir una representación real de metabolitos en el tiempo de muestreo. Por ello, se decidió para el metabolismo celular en todos los pocillos simultáneamente mediante la adición directa de nitrógeno líquido a los pocillos de la placa. Las placas se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

Para la extracción de metabolitos, con la placa en baño de hielo, se añadió primeramente 20  $\mu\text{L}$  del patrón interno de metabolitos enriquecidos en <sup>13</sup>C, previamente reconstituido con la disolución de extracción. Este consiste en un extracto de dos billones de células de *Pichia pastoris* crecidas con <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucosa como única fuente de carbono. Posteriormente, se añadieron 180  $\mu\text{L}$  por pocillo de la disolución de extracción que consiste en 80 % metanol, 20 % 10 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 25 mmol L<sup>-1</sup> NEM pH 7. La adición de NEM a esta disolución permite la protección de los intermediarios de la ruta del azufre,<sup>304</sup> como el glutatión, mediante la reacción que se esquematiza en la Figura 26. Para la extracción de metabolitos se rasparon las células con un raspador y el contenido de cada pocillo se transfirió a un tubo Eppendorf. Finalmente, se centrifugaron las muestras (20000 g, 5 min, 4 °C) obteniendo dos fases. En el sobrenadante se encuentra el extracto del metaboloma celular. De este se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  que se conservaron a -80

°C hasta su análisis mediante HILIC-HR-MS. El volumen restante de los sobrenadantes de las diferentes muestras se juntó en un mismo vial, que se utilizó como control de calidad (QC) para su inyección entre diferentes muestras.

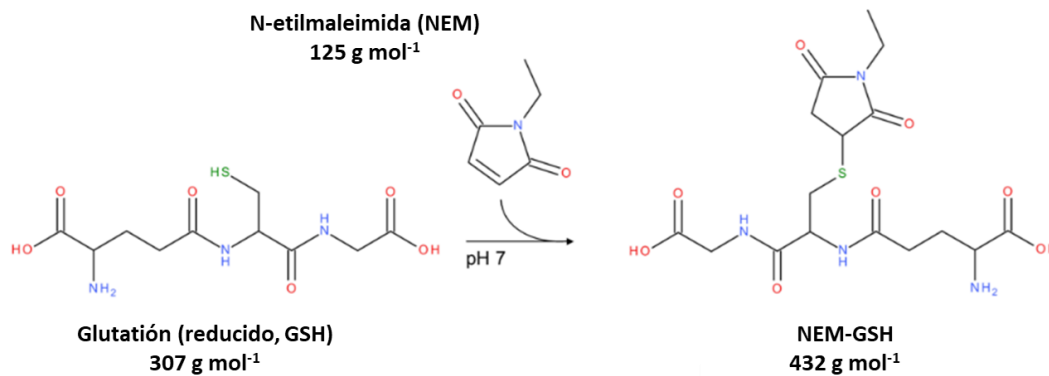


Figura 26. Ejemplo de derivatización de grupos tiol con N-etilmaleimida (NEM) con el glutatión. Adaptado de Ortmayr y colaboradores.<sup>304</sup>





---

## ***4. Resultados y Discusión***

---



## **4.1. Desarrollo y caracterización de un método basado en nebulización neumática para la introducción de células individuales al ICP-MS**

Una de las estrategias más comunes para la determinación del contenido intracelular de un elemento es su determinación en un lisado celular mediante ICP-MS. Como se explicó en la introducción, esta estrategia es útil para obtener una información promedio del contenido del elemento en la población celular. Sin embargo, la heterogeneidad de las poblaciones biológicas, que se produce incluso en células isogénicas y sincronizadas, hace necesario el desarrollo de métodos que permitan la determinación del elemento en cada célula individual. En el análisis de células individuales mediante ICP-MS, especialmente para muestras en las que el número de células es limitado, la eficiencia de transporte de los sistemas de introducción de muestra convencionales no es suficiente (incluso por debajo del 1 %). Por ello, el desarrollo de sistemas que permitan la introducción de células individuales integras al plasma con alta eficiencia es de gran interés.

En la presente Tesis Doctoral se abordó el análisis de células individuales con detección mediante ICP-MS mediante el uso de un sistema de introducción de muestra basado en un nebulizador neumático de microflujos y un cámara de nebulización cilíndrica de pequeño volumen, que se describirán más adelante. El sistema se optimizó y evaluó con nanopartículas de oro certificadas y con células de cáncer de ovario de la línea A2780 de tres formas diferentes: monitorizando Fe como elemento constitutivo; mediante un complejo de Tb incorporado por las células como elemento no constitutivo y no tóxico y, finalmente, utilizando el metalofármaco cisplatino, no constitutivo y citotóxico. Para ello, se utilizó un ICP-MS de tipo cuadrupolo (Agilent 7700).

Además, se propone la combinación de las medidas de ICP-MS con el conteo celular obtenido mediante citometría de flujo, para obtener de forma precisa el número de células en las suspensiones celulares introducidas al plasma y, así, la eficiencia de transporte.

Finalmente, el sistema caracterizado se aplicó a la cuantificación de la incorporación de platino en líneas celulares de cáncer de ovario que son sensibles (A2780) y resistentes (A2780cis) al fármaco, con el objetivo de obtener datos relevantes en quimioterapia del cáncer. Asimismo, se utilizó para el análisis de otro tipo de células como son las esporas de la bacteria *Streptomyces coelicolor*, para investigar su contenido en cobre.

#### 4.1.1. Sistema de Introducción de muestra y condiciones experimentales

En este capítulo, se utilizó un sistema de introducción de muestras líquidas desarrollado en el laboratorio. Este se basa en el nebulizador neumático de microflujos Enya Mist (Burgener, Ontario, Canadá) y una cámara de nebulización de paso simple de pequeño volumen (10 mL). En la Figura 27 se puede ver una imagen del sistema de introducción de muestras completo (Figura 27(a)), así como un esquema del nebulizador Enya Mist (Figura 27(b)). Se eligió este nebulizador esperando aumentar la eficiencia de transporte de los nebulizadores neumáticos convencionales y también una reducción en el consumo de muestra. Para la introducción tanto de las suspensiones celulares como de otras disoluciones de limpieza o calibración se utilizó una bomba de jeringa operada a un bajo flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  y equipada con una jeringa Hamilton de 1 mL.

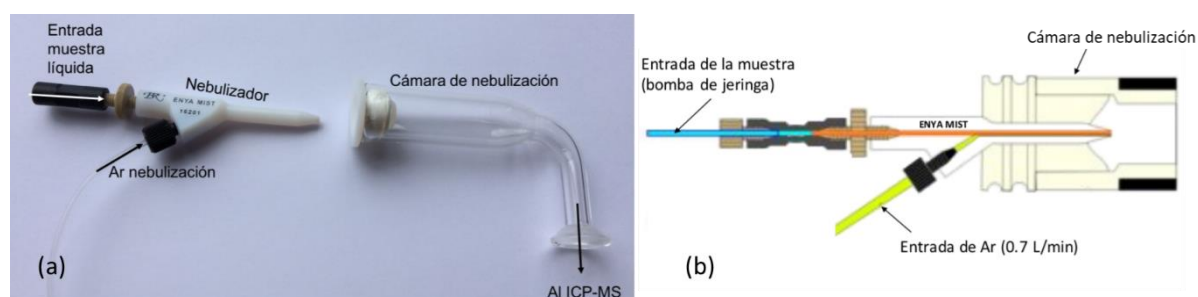


Figura 27. (a) Fotografía del nebulizador Enya Mist y la cámara de nebulización. (b) Representación esquemática del nebulizador Enya Mist.

Todas las medidas de ICP-MS se realizaron en el equipo Agilent 7700 operado en las condiciones recogidas en la Tabla 2. Este equipo permite disminuir el tiempo de integración o *dwell time* a un mínimo de 10 ms, que fue el utilizado para los análisis de

células individuales. Como la duración de un evento celular típico es de 100-500  $\mu\text{s}$ , en estas condiciones, cada evento celular será registrado mediante únicamente un punto de medida. Además, cada muestra se analizó durante un tiempo de adquisición de 180 s y solo se monitorizó un isótopo en cada medida debido a medida secuencial típica de un analizador de tipo cuadrupolo.

*Tabla 2. Parámetros instrumentales de las medidas realizadas en el ICP-MS Agilent 7700.*

Equipo	Agilent 7700 (Agilent Technologies)
Potencia de radiofrecuencia	1500 W
Flujo gas refrigerante	15,5 L $\text{min}^{-1}$
Flujo gas portador	0,92 L $\text{min}^{-1}$
Flujo gas auxiliar	0,87 L $\text{min}^{-1}$
Tiempo de integración	10 ms

Para el tratamiento de datos se siguió un procedimiento iterativo basado en realizar un promedio de la señal de todos los datos y filtrar aquellos cuya intensidad es mayor que 3 veces la desviación estándar sobre la media del conjunto de datos ( $3\sigma$ ), considerados como eventos celulares. Tras filtrar estos eventos, se vuelve a promediar el conjunto de datos restante y el procedimiento se repite hasta que no se obtengan más datos por encima de  $3\sigma$  sobre la media. Finalmente, todos los eventos filtrados mayores que  $3\sigma$  su propia desviación estándar se descartan también para evitar la cuantificación de eventos causados por dos o más células entrando al sistema simultáneamente. Este tipo de procedimiento para el reconocimiento de eventos celulares se utilizará a lo largo de los diferentes capítulos de la Tesis Doctoral.

#### **4.1.2. Optimización del sistema de introducción de muestra**

El fabricante del nebulizador recomienda la adición de pequeñas cantidades de un disolvente orgánico para mejorar la formación del aerosol. Se decidió utilizar metanol para este fin. La concentración de metanol utilizada se optimizó mediante la medida de

nanopartículas de oro de 30 nm (RM 8012, NIST) en modo SP-ICP-MS. Para ello, estas nanopartículas se diluyeron a una concentración de oro total de 50 ng L<sup>-1</sup> en agua con concentraciones de metanol desde 0 hasta 15 % (v/v). Las suspensiones resultantes fueron introducidas al sistema de introducción de muestra descrito mediante una bomba de jeringa a 10 μL min<sup>-1</sup>.

En la Figura 28(a) se muestra un ejemplo de los eventos obtenidos mediante la monitorización de <sup>197</sup>Au con un tiempo de integración de 10 ms, en este caso, para una suspensión de nanopartículas de oro en metanol al 10 %. Para seleccionar la concentración óptima de metanol se evaluaron la sensibilidad de la detección y la eficiencia de transporte obtenidas en cada suspensión. La sensibilidad se determinó mediante la intensidad de los eventos producidos por las nanopartículas individuales. Para la eficiencia de transporte se utilizó el método desarrollado por Pace y colaboradores<sup>164</sup> basado en el uso de suspensiones de nanopartículas de concentración conocida. El uso de nanopartículas certificadas del NIST permite la aplicación de este método considerando como valor real de la concentración y tamaño de las nanopartículas el indicado por el material de referencia. Tras contar el número de eventos obtenidos con el método iterativo 3σ explicado, la eficiencia de transporte se calcula mediante la ecuación (4) explicada en el apartado 1.2.4, dividiendo el número de eventos detectados en la medida de ICP-MS entre el número de partículas introducidas, que depende del número de nanopartículas en la muestra y el flujo de introducción de muestra.

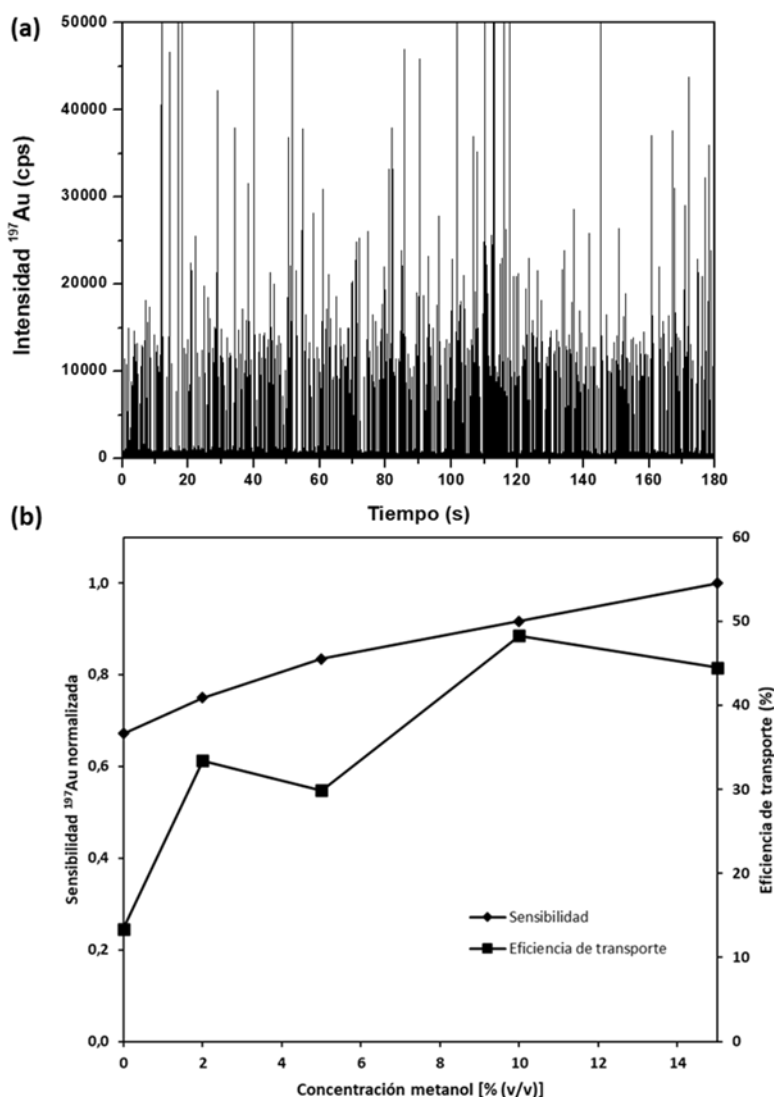


Figura 28. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de una suspensión de nanopartículas de oro de 30 nm en 10 % metanol y (b) influencia de la concentración de metanol en la sensibilidad y la eficiencia del transporte.

El uso de suspensiones de nanopartículas directamente en agua resultó en la formación de un aerosol relativamente inestable con una eficiencia de transporte y sensibilidad significativamente más bajas. La máxima eficiencia de transporte se consiguió para un 10 % de metanol, como se puede apreciar en la Figura 28(b). Concentraciones más altas de metanol resultaron en una mayor sensibilidad de los eventos obtenidos para nanopartículas individuales. Sin embargo, para prevenir la deposición de carbono en los conos de la interfase, se decidió utilizar un 10 % de metanol para los siguientes estudios. En estas condiciones, la eficiencia de transporte fue de un 48,3 %.

Los primeros experimentos celulares se llevaron a cabo utilizando la línea celular de cáncer de ovario A2780 incubada con un complejo de terbio con el ácido dietilentriaminopentaacético (Tb-DTPA). Este complejo se sintetizó mezclando DTPA y  $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e incubando la mezcla equimolar a 37 °C durante 2 h para obtener una disolución de una concentración de 20  $\text{mmol L}^{-1}$  del complejo, cuya estructura se puede apreciar en la Figura 29. Este complejo se utilizó para comprobar la posibilidad de utilizar el sistema de introducción de muestras de consumo total explicado para detectar eventos de células individuales, ya que se sabe que tiene la capacidad de penetrar en las células sin causar una toxicidad significativa.<sup>305</sup> Además, el Tb puede ser detectado fácilmente en ICP-MS y sin ningún problema de fondos en muestras celulares. Por otro lado, las células de cáncer de ovario de la línea A2780 son células eucariotas de un diámetro medio de 5,6  $\mu\text{m}$ , adecuadas para la optimización del sistema.

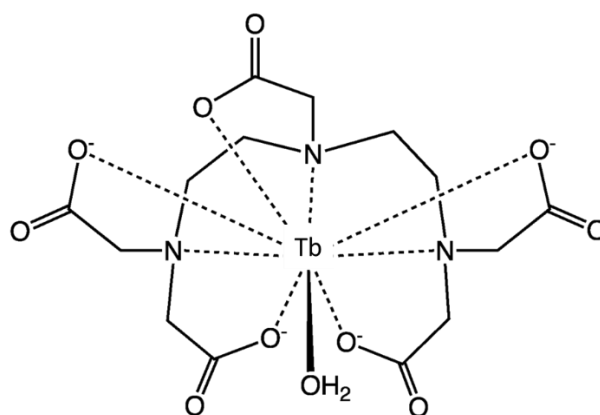
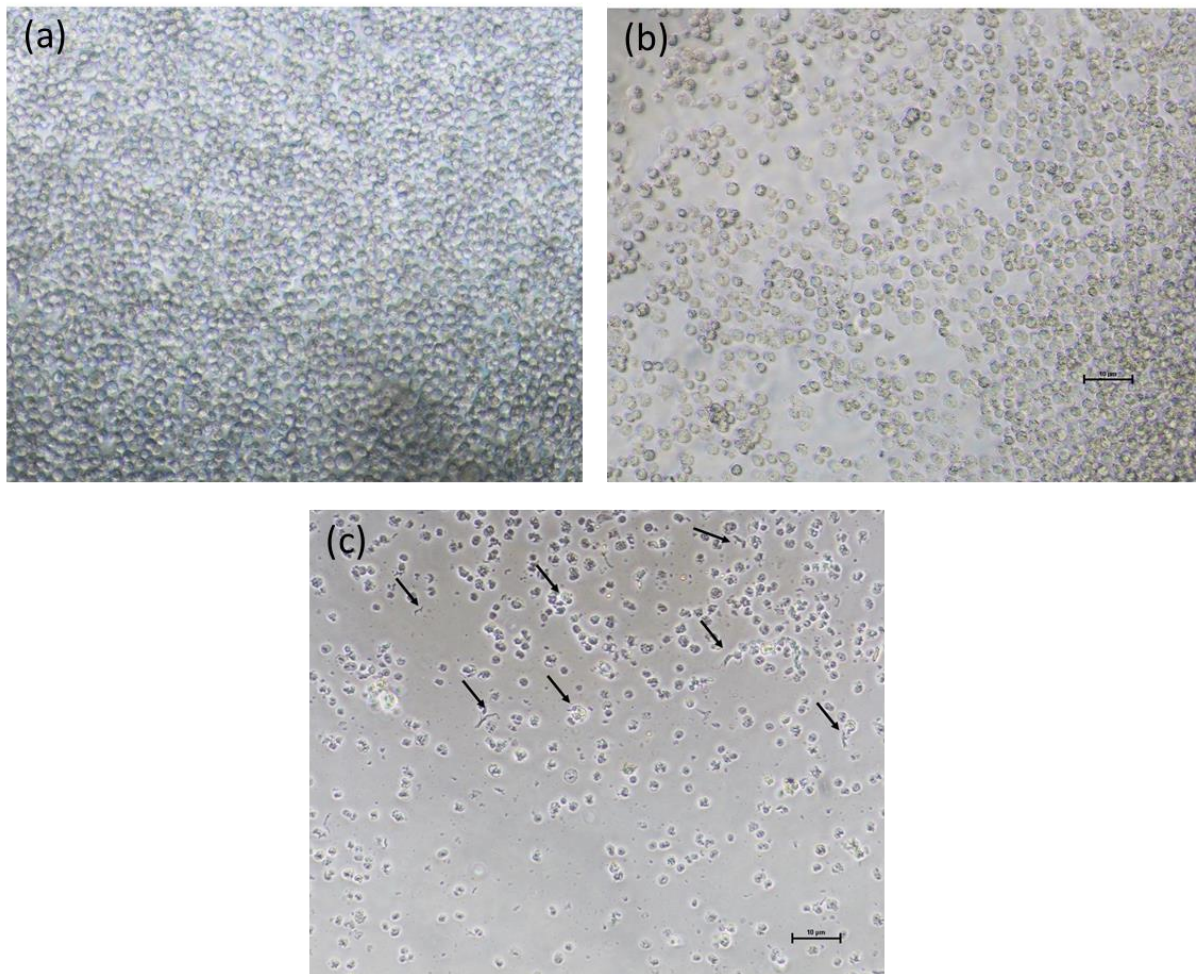


Figura 29. Estructura del complejo Tb-DTPA.

Las células se trataron mediante dilución del complejo directamente en medio de cultivo a una concentración de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Tras 24 h de incubación en este medio, las células se recogieron mediante tripsinización y se diluyeron, justo antes del análisis, en metanol al 10 %. Para el análisis de células individuales mediante ICP-MS se requiere que las células se mantengan monodispersas en suspensión y, además, que mantengan su integridad celular. Para la evaluación de la estabilidad celular, se realizaron imágenes en un microscopio óptico de las células A2780 en PBS, tras un corto periodo en metanol al 10 % y tras ser nebulizadas directamente sobre un portaobjetos de vidrio en las mismas condiciones que se utilizarán para la medida, lo que implica la utilización del nebulizador Enya Mist para nebulizar una suspensión de células A2780 en metanol al 10 %



transportada al nebulizador a un flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . En comparación con las células en PBS (Figura 30(a)), el contacto de las células con metanol al 10 % durante un corto periodo de tiempo ( $< 30 \text{ min}$ ) no parece afectar a la morfología celular (Figura 30(b)). Tras pasar el nebulizador, se observó la ruptura de alguna célula (señaladas con flechas en la Figura 30(c)), pero la gran mayoría de las células permanecieron intactas y monodispersas, por lo que entraría al plasma sin ser afectadas por la nebulización.



*Figura 30. Imágenes de microscopio óptico de células A2780 (a) en PBS, (b) en 10 % de metanol, y (c) tras pasar ser nebulizadas por el nebulizador Enya Mist diluidas en 10 % metanol. Las células fueron observadas con el microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes obtenidas mediante la cámara Nikon DS-Fi1. Las barras de escala son de  $10 \mu\text{m}$ .*

Por otro lado, se debe minimizar la posibilidad de que lleguen dos o más células simultáneamente al nebulizador, generando una única nube iónica y siendo detectadas como una sola célula. La estrategia más común de prevenir esta situación es el uso de suspensiones muy diluidas de nanopartículas o células, en este caso. Por ello, se optimizó la concentración de células en la suspensión para obtener un número de eventos

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

estadísticamente significativo durante un tiempo de adquisición de 180 s y un flujo de introducción de muestra de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ , minimizando los eventos múltiples causados por dos o más células. La concentración de células debe ser lo suficientemente baja para que la mayoría de las gotas formadas en la nebulización no contengan ninguna célula y la probabilidad de encontrar dos o más una célula en una gota sea despreciable.

La optimización se realizó mediante la introducción y medida de suspensiones celulares de células A2780 tratadas con Tb-DTPA en diferentes concentraciones celulares. El tratamiento de las células se realizó como se describió en la sección 3.3, utilizando una concentración del complejo de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  durante 24 h. Tras el lavado y recogida de las células, estas se contaron, en este caso, con un hemocitómetro y se diluyeron en metanol al 10 % a cuatro concentraciones diferentes entre  $2,5 \times 10^4$  y  $3 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  para su introducción en el sistema SC-ICP-MS.

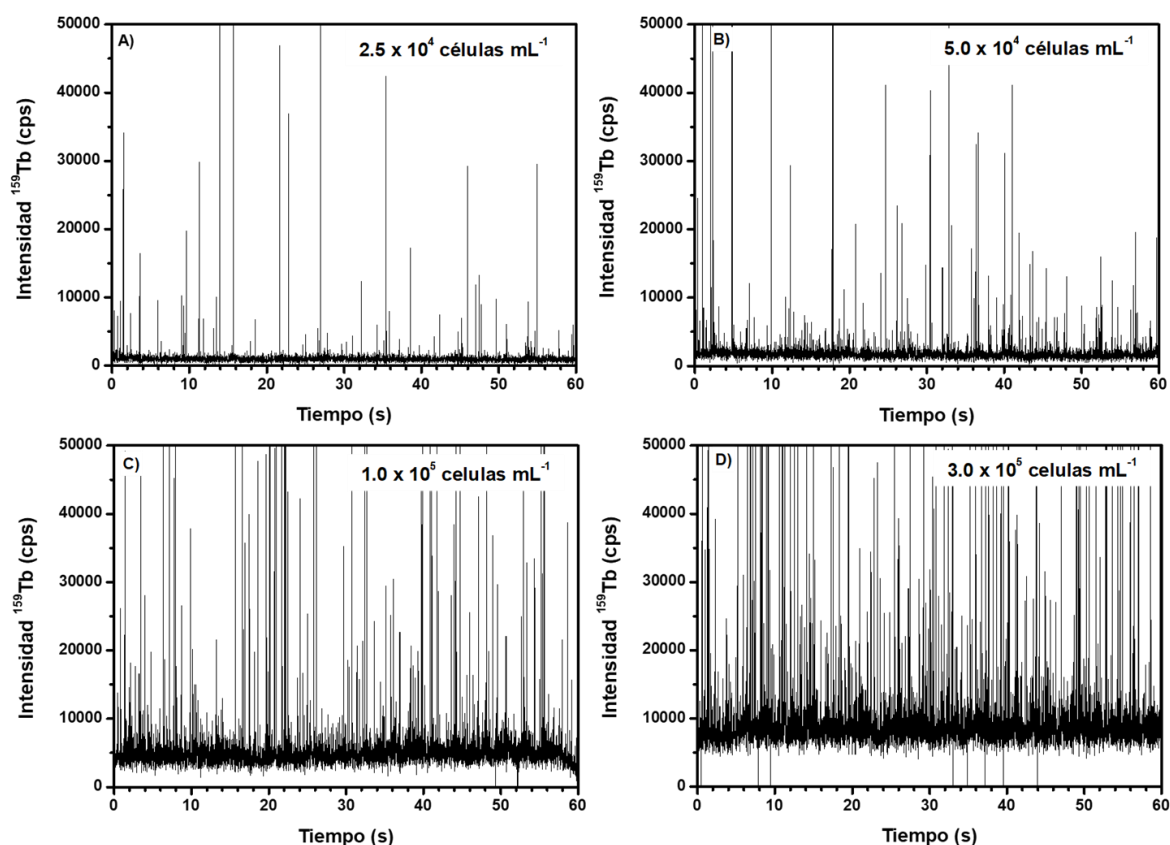


Figura 31. Resultados de la medida de  $^{159}\text{Tb}$  mediante SC-ICP-MS para diferentes concentraciones de células A2780 tratadas con  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Tb-DTPA: (a)  $2,5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , (b)  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , (c)  $1,0 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  y (d)  $3,0 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Como se puede apreciar en la Figura 31, un aumento en el número de células introducidas se traduce en un aumento del número de eventos detectados en ICP-MS. Además, los eventos se pueden distinguir claramente de la señal del fondo, al que contribuyen las especies disueltas de Tb que no hayan sido incorporadas por las células y que hayan soportado los diferentes lavados, incluso para bajas concentraciones celulares. Por lo tanto, cada célula ionizada en el plasma produjo una nube de iones suficientemente grande para dar lugar a una señal detectable utilizando el ICP-MS con un tiempo de integración de 10 ms. A pesar de que la duración de un evento celular es normalmente de 0,2-0,5 ms, un tiempo de integración de 10 ms está dentro del rango óptimo de resolución temporal utilizando sistemas de introducción de muestra similares.<sup>63</sup> Además, al incrementar la concentración celular, aumentó el número de señales muy intensas (>500000 cps), probablemente debido a la introducción de múltiples células en una misma ventana de integración.

Como se explicó en la introducción, y adaptando los términos del análisis de nanopartículas individuales (SP-ICP-MS) al análisis de células individuales (SC-ICP-MS), la frecuencia de eventos detectados,  $f(N_d)$  (número de eventos por segundo), depende directamente de la concentración celular ( $N_c$ ), el flujo de introducción de muestra ( $F$ ) y la eficiencia de transporte ( $\eta$ ).

$$\eta = \frac{f(N_d)}{F \cdot N_c} \quad (5)$$

Por lo tanto, como se puede ver en la ecuación (5), la eficiencia de transporte es proporcional a la relación  $f(N_d)/N_c$ , por lo que al aumentar el número de células en la muestra, el número de eventos detectados aumenta proporcionalmente siempre que los eventos producidos por múltiples células sean despreciables. A partir de cierta concentración celular, esta premisa se deja de cumplir y se empiezan a observar eventos múltiples que provocan que el aumento de eventos detectados deje de ser proporcional al número de células introducidas, disminuyendo la relación  $f(N_d)/N_c$ . Por ello, la mayor eficiencia de transporte alcanzable y la mayor concentración celular que se puede introducir en el sistema de introducción de muestras utilizados se obtendrá en el límite

donde la detección de eventos múltiples deje de ser despreciable. Para obtener el valor de este límite, se representó  $\eta$  frente a  $N_c$ .

Para obtener este gráfico, se introdujeron al sistema SC-ICP-MS diferentes diluciones de células A2780. Sin embargo, en este caso se precisa de un conteo celular más preciso que el obtenido con un hemocitómetro convencional. Por ello, en esta ocasión se utilizó la citometría de flujo para el conteo celular. El citómetro de flujo se calibró mediante las partículas fluorescentes BD Trucount y siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas partículas, certificadas en número de partículas por tubo, se mezclan con un volumen conocido de la suspensión celular y la mezcla resultante se agita en el vórtex para resuspender las partículas y reducir la agregación celular, previamente a su introducción al citómetro de flujo. Este es capaz de distinguir entre las células y las partículas, por su fluorescencia. Tras el conteo de un determinado número de partículas a su paso de forma individual por el láser del equipo, el citómetro de flujo calcula el número de células en la mezcla introducida teniendo en cuenta el número de células detectadas y el número de partículas detectadas y de partida. En la Figura 32 se muestran un ejemplo del conteo celular mediante citometría de flujo. El eje horizontal (FL1 Log en la Figura) representa, en escala logarítmica, la fluorescencia emitida por las células/partículas a 525 nm (verde). El eje vertical (SS Lin) representa la radiación del láser dispersada tras su interacción con partículas o células, en el último caso, proporcional a su granulosidad. La población de partículas (A) se distingue perfectamente de las células (B) ya que aparecen a valores más altos de fluorescencia. Por otro lado, la población de las células es mucho más heterogénea debido a una mayor dispersión de granulosidad y tamaños que las partículas de conteo.

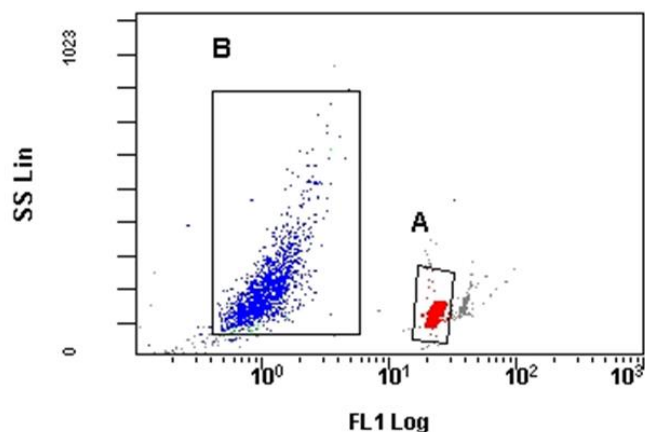


Figura 32. Análisis por citometría de flujo de la mezcla entre partículas fluorescentes (A) y células A2780 (B).

Se contaron células de la línea A2780 tratadas y sin tratar con Tb-DTPA para la introducción de suspensiones celulares de diferente concentración celular y la monitorización de <sup>159</sup>Tb como marcador celular y <sup>56</sup>Fe como elemento constitutivo celular, respectivamente. Un ejemplo de los eventos de ambos elementos obtenidos para una suspensión de 5x10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, así como los correspondientes histogramas de la señal, se pueden ver en la Figura 33.

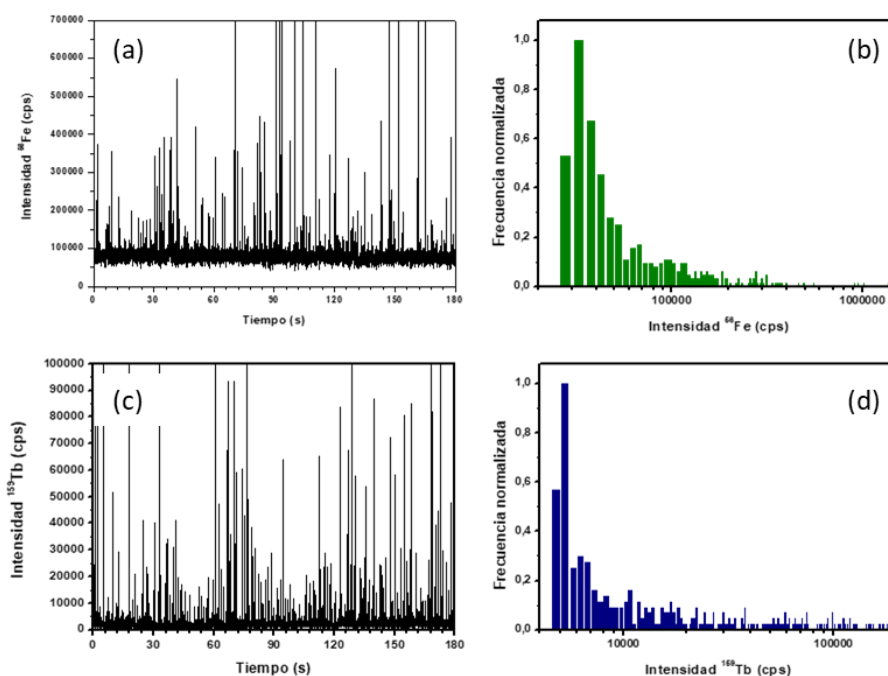


Figura 33. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de una suspensión de 5x10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup> monitorizando (a) <sup>56</sup>Fe, (c) <sup>159</sup>Tb y los correspondientes histogramas de la distribución de la intensidad de las señales de (b) <sup>56</sup>Fe y (d) <sup>159</sup>Tb.

Así, se pudo calcular la eficiencia de transporte mediante la relación entre los eventos detectados para ambos elementos en 180 s de medida a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  y el número de células en  $30 \mu\text{L}$  de la suspensión, contadas previamente mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran tanto en la Figura 34 como en la Tabla 3. El número de eventos detectados en 180 s aumentó con la concentración celular de 117 a 672 para el Tb y de 95 a 456 para el Fe. En condiciones óptimas, se obtuvo un máximo de eficiencia de transporte del 25 % para los dos elementos para  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . El uso de mayores concentraciones celulares puede dar lugar a la superposición de señales de múltiples células que provoca una disminución en la eficiencia de transporte. La eficiencia del 25 % obtenida es significativamente mayor que la obtenida con otros sistemas de introducción de muestra, menores del 10 %.<sup>60,63</sup>

Tabla 3. Comparación de la eficiencia de transporte de células para la medida de  $^{56}\text{Fe}$  como elemento constitutivo y  $^{159}\text{Tb}$  como marcador celular.

Células $\text{mL}^{-1}$	$^{56}\text{Fe}$ (elemento constitutivo)		
	Frecuencia eventos (Hz)	Eventos en 180 s	Eficiencia de transporte (%)
25000	0,53	95	12,7
50000	2,08	375	25,0
100000	2,1	378	12,6
300000	2,53	456	5,1
$^{159}\text{Tb}$ (marcador celular)			
25000	0,65	117	15,6
50000	2,06	371	24,7
100000	2,87	517	17,2
300000	3,73	672	7,5

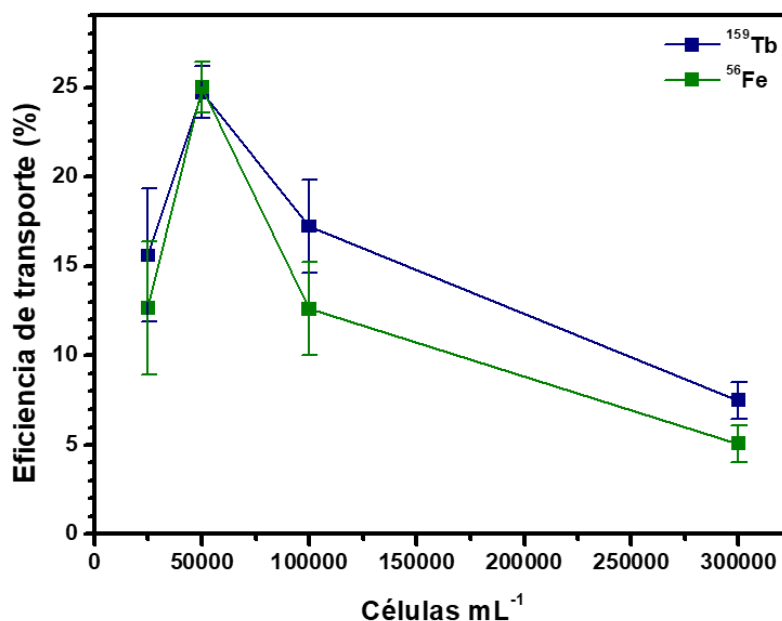


Figura 34. Representación gráfica de la eficiencia de transporte frente la concentración celular de la suspensión introducida.

### 4.1.3. Validación del método desarrollado

Como el objetivo final de este capítulo es la determinación elemental cuantitativa en células individuales, se evaluó el cambio en la altura o intensidad de los eventos obtenidos con respecto a la concentración del complejo de Tb-DTPA utilizada en el tratamiento de las células. Para ello, se midieron suspensiones celulares de la línea A2780 de la misma concentración celular ( $6 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>) tratadas previamente con 10 y 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Tb-DTPA.

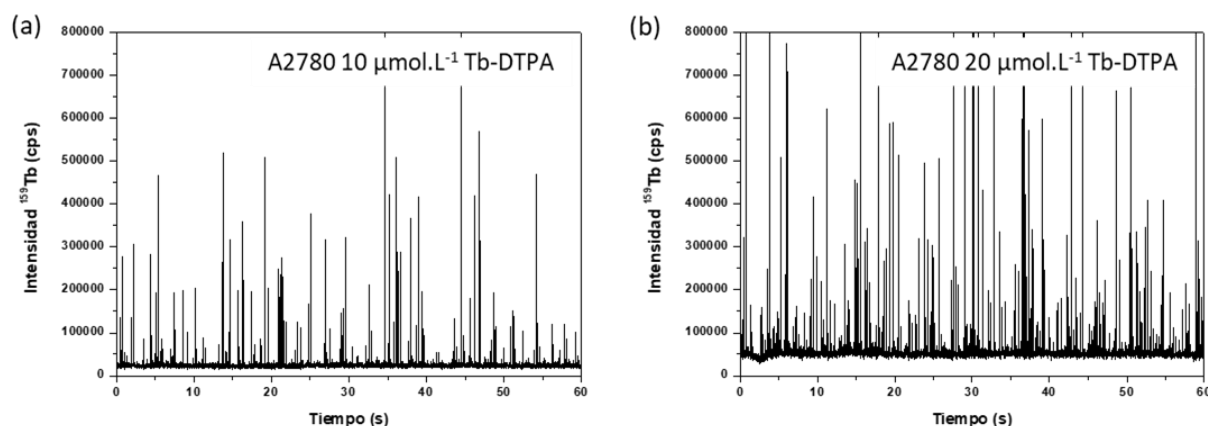


Figura 35. Resultados de la medida de <sup>159</sup>Tb mediante SC-ICP-MS de células A2780 tratadas con (a) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y (b) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Tb-DTPA.

En la Figura 35 se puede ver como el aumento de la altura de los eventos está relacionada con la dosis de Tb-DTPA utilizada para el tratamiento de las células. Esta relación no es lineal lo que no es sorprendente ya que a diferentes dosis del complejo se pueden activar diferentes mecanismos de incorporación celular. El siguiente paso consistió en evaluar la aplicabilidad del método para determinar el contenido de Tb en cada célula individual. Para ello, se realizó un calibrado externo utilizando patrones inorgánicos de Tb, preparados a partir de una disolución de Tb de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , que se midieron en las mismas condiciones que las células (dilución en metanol al 10 %, introducidos a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  utilizando el mismo sistema de introducción de muestra con un tiempo de integración de 10 ms). La intensidad obtenida en los 180 s de medida se promedió y el promedio obtenido para la medida de los diferentes patrones se representó frente a la masa de Tb de los mismos. Así, la masa de Tb de en cada célula individual se calculó mediante la ecuación (2), explicada en la sección 1.2.4, que se expone de nuevo a continuación:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \quad (2)$$

Como se explicó, el término  $\eta$  representa aquí la eficiencia de transporte de los patrones inorgánicos. Esta es diferente a la eficiencia de transporte de las suspensiones celulares, que suele ser menor por su mayor tamaño y su superficie que pueden provocar la adsorción y deposición de las células en los capilares utilizados para su transporte y en las paredes de la cámara tras su nebulización. Por ello, la eficiencia de transporte de los patrones inorgánicos se estimó mediante el material de referencia certificado RM 8012 (NIST) de nanopartículas de oro de 30 nm, método propuesto por Pace y colaboradores.<sup>164</sup> Como se comprobó anteriormente, en la optimización de la concentración de metanol a utilizar, esta eficiencia resultó ser de alrededor del 48 %, valor mucho mayor al obtenido para las células (entre 5 y 25 %).

Estos cálculos se utilizaron para la cuantificación de Tb en células A2780 individuales tratadas con una concentración del complejo de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Tras la cuantificación de Tb en una muestra de 81 eventos, se obtuvo una masa de Tb promedio de  $2,9 \pm 0,8 \text{ fg}$  por célula.



Para validar el método desarrollado, se realizaron medidas de manera global en una muestra células tratadas con la misma concentración del complejo de Tb. En este caso, tras el tratamiento y recogida de las células, estas se sometieron a una digestión ácida, como se detalló en el apartado 3.4.1. Brevemente, las células fueron contadas mediante citometría de flujo y, posteriormente liofilizadas. El pellet celular resultante se digirió mediante una incubación con HNO<sub>3</sub> concentrado y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante un tiempo total de 4 h a 70 °C. La solución obtenida se diluyó 1:10 con agua Milli-Q para la medida de <sup>159</sup>Tb mediante ICP-MS.

En este caso, el análisis se realizó mediante un sistema de inyección en flujo (*flow injection analysis*, FIA). Para ello, se utilizó una bomba peristáltica para impulsar un flujo portador de HNO<sub>3</sub> al 2 % a un flujo de aproximadamente 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Las muestras se inyectaron en el sistema FIA-ICP-MS mediante una válvula de seis vías de Rheodyne con un bucle de inyección de 20 µL. Para la calibración del sistema se construyó una curva de calibrado con patrones de Tb de entre 0,5 y 2 ng g<sup>-1</sup>, preparados mediante dilución en HNO<sub>3</sub> al 2 % a partir de una disolución de Tb de 1000 mg L<sup>-1</sup>.

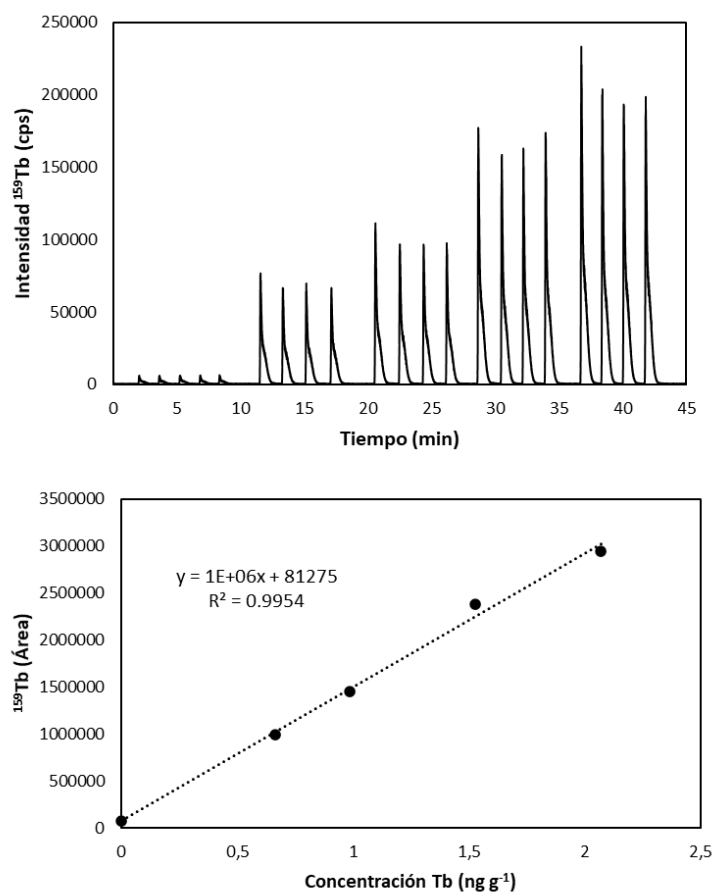


Figura 36. (a) Medida de  $^{159}\text{Tb}$  mediante FIA-ICP-MS y (b) recta de calibrado obtenida para patrones inorgánicos de concentración creciente de Tb, donde aparece la ecuación de la recta de regresión por mínimos cuadrados y su coeficiente de correlación  $R^2$ .

En la Figura 36(a) se representa el resultado de la medida de cuatro inyecciones consecutivas de cada patrón de calibración. Los picos obtenidos se integraron y la media aritmética del área se utilizó para obtener la recta de calibrado, que se puede ver en la Figura 36(b).

Con este método, se calculó la concentración de Tb en las muestras celulares digeridas. Tras la normalización de los resultados al número de células de la muestra, determinada previamente mediante citometría de flujo, se obtuvo un valor de  $2,6 \pm 0,1$  fg de Tb por célula para la medida de tres cultivos independientes. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos en células individuales ( $2,9 \pm 0,8$  fg por célula) lo que demuestra la validez de la estrategia cuantitativa desarrollada.

#### **4.1.4. Aplicación al análisis de células tratadas con cisplatino**

En la introducción se destacaron los agentes quimioterapéuticos basados en platino como unos de los metalofármacos más potentes y ampliamente utilizados. Así, el cisplatino es uno de los más empleados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer como cáncer de ovario, de testículo o de pulmón. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la quimioterapia con compuestos basados en platino es el desarrollo de resistencia al fármaco, un proceso cuyo origen es multifactorial y aún no es totalmente conocido. La resistencia adquirida a compuestos de platino como el cisplatino se puede asociar con una reducción significativa de la concentración intracelular de platino. Así, la concentración de Pt en las células se podría considerar como biomarcador de resistencia a cisplatino.

En este sentido, se han utilizado diferentes aproximaciones para cuantificar la incorporación de platino en cultivos celulares y modelos animales expuestos a cisplatino. Sin embargo, la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo de manera global después de la lisis celular y refiriendo los resultados al contenido celular de partida, obteniendo así el contenido de Pt promedio en las células, pero sin considerar la variación entre células individuales después de su exposición a una dosis de cisplatino determinada. Por ello, se propone la aplicación del sistema desarrollado a la cuantificación de platino a nivel de célula individual, en modelos celulares sensibles y resistentes a cisplatino.

Así, una vez caracterizada y probada la validez del sistema desarrollado para la cuantificación elemental en células individuales, se aplicó a la cuantificación de la incorporación de cisplatino en cultivos celulares. Para ello, se utilizaron cultivos celulares de las líneas A2780 y A2780cis, sensible y resistente a cisplatino, respectivamente. Se sometieron ambas líneas a tratamiento con cisplatino utilizando dos concentraciones diferentes, 10 y 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Tras una exposición de las células al fármaco de 24 horas, se retiró el medio de cultivo suplementado con cisplatino y se lavaron las células todavía adheridas a la superficie de cultivo tres veces con PBS. Finalmente, se recogieron mediante tripsinización y se diluyeron en 10 % de metanol justo antes de su análisis. En la Figura 37 se puede ver la señal de fondo del análisis mediante la inyección de únicamente

metanol al 10 % (Figura 37(a)), así como la ausencia de eventos de platino para la introducción de células A2780 no tratadas con cisplatino (Figura 37(b)). Comparando los resultados obtenidos para las células A2780 tratadas con una dosis de cisplatino de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 37(c)) y  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 37(d)), se observa un claro aumento en la intensidad de los eventos con la concentración del fármaco utilizada para el tratamiento.

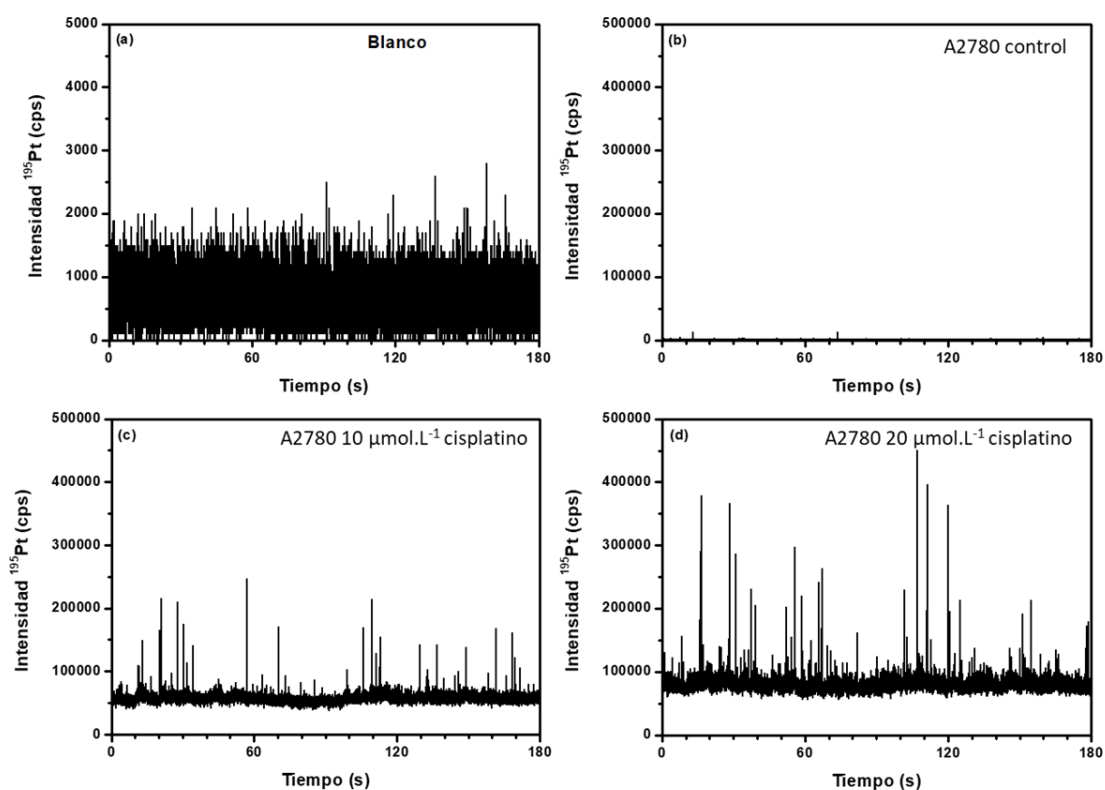


Figura 37. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780 tratadas en diferentes condiciones: (a) blanco (metanol 10 %), (b) células control no tratadas, (c) células tratadas con  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino y (d) células tratadas con  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino.

Sin embargo, incluso tras el lavado de las células con PBS, se obtuvo un fondo muy elevado, que aumentó de alrededor de 50000 cps para las células expuestas a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  hasta casi 100000 para las expuestas a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Este problema se intentó solucionar mediante el aumento del número de lavados con PBS después del tratamiento de las células. A pesar de ello, siempre se obtuvo un fondo muy elevado debido a la contribución de cisplatino disuelto. En estudios anteriores<sup>306</sup> se han realizado balances de masa en los que se apreció la pérdida inespecífica de cisplatino cuando se utiliza para el tratamiento de células en las típicas botellas de cultivo de plástico. Por ello, el elevado fondo obtenido se puede deber a la adsorción del propio cisplatino sobre la superficie de cultivo celular, que posteriormente es liberado por el efecto de las disoluciones utilizadas por la

tripsinización de las células. Además, se puede liberar Pt unido débilmente a la superficie celular o del interior celular tras la ruptura de alguna de las células durante su recogida mediante tripsinización o en su transporte al plasma como se apreció en las imágenes de las células al microscopio de la Figura 30. Este platino que se libera de las células también contribuye a la elevada señal de fondo.

Para intentar reducir el fondo del Pt de los análisis, se utilizó el propio medio de cultivo o una disolución de NaCl al 0,9 % como alternativa al PBS para el lavado de las células. En ningún caso se obtuvo una reducción significativa del fondo de Pt obteniendo además problemas en la nebulización y el plasma utilizando NaCl al 0,9 % debido al alto contenido de Na<sup>+</sup>.

Alternativamente, se decidió cambiar el método de recolección de las células. En lugar de utilizar una disolución de tripsina, se usó la disolución comercial CellStripper™, un método más suave y no enzimático para despegar las células de la superficie de cultivo.<sup>12</sup> Este reactivo reduce el riesgo de daño celular asociado al uso de enzimas con actividad proteasa como la tripsina. Con el uso de este reactivo se obtuvieron los menores fondos de Pt en las medidas. En la Figura 38 se puede apreciar un fondo más bajo de aproximadamente 10000 y 30000 cps para las células A2780 tratadas con 10 y 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino, respectivamente.

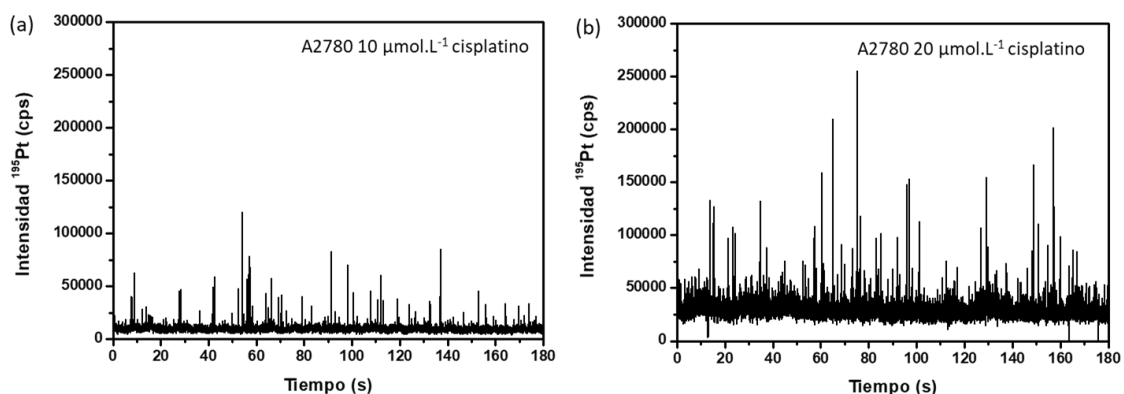


Figura 38. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780 recogidas utilizando el método CellStripper™ y previamente tratadas con (a) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino y (b) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino.

Estas mismas condiciones de tratamiento celular y posterior recogida de las células fueron aplicadas en la línea A2780cis, resistente a cisplatino y obtenida de la línea anterior

mediante exposición continuada al fármaco. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 39.

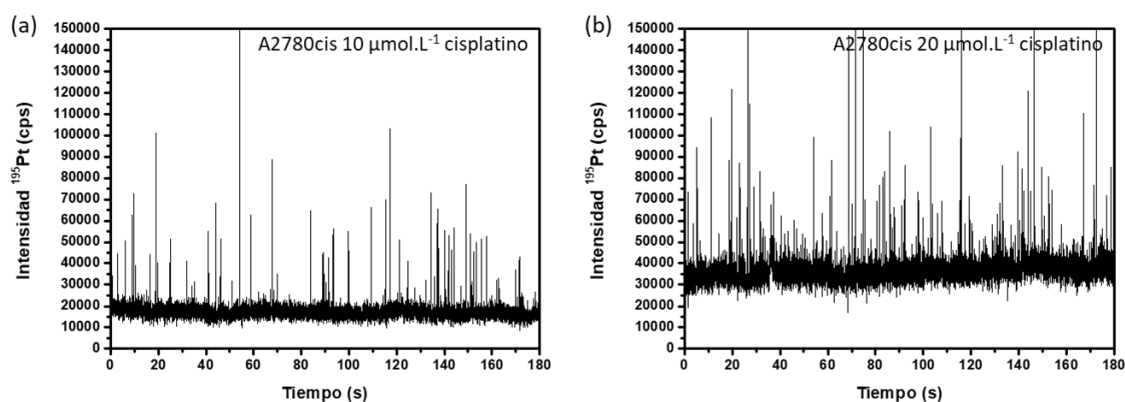


Figura 39. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de células A2780cis, resistentes a cisplatino, tratadas con (a)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino y (b)  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino.

Como se hizo anteriormente para el Tb, se calculó la concentración de Pt en células individuales de ambas líneas expuestas a las dos dosis de cisplatino. De nuevo, se construyó una curva de calibrado con patrones inorgánicos de platino, que se puede observar en la Figura 40, y mediante la ecuación (2) se obtuvo la masa de Pt en cada evento celular.

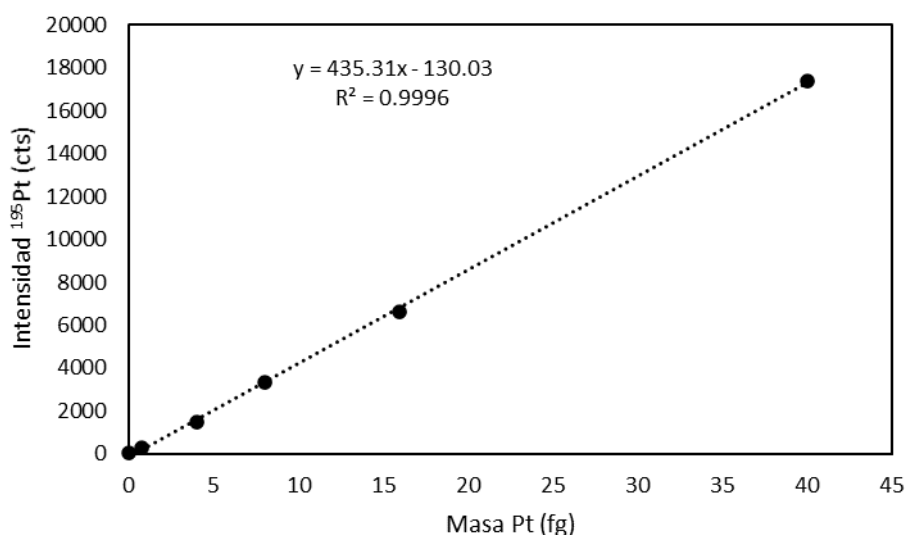


Figura 40. Recta de calibrado obtenida para patrones inorgánicos de Pt.

En promedio, tras el tratamiento de las células con  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , los resultados revelaron una masa de Pt de  $1,26 \pm 0,63$  fg por célula ( $n= 202$  eventos) para la línea sensible A2780 y  $0,82 \pm 0,42$  fg de Pt por célula ( $n=260$  eventos) para la línea resistente

A2780cis. Las mismas líneas celulares expuestas a una concentración de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  presentaron una incorporación de  $3,58 \pm 1,05 \text{ fg}$  de Pt por célula ( $n=134$  eventos) para las células A2780 y de  $1,33 \pm 0,36 \text{ fg Pt}$  ( $n=368$  eventos) para A2780cis. Los valores obtenidos para las células A2780 y A2780cis expuestas a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino representan alrededor de  $4 \times 10^6$  y  $3 \times 10^6$  átomos de Pt por célula, respectivamente. Estos valores concuerdan con estudios realizados previamente en otros modelos celulares.<sup>227</sup>

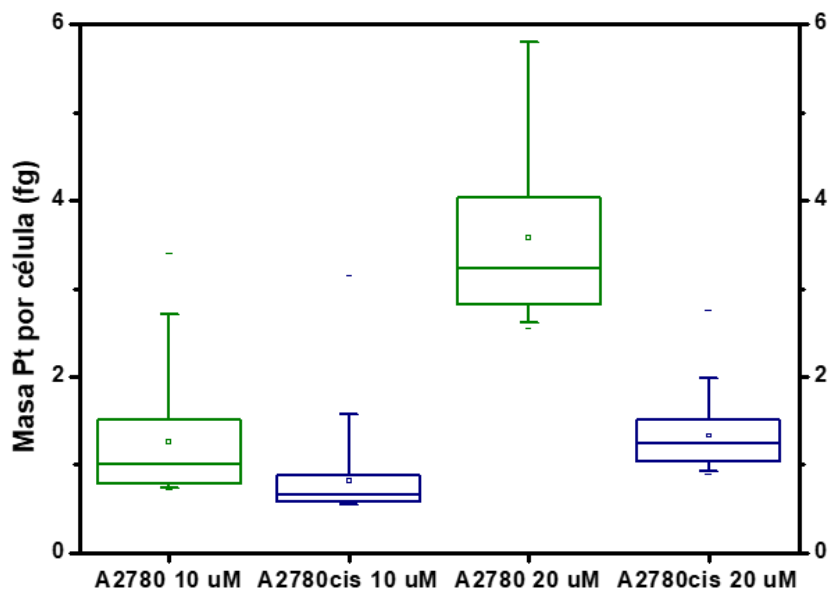


Figura 41. Diagramas de cajas del contenido de Pt en células individuales de las líneas A2780 y A2780cis tratadas con  $10$  y  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisplatino.

Los resultados obtenidos a nivel de célula individual se recogen en los diagramas de cajas de la Figura 41. En estos se puede ver una diferencia clara en la masa de Pt por célula entre los modelos sensible y resistente, respectivamente, en particular cuando se emplea la dosis de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , donde es significativamente menor en el caso de las células resistentes. Además, al duplicar la dosis de exposición de cisplatino, la masa de Pt por célula en la línea sensible es más del doble. Sin embargo, el aumento es menor en la línea resistente, como se obtuvo previamente en medidas de manera global o en *bulk*.<sup>306</sup> La metodología desarrollada permite discriminar de manera rápida y directa entre poblaciones celulares sensibles y resistentes a cisplatino, sin necesidad de digerir la muestra ni de un gran número de células ( $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ).

La metodología desarrollada ha permitido obtener información sobre las diferencias entre células individuales. En este sentido, la dispersión de datos, tras eliminar

los eventos con intensidad mayor a  $3\sigma$  sobre su propia media para evitar eventos múltiples, es mayor en las células sensibles, mientras que las células de la línea resistente muestran un comportamiento más homogéneo. Todo esto puede ser un indicio de que al menos parte de la resistencia a cisplatino viene asociada a un mecanismo relacionado con la inhibición de la incorporación celular del fármaco, ya que la concentración de Pt intracelular es significativamente menor en el modelo celular resistente para ambas concentraciones de tratamiento utilizadas. Resultados similares fueron obtenidos previamente tanto para cisplatino como para oxaliplatino en los mismos modelos celulares.<sup>306</sup>

### **4.1.5. Aplicación del método a la determinación de cobre en esporas de *Streptomyces coelicolor***

Los estreptomicetos son bacterias de gran interés biotecnológico ya que de estas se obtienen dos tercios de los compuestos bioactivos utilizados en clínica, principalmente como antibióticos, pero también como antitumorales, inmunosupresores, etc.<sup>307</sup> Estas bacterias presentan un ciclo de desarrollo complejo que incluye procesos de muerte celular programada y diferenciación de hifas, lo que lleva a la formación de un micelio aéreo y a la esporulación.<sup>308,309</sup> Una de las etapas menos estudiadas del desarrollo de *Streptomyces* es la germinación de esporas. Existen trabajos de proteómica y transcriptómica que demuestran que este proceso está altamente regulado.<sup>310</sup> Sin embargo, los mecanismos biomoleculares que controlan la germinación están poco caracterizados,<sup>311,312</sup> aunque se sabe que hay ciertas proteínas involucradas en el proceso. Uno de los aspectos más enigmáticos y menos conocidos de la germinación de esporas es la asincronía, es decir, que unas esporas germinen temprano, mientras que otras necesitan más tiempo o incluso no llegan a germinar.<sup>310</sup> Una de las proteínas con implicaciones claras en esta asincronía es NepA, componente estructural de la pared celular y de especial relevancia para la dormancia de las esporas.<sup>313</sup>

El cobre se ha establecido como un regulador positivo de la diferenciación morfológica (formación de micelio aéreo y esporulación) y de la producción de antibióticos en *Streptomyces*.<sup>314,315</sup> Sin embargo, en presencia de concentraciones altas



de cobre (por encima de  $750 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), el efecto en el desarrollo del micelio aéreo y la esporulación se convierte en un efecto negativo (retraso).<sup>316</sup> En cuanto al crecimiento vegetativo de *Streptomyces*, se cree que el cobre no tiene ningún efecto.

Los mecanismos que intervienen en el transporte del cobre en *Streptomyces* permanecen poco entendidos. Worrall y Vijgenboom<sup>317</sup> predijeron la existencia de dos sistemas de transporte de cobre CopZ/CopA (chaperona/transportador de cobre) que regulan la salida de cobre de la célula. Demostraron que la expresión de los genes que codifican estos transportadores (SCO2730/2731 y SCO1045/1046 durante la germinación y en fase micelial, respectivamente) está regulada por CsoR, el represor transcripcional que modula la expresión de estos genes en función de los niveles de cobre citosólico.<sup>317</sup> Este mismo grupo de investigación demostró que el número de genes que responden al estrés por cobre es mucho mayor que el número de genes regulados por el represor CsoR.

El cobre en el citoplasma se encuentra unido a proteínas llamadas chaperonas, que secuestran el cobre y lo transportan para su unión con otras proteínas como los transportadores de membrana. Los genes *SCO2730* y *SCO2731* de *Streptomyces coelicolor* codifican una chaperona de cobre (CopZ) y una ATPasa de tipo P<sub>1</sub> (CopA), respectivamente, altamente conservadas en el género *Streptomyces*.<sup>316</sup> CopA es una proteína de membrana transportadora del cobre que está asociado a la chaperona CopZ en el citosol celular.<sup>316</sup> Dawarakanath y colaboradores<sup>316</sup> observaron que, bajo concentraciones normales de cobre citosólico, los genes *csoR* y *SCO2730* (chaperona CopZ) se expresan a niveles bajos. Cuando la concentración citosólica de cobre aumenta, las proteínas CsoR y *SCO2730* (CopZ) tamponan el cobre al principio, pero cuando se saturan, la represión de CsoR sobre *SCO2730/2731* y *SCO1045/SCO1046* se desbloquea, aumentando la expresión de estos transportadores y, por tanto, la salida de cobre de la célula manteniéndose así la homeostasis celular. Los mecanismos de entrada de cobre en *Streptomyces* todavía no han sido completamente elucidados.

En este apartado, se caracterizó el sistema de transporte de cobre *SCO2730/SCO2731*, y se llevó a cabo la medida de cobre mediante ICP-MS en esporas y micelio de varias cepas de *Streptomyces* para contribuir al entendimiento de los complejos efectos pleiotrópicos de este elemento en el desarrollo de estas bacterias, incluyendo los importantes efectos en la regulación de la asincronía de la germinación,

crecimiento vegetativo y activación del metabolismo secundario. Estos estudios se realizaron en colaboración con los doctores Nathaly González y Ángel Manteca del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. A la presente Tesis Doctoral corresponde únicamente el desarrollo y aplicación de las estrategias utilizadas para la medida de cobre. Otros aspectos como las cepas de *Streptomyces* y condiciones de cultivo utilizadas, generación de cepas mutantes en sistemas relacionados con la homeostasis de cobre, y medidas de otros parámetros como concentración de proteínas o secuenciación, así como el modelo generado para explicar el efecto de la concentración citosólica de cobre en la germinación, desarrollo y metabolismo secundario de *Streptomyces coelicolor* se detallan en la publicación derivada que se adjunta al final de esta memoria (*Scientific reports*, 2019, 9, 3414).

La cuantificación de cobre se realizó de manera global, tanto en esporas como en micelio de *S. coelicolor*, tras la digestión ácida de las muestras. Por otro lado, se llevó a cabo la cuantificación de cobre en esporas individuales de la bacteria, utilizando la metodología desarrollada previamente en este capítulo.

### **4.1.5.1. Determinación de cobre total en esporas y micelio**

Para la medida de cobre total en esporas germinadas y micelio, se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación de los diferentes cultivos. Tras su lavado utilizando una disolución tampón de 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,5; 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, las células se rompieron mediante el método fastprep (FastPrep®-24, MP™), utilizando 6 ciclos de 20 s manteniendo las muestras en hielo durante 1 min entre cada ciclo. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que se dividió en dos alícuotas. Una de ellas se utilizó para la cuantificación de cobre intracelular total mediante ICP-MS y la otra para la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford (realizado por Nathaly González) para la normalización de resultados. Las muestras se prepararon por triplicado para tres réplicas biológicas independientes.

Para la medida de cobre total en esporas durmientes de *Streptomyces*, se obtuvo una suspensión de esporas en agua destilada a partir de cultivos sólidos esporulados en

medio SFM suplementados o no con diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ . Las suspensiones obtenidas se filtraron para evitar posibles restos de micelio y se lavaron 4 veces mediante centrifugación a 12000 g durante 10 min en el tampón de lavado mencionado previamente eliminando el sobrenadante. El pellet final se trató de forma diferente según su utilización para la medida de cobre total o en esporas individuales, aunque en ambos casos se prepararon tres réplicas independientes a partir de tres placas esporuladas. Para la medida de cobre total el pellet de esporas obtenido tras su lavado se resuspendió en 1 mL de agua estéril y se transfirió a un tubo previamente pesado. La muestra se centrifugó a 12000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet de esporas se dejó secar durante 6 h a 70 °C y finalmente se determinó el peso seco en una balanza de precisión, restando el peso del tubo, para normalizar los resultados de la medida de cobre al peso seco.

Para la medida de cobre total en esporas durmientes, se realizó una digestión ácida de las muestras, como se describió anteriormente para las células de la línea A2780, utilizando  $\text{HNO}_3$  concentrado y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 70 °C durante 4h. Eso se debe a que mediante el método Fast-Prep no se consiguió la ruptura de las esporas. La solución resultante se diluyó 1:10 en agua y se midió el cobre total mediante ICP-MS de manera convencional, normalizando los resultados al peso seco ya que la digestión ácida hidroliza las proteínas. Consecuentemente, el contenido de cobre se puede comparar entre esporas durmientes o entre esporas germinadas y micelio, pero no entre esporas durmientes y esporas germinadas o micelio.

Las medidas se realizaron utilizando el ICP-MS iCAP TQ (Thermo Fisher Scientific) en modo cuadrupolo simple utilizando He como gas de colisión en la celda, para la monitorización de los dos isótopos del cobre,  $^{63}\text{Cu}$  y  $^{65}\text{Cu}$ . Para estas medidas, el ICP-MS se equipó con un nebulizador Micro Mist y una cámara de nebulización ciclónica (ambos de ESI Elemental Service & Instruments GmbH) y se utilizó el automuestreador ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies) para la introducción de las muestras líquidas de manera automática. La determinación cuantitativa se llevó a cabo mediante calibración externa utilizando patrones inorgánicos de cobre preparados a partir de una disolución de cobre de 1000 mg  $\text{L}^{-1}$ . Para ello, se construyó una recta de calibrado representando la intensidad de cobre frente a la concentración de cobre de los patrones, como la que se puede ver en

la Figura 42, que muestra una buena linealidad en todo el intervalo de concentraciones utilizadas para ambos isótopos,  $^{63}\text{Cu}$  y  $^{65}\text{Cu}$ . El isótopo más abundante,  $^{63}\text{Cu}$  (69,17 %) proporcionó la mejor sensibilidad y por ello fue el utilizado para las medidas de las muestras. En estas condiciones, el límite de detección, calculado como tres veces la desviación del blanco dividido entre la pendiente de la recta de calibrado, resultó ser de  $3,4 \text{ ng L}^{-1}$ .

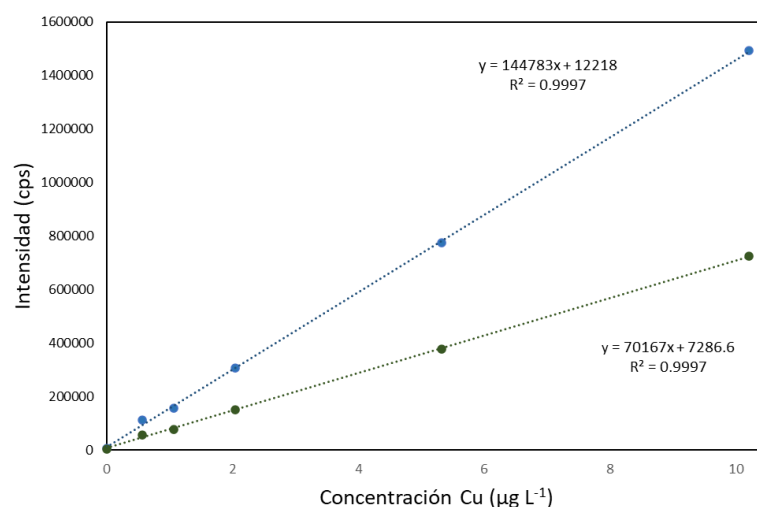


Figura 42. Rectas de calibrado obtenida para la medida de  $^{63}\text{Cu}$  y  $^{65}\text{Cu}$  utilizando patrones de Cu entre 0 y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Mediante esta estrategia, se analizó la concentración de cobre durante las diferentes fases del desarrollo de *S. coelicolor* en esporas germinadas entre 5 y 10 h de cultivo y en micelio entre 20-70 h. En la Figura 43 se representa la concentración de cobre normalizada por cantidad de proteína en las diferentes fases, en las que se indican las etapas de crecimiento vegetativo (metabolismo primario) y metabolismo secundario. Se observa un rápido descenso en la concentración de cobre durante la germinación.

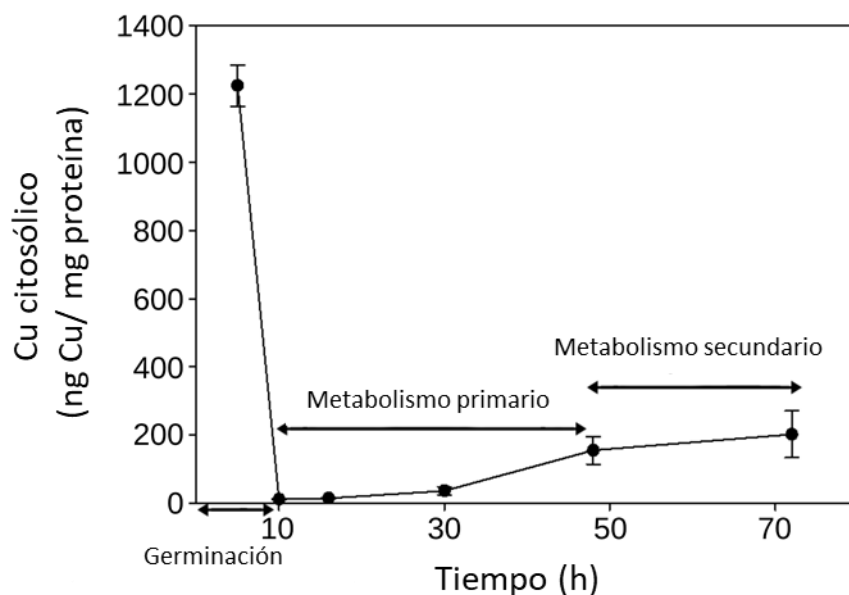


Figura 43. Concentración de cobre citosólico durante el desarrollo de *S.coelicolor*.

Además, se evaluó la concentración de cobre en esporas durmientes normalizada por peso seco (Figura 44(a)) y en esporas germinadas (5 y 10 h) y micelio (60 h) normalizada por cantidad de proteína (Figura 44(b)) de la cepa silvestre (Wt), el mutante *SCO2730::Tn5062* (mutante generado por la inserción del transposón Tn5062 en el gen mutado *SCO2730*) y de la cepa silvestre obtenida en medio suplementado con  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu). La concentración de cobre citosólico fue similar en las esporas durmientes del mutante *SCO2730::Tn5062* y Wt ( $11 \pm 6$  y  $8,5 \pm 3$  ng Cu/mg peso seco) y mucho mayor en las esporas Wt80Cu ( $208 \pm 30$  ng Cu/mg peso seco, 24 veces mayor que Wt). El cobre citosólico disminuyó dramáticamente durante la germinación en cultivos inoculados con esporas Wt o Wt80Cu, 66 y 70 veces menor en el paso de 5 a 10 h, respectivamente (Figura 44(b)). Esta disminución fue menor en los cultivos inoculados con esporas del mutante *SCO2730::Tn5062* (disminución de 26 veces entre 5 y 10 h). El cobre citosólico fue mayor a las 10 h en el mutante *SCO2730::Tn5062* ( $45,7 \pm 5,4$  ng Cu/mg proteína) comparado tanto con Wt como Wt80Cu ( $18,6 \pm 1,6$  y  $24,2 \pm 2,4$  ng Cu/mg proteína, respectivamente). En cambio, el cobre citosólico total en el micelio del mutante ( $153 \pm 20$  ng Cu/mg proteína) y las cepas salvajes Wt y Wt80Cu ( $145 \pm 18$  y  $155 \pm 41$  ng Cu/mg proteína, respectivamente) fue comparable. Estas medidas se relacionaron con medidas de esporulación, germinación y producción de antibióticos para estudiar el efecto regulador del cobre en estos procesos.

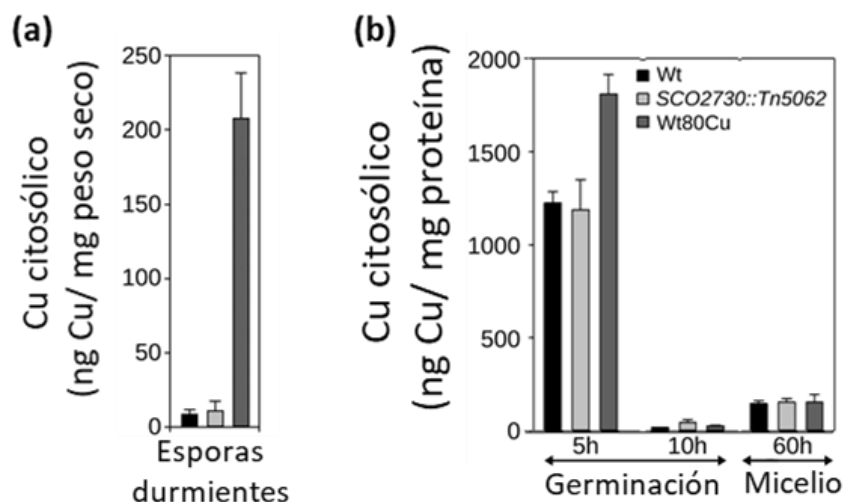


Figura 44. Concentración de cobre citosólico en: (a) esporas durmientes y (b) esporas germinadas y micelio. En ambos casos se utilizó la cepa silvestre (Wt), mutante SCO2730::Tn5062, y cepa silvestre obtenida en medio suplementado con  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu).

Además, se comparó el efecto de la concentración de cobre añadido al medio de cultivo en forma de  $\text{CuSO}_4$  en la concentración de cobre citosólico. Para ello, se midió la concentración de cobre intracelular total en cultivos de 8 h de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 en medio de cultivo sin suplementación con cobre y añadiendo  $40$  y  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  al medio de cultivo. Curiosamente, el cobre intracelular no fue proporcional al cobre añadido al medio de cultivo. Como se puede ver en la Figura 45, al doblar la concentración de cobre extracelular, el cobre citosólico sufrió un aumento de 1,3 veces (de  $201 \pm 7$  a  $272 \pm 39$  ng Cu/mg proteína). Analizando la expresión de los dos sistemas de exporte de cobre identificados en *S. coelicolor* (SCO2730/2731 y SCO1045/1046) para estudiar el mecanismo de regulación de la concentración de cobre citosólico durante la germinación, el grupo de Ángel Manteca encontró la máxima expresión del sistema SCO2730/2731 para una concentración de cobre de  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , mientras que el sistema SCO1045/1046 alcanzó su máxima expresión con niveles de cobre de  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Además, se investigó la expresión del gen *csor* que se activó de manera similar en los cultivos suplementados con ambas concentraciones de cobre.

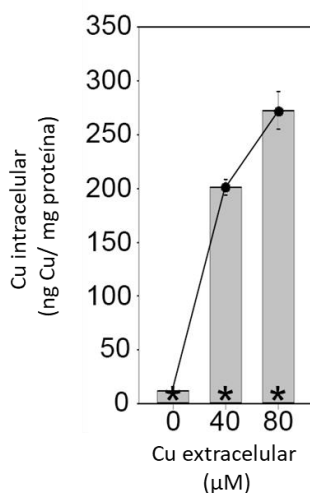


Figura 45. Variación de la concentración intracelular de cobre en cultivos de 8 h en función de la concentración de cobre en el medio de cultivo.

#### 4.1.5.2. Determinación de cobre en esporas individuales de *Streptomyces coelicolor*

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las esporas de manera individual respecto al contenido de cobre intracelular se abordó el estudio de esporas individuales, de forma similar a lo previamente desarrollado para células humanas. De esta manera, se puede establecer la variabilidad entre esporas individuales que puede tener relación con diferentes procesos, como la germinación de las esporas. Para la determinación de cobre en esporas individuales, el pellet de esporas obtenido como se comentó en el apartado anterior, se resuspendió directamente en metanol al 10 % y se diluyeron a una concentración aproximada de  $1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ .

Como en la primera parte de este capítulo, las suspensiones de esporas se introdujeron mediante bomba de jeringa a un flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  utilizando el mismo sistema de introducción de muestra, el nebulizador Enya Mist y la cámara de nebulización de consumo total, esta vez equipados en el ICP-MS iCAP TQ, operado en modo cuadrupolo simple utilizando He como gas de reacción. Este equipo permite la disminución del tiempo de integración por debajo de 10 ms. Para intentar obtener señales de cobre en esporas con menor concentración citosólica de este elemento, se redujo el tiempo de integración a 1 ms, intentado mejorar la relación señal/ruido de las medidas al disminuir la

contribución del fondo en los eventos celulares. En estas condiciones únicamente el isótopo  $^{63}\text{Cu}$  fue monitorizado.

Se analizaron muestras de esporas de la cepa salvaje (Wt), del mutante en el sistema *SCO2730::Tn5062* y en esporas obtenidas en un medio suplementado con  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu). El bajo contenido en Cu en esporas de los dos primeros tipos, observado también mediante las medidas de Cu total, no permitió la obtención de señales de Cu de sus esporas individuales. No obstante, se obtuvieron eventos de Cu tras la introducción de esporas individuales de la cepa Wt80Cu. En la Figura 46 se pueden ver los primeros 30 s de la medida de esporas individuales de la cepa Wt (Figura 46(a)) y Wt80Cu (Figura 46(b)).

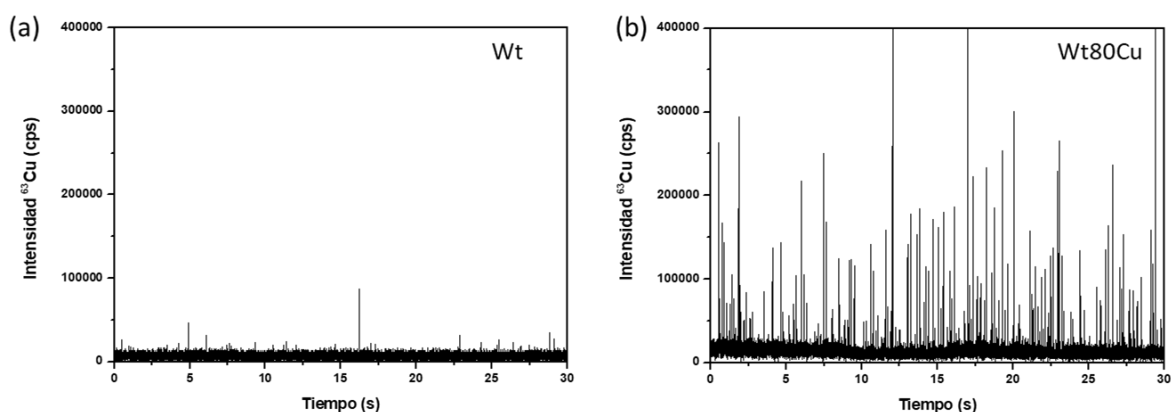


Figura 46. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de esporas de *Streptomyces coelicolor*: (a) cepa silvestre (Wt) y (b) esporas obtenidas de un medio suplementado con  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu).

El método desarrollado previamente para la cuantificación elemental en células individuales, mediante la ecuación (2), se aplicó para la evaluación cuantitativa de Cu en esporas individuales de la cepa Wt80Cu. Tras realizar un calibrado con patrones inorgánicos de cobre, se obtuvo un límite de detección de  $95 \text{ ag}$  de Cu por espora. Por lo tanto, las esporas de las muestras que no provocaron señales contienen una masa menor de Cu. Los resultados obtenidos se muestran en forma de histograma en la Figura 47. Tras la cuantificación de 442 esporas individuales, se obtuvo una alta variabilidad entre esporas con un mínimo de  $0,51 \text{ fg}$  de Cu por espora y un máximo de  $3,83 \text{ fg}$  por espora, con un valor promedio de  $1,00 \pm 0,54 \text{ fg}$  de Cu por espora. Esta variabilidad se utilizó en la elaboración de un modelo que explica el papel del cobre como regulador de la germinación, desarrollo y metabolismo secundario en *S. coelicolor*. Así, parece que la



asincronía en la germinación de las esporas podría ser una consecuencia, al menos en parte, de las diferencias en la concentración de cobre en esporas durmientes individuales. Las esporas con mayores niveles de cobre germinan más despacio que las esporas con menor contenido en cobre.

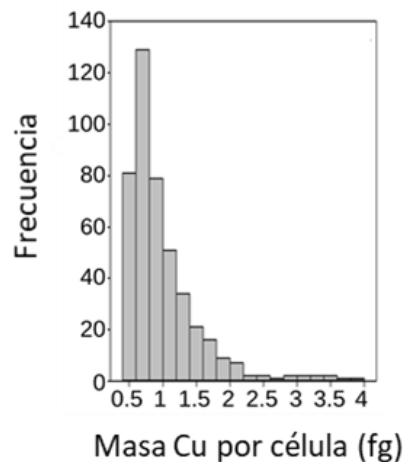


Figura 47. Histograma que muestra el contenido de Cu citosólico en esporas individuales de *S.coelicor* obtenidas de medio SFM suplementado con  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  (Wt80Cu).

Estos resultados demuestran la aplicabilidad del método desarrollado a otros tipos celulares como esporas de bacterias. Hay estudios que demuestran la presencia de cationes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  en altas concentraciones en esporas durmientes de *Streptomyces*.<sup>318</sup> Sin embargo, la variabilidad en la concentración de estos metales en esporas individuales se desconoce. La metodología desarrollada, basada en un sistema de introducción de muestras de consumo total para la introducción de células individuales, junto con la detección por ICP-MS de triple cuadrupolo se podría adaptar para la cuantificación de estos y otros metales en esporas individuales.



## **4.2. Análisis de pequeñas estructuras mediante técnicas analíticas complementarias basadas en ICP-MS**

En este capítulo se propone la utilización de un nuevo sistema de introducción de muestras para suministrar al plasma tanto células como nanopartículas individuales con alta eficiencia. Estas estrategias se complementarán con el empleo de técnicas híbridas basadas en ICP-MS como el acoplamiento con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para permitir la detección de nanopartículas en un amplio intervalo de tamaños. Por último, se utilizará la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la visualización directa de las nanopartículas y la confirmación de los resultados obtenidos.

Estas técnicas se utilizarán en dos tipos de aplicaciones. Por un lado, se pretende cuantificar la incorporación de selenio en células individuales de levaduras crecidas en medios de cultivo suplementados con diferentes formas de selenio. El empleo de las técnicas complementarias mencionadas se aprovechará asimismo para estudiar la formación de nanopartículas biogénicas de selenio en las células de levadura. Por otro lado, estas mismas estrategias se utilizarán para estudiar la degradación de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato en tejidos animales tras su administración por vía intraperitoneal.

### **4.2.1. Estrategias analíticas basadas en ICP-TQ-MS para estudiar la incorporación de selenio y presencia de nanopartículas biogénicas en células de levadura**

Diversos agentes, entre los que se encuentran compuestos de selenio, poseen propiedades quimiopreventivas frente a diferentes tipos de cáncer. La mayor evidencia sobre la eficacia del selenio como agente anticancerígeno, particularmente en cáncer de próstata, se observó en el ensayo de Prevención Nutricional del Cáncer (*Nutritional Prevention Cancer (NPC) trial*), llevado a cabo por Clark y colaboradores en los años 80

utilizando una suplementación de selenio de 200 µg por día, en forma de levaduras enriquecidas en selenio.<sup>319</sup> De estos experimentos se concluyó que la selenometionina, el metabolito mayoritario de selenio en las levaduras selenizadas (*Saccharomyces cerevisiae*), era la especie de selenio responsable de este efecto. Sin embargo, años después, el ensayo de prevención con selenio y vitamina E (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*, SELECT), el ensayo de quimioprevención del cáncer más amplio jamás realizado, demostró que la suplementación oral en forma de selenometionina (200 µg diarios durante un promedio de alrededor de 5 años), vitamina E (acetato de α-tocoferol) o la combinación de ambos no ayudó a prevenir el cáncer de próstata en la población heterogénea utilizada.<sup>320</sup> Por ello, la presencia de otras especies de selenio en las levaduras, de menos abundancia que la selenometionina, parece ser crucial para el efecto preventivo observado anteriormente. En efecto, se han identificado alrededor de 100 especies diferentes de selenio en levaduras enriquecidas en selenio. No obstante, la ausencia de una definición formal de levadura selenizada y la amplia variedad de cepas utilizadas complica la verificación de estos productos.<sup>321</sup>

En este sentido, desde los primeros estudios se observó que los suplementos alimenticios eran inconsistentes en su composición en relación con las indicaciones de su etiquetado.<sup>322</sup> Estas inconsistencias podían resultar del proceso de enriquecimiento con selenio,<sup>323</sup> ya que todas las etapas del crecimiento celular deben estar controladas y las fuentes de selenio se deben añadir en momentos críticos para su óptima bioconversión por las células de levadura. Además, con el paso de los años se fueron desarrollando y optimizando métodos y protocolos analíticos para la determinación de selenio total y sus diferentes especies en levaduras. Hoy en día, la determinación total de selenio en levaduras selenizadas se puede medir de manera rutinaria usando ICP-MS después de una digestión de la muestra y, además, los resultados pueden ser validados mediante el análisis de materiales de referencia disponibles.<sup>293</sup> Esta determinación se suele llevar a cabo en el producto final seco tras su producción. Sin embargo, sería beneficioso, desde un punto de vista biotecnológico, disponer de un método analítico rápido que ayude a monitorizar, en tiempo real, la incorporación de selenio durante el crecimiento celular. Esta estrategia permitiría la rápida optimización de las formas y dosis de selenio utilizadas

mientras la fermentación de las levaduras tiene lugar. Por ello, el desarrollo de métodos basados en *single cell* ICP-MS podría ser de gran interés en este sentido.

Como se ha mencionado en la introducción de la presente Tesis Doctoral, se han introducido células de levadura individuales al ICP-MS, generalmente como prueba de concepto de los principios fundamentales del análisis de células individuales. Sin embargo, la evaluación cuantitativa de la incorporación de selenio en las células de levadura y de la variación entre células individuales podría ser factible mediante el uso de sistemas de introducción de muestra neumáticos de alta eficiencia similares a los detallados en el capítulo primero de la presente tesis doctoral empleando analizadores de masa de triple cuadrupolo. Esta investigación se abordará en el presente capítulo.

Otro importante aspecto a tener en cuenta durante la producción de levaduras selenizadas es la formación metabólica de diferentes especies de selenio. Parece claro que la mayoría de selenio en las levaduras está presente en forma de selenometionina, tanto en forma libre como incorporada en proteínas. En este contexto, en la industria biotecnológica típicamente se verifica un contenido mínimo de selenio en forma de selenometionina (normalmente > 60 %) y la ausencia de las formas inorgánicas como selenito o selenato (< 2 %).<sup>292</sup> Aun así, la caracterización de otras especies metabólicas con selenio en su composición, incluso a niveles de traza o ultratrazas, es un tema candente de investigación ya que, como se explicó previamente, el efecto positivo de este suplemento alimenticio puede surgir de estas especies minoritarias. Con este objetivo, se desarrollaron diferentes métodos de especiación para identificar y caracterizar las diferentes especies de selenio sintetizadas por las levaduras después de su producción.<sup>292,324–326</sup> Algunos autores concluyen que incluso las levaduras selenizadas de alta calidad contienen trazas de selenio inorgánico (< 1 %) aunque la proporción de estas especies depende del nivel de enriquecimiento en selenio y puede tener interés industrial y toxicológico. De acuerdo con la literatura, una de las especies de selenio no identificadas podrían ser nanopartículas biogénicas de selenio que, como se ha explicado en la introducción, pueden ser sintetizadas por microorganismos como bacterias, hongos o levaduras. Como en el caso del análisis de células individuales, el creciente interés por la naturaleza de las nanopartículas biogénicas de selenio viene acompañado de la necesidad de técnicas analíticas adecuadas para su caracterización. En este capítulo se persiguió la

combinación de técnicas complementarias basadas en ICP-MS y microscopía de transmisión electrónica para la detección y caracterización de posibles nanopartículas de selenio en un amplio rango de tamaños.

### **4.2.1.1. Evaluación cuantitativa de la incorporación de selenio en células individuales de levadura**

Desde su introducción en 2005, el análisis de células individuales mediante ICP-MS no ha dejado de optimizarse, debido particularmente a la creciente sensibilidad de los instrumentos utilizados, así como de los diferentes sistemas de introducción de muestras. Hoy en día, los límites de detección, especialmente en los nuevos ICP-MS con analizadores de triple cuadrupolo, alcanzan el rango de los  $ag$  para varios isótopos permitiendo la monitorización de pequeñas estructuras como células o nanopartículas individuales. Por ello, el primer objetivo de este capítulo fue la determinación del contenido en selenio en células individuales de levaduras crecidas bajo diferentes condiciones.

Para ello, se utilizaron las muestras de levadura descritas en el apartado 3.3. Brevemente, se utilizaron cuatro muestras diferentes en total. La primera de ellas es el material de referencia certificado SELM-1. Las tres restantes fueron obtenidas a partir de cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en medios de cultivo enriquecidos con 25 ppm de selenito sódico (Se-levadura1), 25 ppm de selenato sódico (Se-levadura2) o sin selenio (Levadura1). Las muestras fueron cultivadas, recogidas, lavadas y liofilizadas como se comentó en dicho apartado.

El sistema de introducción de muestra utilizado en este caso consistió en un sistema de introducción de células de alta eficiencia (HECIS)<sup>64</sup> compuesto por un nebulizador concéntrico de alta eficacia (HPCN) con un capilar interno de 110  $\mu m$  de diámetro interno y una cámara de nebulización de paso simple de pequeño volumen (15  $cm^3$ ) a la que se le introduce un flujo auxiliar de Ar para minimizar el impacto de las células con las paredes de la cámara y disminuir su deposición. Un esquema del sistema se puede ver en la Figura 7 en la sección 1.2.1.1.

El primer paso fue evaluar la eficiencia de transporte del sistema de introducción de muestra. Para ello, se suspendieron 10 mg de la muestra SELM-1 en 10 mL de agua. La suspensión resultante se lavó 3 veces mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* celular en agua Milli-Q limpia. Las células de SELM-1 lavadas se contaron de forma precisa mediante citometría de flujo para el cálculo de la eficiencia de transporte. En este caso, la bomba peristáltica del citómetro de flujo se calibró a  $60 \mu\text{L min}^{-1}$  para realizar un conteo absoluto, sin necesidad de utilizar partículas fluorescentes como en el capítulo anterior. Se registró la luz transmitida y dispersada procedente de la interacción de las células individuales a su paso por el haz de láser azul (488 nm) permitiendo el conteo de las células intactas en función de su tamaño y granulosidad. En las medidas de ICP-MS, el uso de un analizador de triple cuadrupolo permitió la monitorización de fósforo, que fue utilizado como marcador celular ya que está presente como elemento constitutivo de importantes componentes celulares (ADN, ARN, fosfato, fosfolípidos, etc.) tanto en células procariotas como eucariotas. Se monitorizaron los isótopos  $^{31}\text{P}$  y  $^{80}\text{Se}$  en el modo triple cuadrupolo (TQ) utilizando oxígeno como gas de reacción en la celda, para formar  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  y  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , respectivamente. Esto permitió resolver las grandes interferencias de ambos isótopos. El  $^{31}\text{P}$  está altamente interferido por especies como  $^{14}\text{N}^{17}\text{O}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$  o  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ . El  $^{80}\text{Se}$ , isótopo más abundante del elemento, presente la misma masa nominal que la interferencia isobárica ( $^{40}\text{Ar}_2^+$ ). Las suspensiones celulares se introdujeron al sistema SC-ICP-MS mediante el uso de una bomba de jeringa a  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Las condiciones utilizadas para las medidas de SC-ICP-MS se recogen en la Tabla 4. La optimización de la combinación de flujos de Ar utilizados como gas portador y gas envolvente, que previene la deposición de células en la cámara de nebulización, se realizó diariamente buscando los flujos que ofrecían la sensibilidad máxima para la medida de una disolución multielemental de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $^7\text{Li}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{115}\text{In}$  y  $^{238}\text{U}$ .

Tabla 4. Parámetros instrumentales de las medidas de SC-ICP-TQ-MS realizadas en el equipo iCAP TQ ICP-MS.

Equipo	iCAP TQ (Thermo Fisher Scientific)
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	14,0 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas auxiliar	0,8 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas portador	0,8 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas envolvente (HECIS)	0,31 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas en la celda (O <sub>2</sub> )	0,31 mL min <sup>-1</sup>
Q1 bias	0 V
Q <sub>celda</sub> bias	-5,94 V
Q3 bias	-12,0 V
Masas Q1	31 ( <sup>31</sup> P <sup>+</sup> ) o 80 ( <sup>80</sup> Se <sup>+</sup> )
Masas Q3	47 ( <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>+</sup> ) o 96 ( <sup>80</sup> Se <sup>16</sup> O <sup>+</sup> )
Tiempo de integración	5 ms
Flujo de introducción de muestra	0,01 mL min <sup>-1</sup>
Tiempo de adquisición	120 s

Se evaluó la duración de los eventos mediante la medida utilizando un tiempo de integración de 100  $\mu$ s, que permite la obtención de varios puntos de medida en cada evento. La duración de los eventos de <sup>31</sup>P y <sup>80</sup>Se, medidos como <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup> y <sup>80</sup>Se<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, respectivamente, fue de aproximadamente 1500  $\mu$ s. En comparación, los eventos de cobre, también elemento constitutivo en células de levadura, fueron más cortos (~ 600 – 800  $\mu$ s) cuando se monitorizó el isótopo <sup>63</sup>Cu sin utilizar ningún gas en la celda de colisión-reacción. En la Figura 48 se pueden observar los eventos ampliados en los que se aprecian los puntos de medida obtenidos para el <sup>63</sup>Cu<sup>+</sup> y <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup> en células individuales de levadura de la muestra SELM-1.



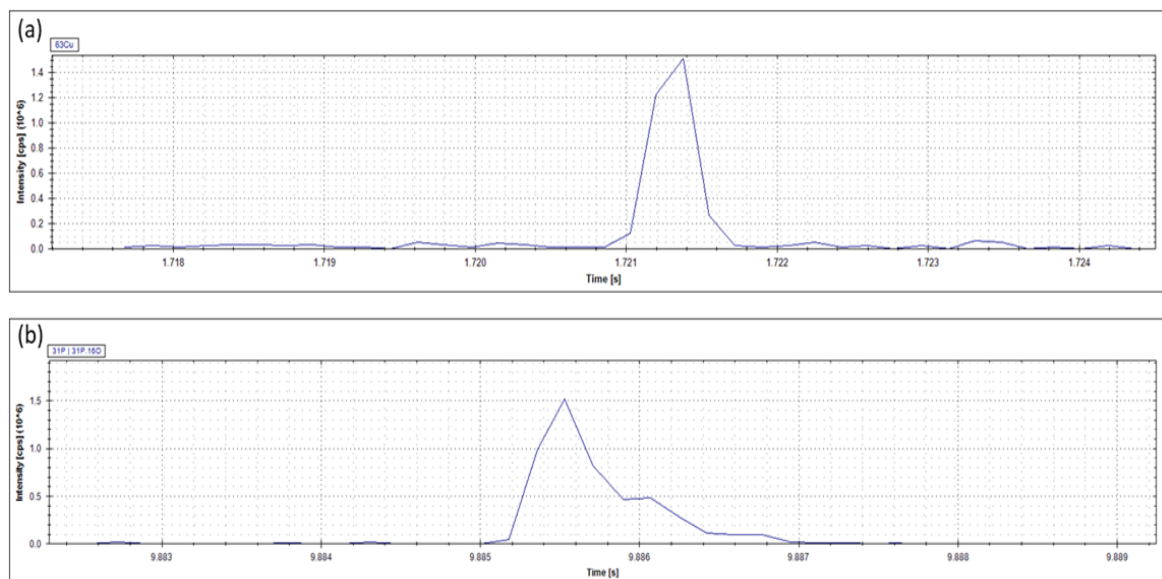


Figura 48. Ampliación de un único evento celular de (a)  $^{63}\text{Cu}$  medido sin gas en la CRC y (b)  $^{31}\text{P}$  medido como  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  tras la presurización de la CRC con  $\text{O}_2$ . Medidas realizadas con un tiempo de integración de  $100\ \mu\text{s}$ .

Este hallazgo sugiere que la presurización de la celda con diferentes gases afecta notablemente la distribución del haz de iones generado, efecto observado previamente por Vanhaecke y colaboradores.<sup>122</sup> Por ello, para la monitorización  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  y  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  se utilizó un tiempo de integración de 5 ms, obteniendo un único punto de medida por evento celular, lo que simplifica el tratamiento de datos. Las señales típicas obtenidas en la medida de los dos elementos en células individuales de levadura se muestran en la Figura 49, en este caso para el análisis del material de referencia SELM-1.

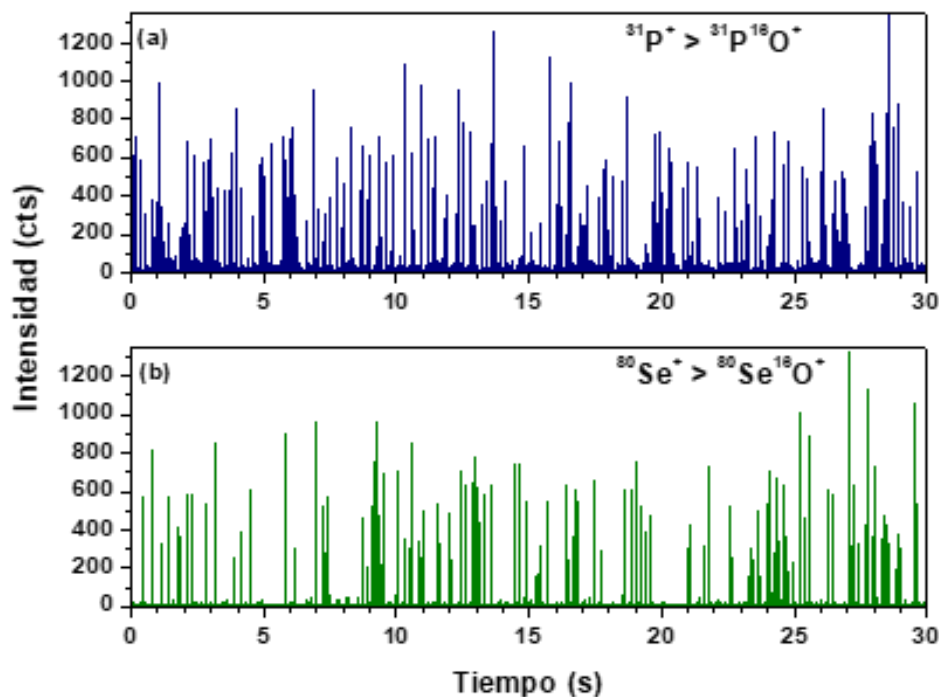


Figura 49. Resultados de la medida de SC-ICP-MS de levaduras SELM-1 monitorizando (a)  $^{31}\text{P}$  (como  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b)  $^{80}\text{Se}$  (como  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms.

En las medidas de SC-ICP-MS se filtraron los eventos con el criterio  $4\sigma$ , es decir, considerando como eventos celulares los que presentan una intensidad mayor a 4 veces la desviación estándar sobre la media del conjunto de datos. Tras la introducción de suspensiones de células de levadura en diferentes concentraciones celulares, y mediante la comparación de los eventos detectados en ICP-MS y el número de células en la suspensión utilizada (contadas por citometría de flujo), se calculó la eficiencia de transporte. En esta ocasión, como se puede observar en la Figura 50, la eficiencia no se vio afectada por la concentración celular utilizada, obteniendo un valor constante de  $69 \pm 3 \%$  para concentraciones entre 25000 y 100000 células  $\text{mL}^{-1}$ . Este valor concuerda con resultados publicados anteriormente con un sistema similar<sup>64</sup> y es mucho mayor al obtenido con el sistema de introducción de muestras desarrollado en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral, debido a la adición del flujo adicional de Ar que evita la pérdida de células a su paso a través de la cámara de nebulización.

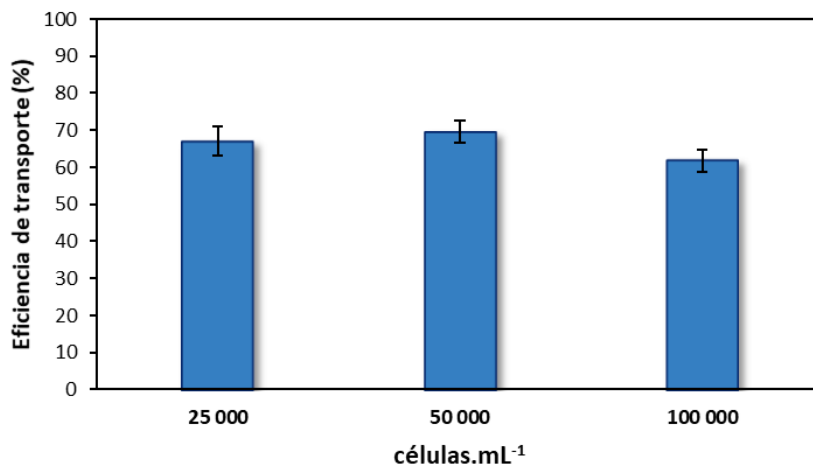


Figura 50. Representación gráfica de la eficiencia de transporte frente a la concentración de células de levadura utilizada.

Posteriormente, mediante un calibrado externo con patrones inorgánicos de fósforo y de selenio y utilizando la ecuación (2) como en el capítulo anterior, se pudo cuantificar el contenido de ambos elementos en células individuales de todas las muestras de levaduras previamente explicadas. En la Tabla 5 se muestran los datos obtenidos para las diferentes muestras. La muestra Levadura1 representa las levaduras no enriquecidas en selenio, mientras que las tres restantes fueron obtenidas a partir de cultivos en medios enriquecidos con diferentes formas de selenio. En la Tabla 5 se puede apreciar la distribución de ambos elementos entre las células individuales como resultado de la propia variación biológica. Mientras que el contenido de fósforo en las muestras Levadura1, Se-levadura1 y Se-levadura2 es comparable, en el material de referencia SELM-1 la masa de fósforo obtenida fue 5 veces mayor. Las células de esta muestra también fueron capaces de acumular mayores cantidades de selenio en comparación con Se-levadura1, obtenida a partir de medio enriquecido en selenito sódico. Además, en la muestra obtenida de medio de cultivo suplementado con selenato sódico no se detectaron eventos de selenio por lo que se puede decir que no presentó una acumulación de selenio detectable por el método propuesto. Por ello, el selenato sódico no es una fuente de selenio a tener en cuenta para la producción de levaduras enriquecidas en selenio. En las condiciones de medida utilizadas, el límite de detección fue de 0,16 fg de selenio por célula.

Tabla 5. Contenido de fósforo y selenio en células individuales de diferentes muestras de levadura (valores expresados en fg por célula)

Muestra	Fósforo		Selenio		Fracción de células que contienen selenio
	Promedio	Rango	Promedio	Rango	[%]
Levadura1	8,8	5,1 - 25,0	N.D.	-	-
Se-levadura1	9,5	2,3 - 36,1	12,1	0,5 - 59,8	46
Se-levadura2	10,9	4,9 - 32,3	N.D.	-	-
SELM-1	55,3	8,3 - 201,4	26,5	1,1 - 94,7	90

N.D.: no detectado

Por otro lado, mediante la comparación del número de eventos obtenidos de selenio y de fósforo, como elemento constitutivo celular, se pudo obtener el porcentaje de células de cada muestra que han incorporado selenio durante su cultivo. Como se puede apreciar en la Tabla 5, el 90 % de las células de la muestra SELM-1 contienen selenio, mientras que, en la muestra Se-levadura1, apenas la mitad de las células contienen una masa de selenio detectable ( $LOD = 0.16 \text{ fg célula}^{-1}$ ).

Tanto la cuantificación de la incorporación de selenio en células individuales, como la estimación del porcentaje de células que han incorporado selenio constituyen una información muy útil para distinguir entre productos comerciales, como suplementos alimenticios, que ofrezcan levaduras realmente crecidas en un medio rico en selenio y levaduras mezcladas posteriormente con cualquier compuesto de selenio para su comercialización. Para demostrarlo, se añadió selenio a las suspensiones celulares de la muestra Levadura1 (no enriquecida en selenio) en dos formas, selenometiona y selenito sódico. Ambos compuestos fueron añadidos para obtener una concentración final de selenio de  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  en las muestras de levadura, equivalente al contenido de selenio en el material de referencia SELM-1 ( $2031 \pm 70 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los resultados de la medida de estas muestras en modo SC-ICP-MS se muestran en la Figura 51.

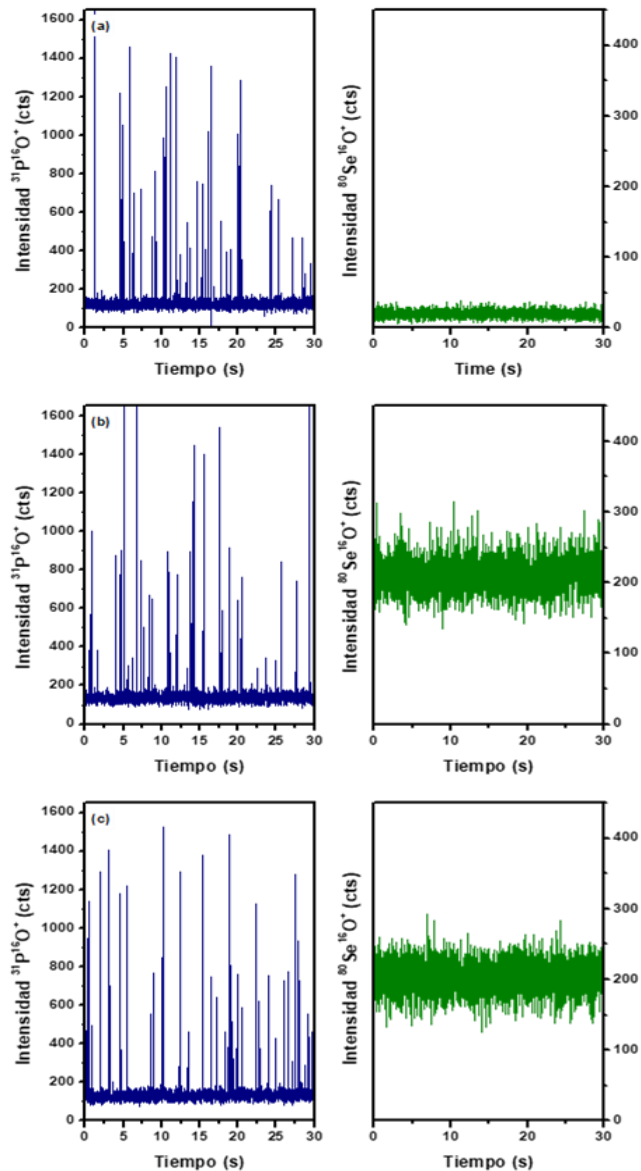


Figura 51. Resultados de la medida mediante SC-ICP-MS de la muestra *Levadura1* monitorizando  $^{31}\text{P}$  (como  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y  $^{80}\text{Se}$  (como  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) antes (a) y después de añadir (b) selenometionina y (c) selenito sódico a la suspensión celular.

Los eventos de fósforo como marcador celular en las tres muestras confirman la correcta introducción de las células individuales de levadura. Sin embargo, el principio de SC-ICP-MS permite distinguir entre selenio realmente incorporado en las células de levadura (Figura 49) y la adición de selenio en forma de selenometionina (Figura 51(b)) y selenito sódico (Figura 51(c)) que causa un aumento en el fondo de selenio obtenido respecto a la muestra de partida (Figura 51(a)), pero no la aparición de eventos celulares.

El método de *single cell* ICP-MS propuesto permitió, por tanto, la evaluación de la incorporación de selenio en células individuales de levadura. Este podría ser utilizado en

la producción de levaduras enriquecidas en selenio para la evaluación en tiempo real del nivel de incorporación de dicho elemento constituyendo una herramienta rápida para distinguir entre selenio incorporado en la célula y selenio extracelular. Tras los resultados obtenidos, los siguientes estudios se centraron en las muestras enriquecidas en selenio, SELM-1 y Se-levadura1, con el fin de desarrollar estrategias para investigar la presencia de nanopartículas de selenio en su interior.

### **4.2.1.2. Estudio de la presencia de nanopartículas biogénicas de selenio en células de levadura**

Las nanopartículas de selenio tienen un amplio uso en medicina, terapia y remediación ambiental. Han sido examinadas por sus actividades antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas, y pueden ser sintetizadas por diferentes organismos como plantas, bacterias y hongos.<sup>327</sup> Recientemente, el grupo de Lobinski y colaboradores llevó a cabo la detección y caracterización de nanopartículas biogénicas de selenio en levaduras selenizadas mediante estrategias de *single particle* ICP-MS.<sup>298</sup> Para la lisis celular, estos autores utilizaron un largo procedimiento basado en una digestión enzimática de varios pasos. En este capítulo se muestra el desarrollo de un procedimiento alternativo basado en una ruptura mecánica de las células. Para ello, como en el apartado anterior, se suspendieron 10 mg tanto de la muestra SELM-1 como Se-levadura1 en agua y las suspensiones resultantes se lavaron tres veces mediante centrifugación. Posteriormente, como se detalló en la parte experimental (apartado 3.4.2.), las células de levadura se rompieron mezclando 1 mL de las suspensiones celulares con partículas de vidrio de 0,5 mm de diámetro, sonicación y agitación en el vórtex. Tras la ruptura de las células, la mezcla resultante se pasó a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para eliminar las partículas de vidrio, posibles restos celulares e incluso células enteras que hayan podido soportar el proceso de lisis.

Tras la lisis mecánica de las células de levadura y su posterior filtración, se comprobó la ausencia de células enteras de levadura en las suspensiones resultantes mediante citometría de flujo. Mediante la misma estrategia utilizada previamente para el conteo celular, se comparó el conteo obtenido en una muestra antes y después de la lisis

(Figura 52). De esta manera, se obtuvo una eficiencia del proceso para eliminar células de levadura del 99,87 %.

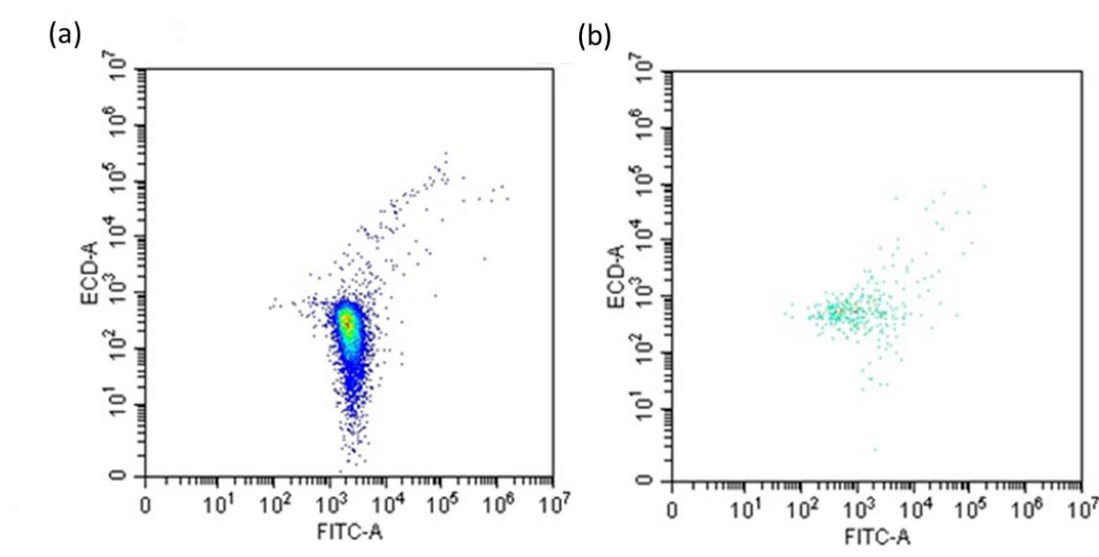


Figura 52. Contaje de levaduras mediante citometría de flujo (a) antes y (b) después de la lisis con partículas de vidrio y su posterior filtración.

La presencia de nanopartículas de selenio en los lisados celulares obtenidos de esta forma se estudió mediante diferentes estrategias analíticas, que se detallan a continuación.

## I. Estudio de la presencia de nanopartículas de selenio mediante SP-ICP-MS

Para el análisis de los lisados de las muestras de levadura enriquecidas en selenio, SELM-1 y Se-levadura1, estos se introdujeron al ICP-MS en modo *single-particle* utilizando el mismo sistema de introducción de muestra y parámetros instrumentales que para la medida de células individuales, resumidos en la Tabla 4.

Sin embargo, para garantizar que el procedimiento de lisis mecánica desarrollado no afecta a las nanopartículas de selenio en términos de tamaño y concentración, se sometió un patrón comercial de nanopartículas de selenio de 50 nm de diámetro en promedio al mismo procedimiento mecánico que las células. Para ello, el patrón de SeNPs se diluyó en agua a una concentración de selenio total de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . En este punto una alícuota de la suspensión se mezcló con las partículas de vidrio y se sometió a sonicación

y agitación como se describió anteriormente para las células. Finalmente, tanto la suspensión de partida como la sometida al proceso mecánico se diluyeron en agua a una concentración de selenio de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  para su medida. Los resultados de la medida de SP-ICP-MS monitorizando  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  antes y después del tratamiento se representan en la Figura 53 y demuestran que el impacto mecánico de las partículas de vidrio en las nanopartículas de selenio fue despreciable, ya que no se obtuvieron cambios ni en el número de eventos obtenidos ni en su intensidad. Concretamente, tras filtrar los eventos con el criterio  $3\sigma$ , se obtuvieron 1058 eventos con una intensidad promedio de  $27 \pm 17$  cts antes del tratamiento y 902 eventos de  $29 \pm 18$  cts de intensidad después del mismo.

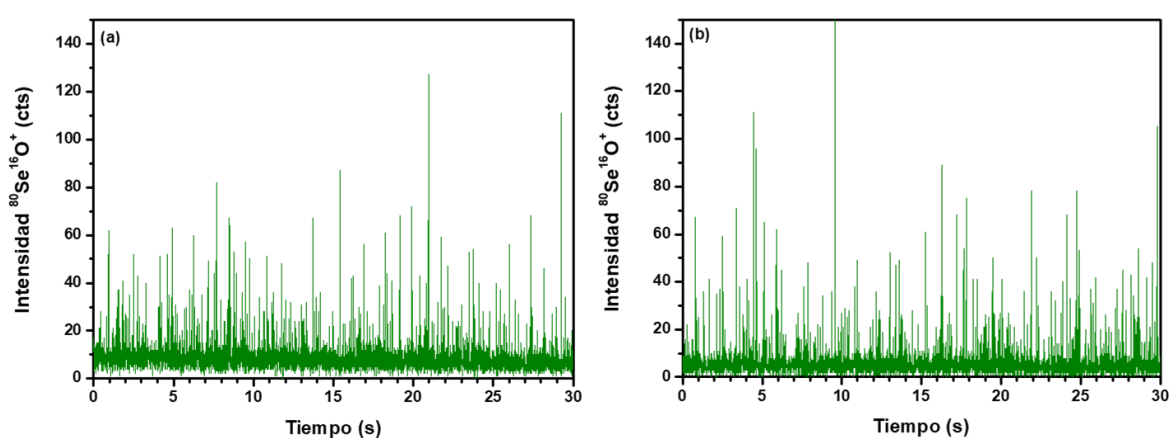


Figura 53. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de una suspensión de nanopartículas de selenio (a) antes y (b) después del tratamiento mecánico con partículas de vidrio.

Posteriormente se analizaron los lisados de las muestras Se-levadura1 y SELM-1. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 54 y Figura 55, respectivamente. Las medidas de fósforo revelaron la eficacia del proceso de lisis celular (los eventos de fósforo deben de desaparecer si la lisis es correcta) y eliminación de restos celulares ya que apenas se observaron eventos de este elemento, utilizado como marcador celular por ser un elemento constitutivo mayoritario en las células. Sin embargo, en la muestra Se-levadura1 se observaron múltiples eventos de selenio tras la ruptura de las células (Figura 54(b)). Esta observación constituyó un primer indicio de la presencia de partículas compuestas, al menos en parte, de selenio.



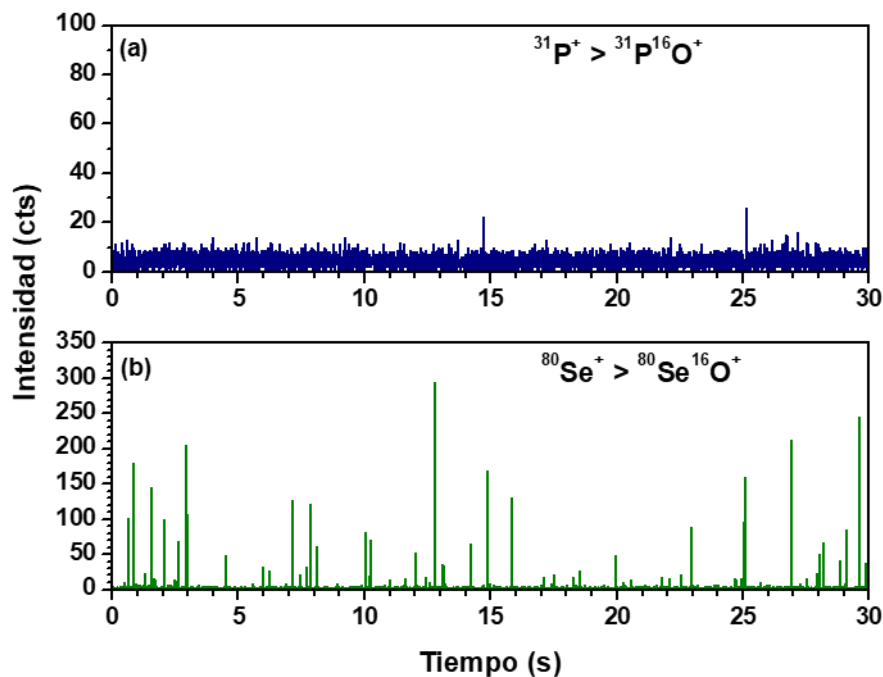


Figura 54. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 monitorizando (a)  $^{31}\text{P}$  (como  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b)  $^{80}\text{Se}$  (como  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms, después de la lisis celular.

En el caso de la muestra SELM-1, aunque se obtuvieron algunas señales de fósforo, estas son despreciables en comparación con el análisis de la muestra antes de la lisis celular (Figura 49), lo que indica que el procedimiento de lisis funcionó correctamente también en esta muestra. No obstante, la ausencia de señales de selenio (Figura 55(b)) indica que bien en esta muestra no existen nanopartículas de Se o bien son demasiado pequeñas para ser detectadas con este tipo de medidas (LOD en tamaños de 40 nm utilizando un tiempo de integración de 5 ms, ver Tabla 6).

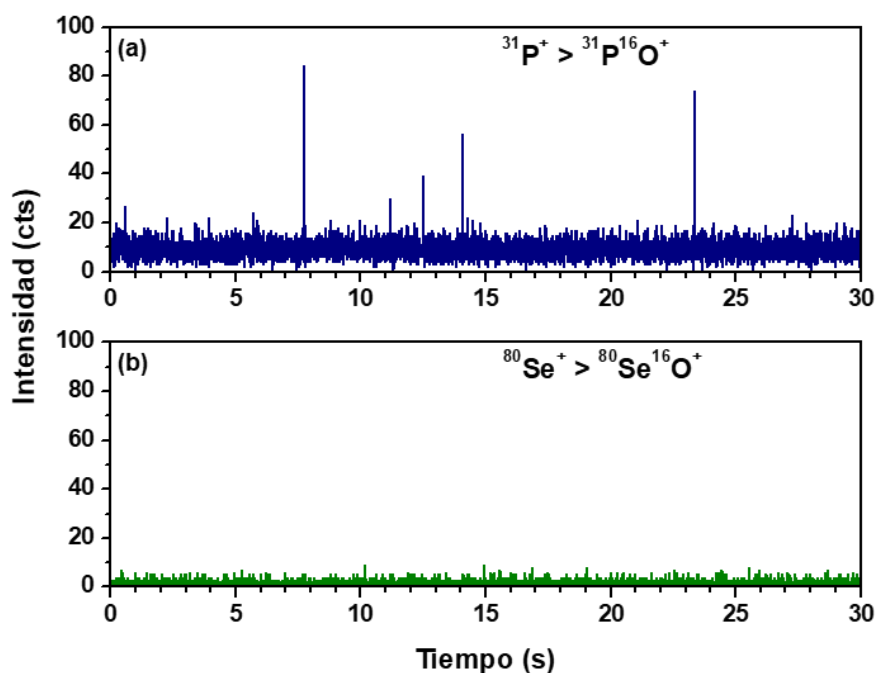


Figura 55. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra SELM-1 monitorizando (a)  $^{31}\text{P}$  (como  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) y (b)  $^{80}\text{Se}$  (como  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) con un tiempo de integración de 5 ms, después de la lisis celular.

En medidas adicionales, se utilizó un tiempo de integración significativamente menor, de 100  $\mu\text{s}$ , para mejorar la relación señal/ruido de la medida y disminuir el límite de detección. Se calculó el límite de detección para la medida de selenio utilizando diferentes tiempos de integración, tanto en masa como en tamaño, considerando nanopartículas esféricas de selenio elemental y aplicando el criterio  $3\sigma$ . Los resultados se muestran en la *Tabla 6*. El límite de detección en tamaños utilizando un tiempo de integración de 100  $\mu\text{s}$  fue de aproximadamente 20 nm. En estas condiciones, tampoco se detectó ningún evento de selenio, por lo tanto, se descartó la presencia de nanopartículas de selenio de diámetro mayor de 20 nm en esta muestra.

Tabla 6. Límites de detección (en masa y tamaño) para la medida de selenio con diferentes tiempos de integración.

Tiempo de integración	LOD (fg)	LOD (nm)
10 ms	0,23	45,3
5 ms	0,16	40,0
1 ms	0,07	31,0
500 $\mu\text{s}$	0,05	27,2
100 $\mu\text{s}$	0,02	20,8

Continuando con los eventos de selenio obtenidos para la muestra Se-levadura1, mediante un calibrado externo con patrones inorgánicos de selenio, se pudo calcular la masa de selenio en cada nanopartícula, siguiendo el procedimiento habitual. Siempre que las potenciales nanopartículas estén compuestas de selenio elemental y asumiendo una morfología esférica, se pudo transformar la masa de la partícula en diámetro de partícula mediante la ecuación (6):

$$dp = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot mp}{\pi \cdot \rho}} \cdot 10^4 \quad (6)$$

Donde  $dp$  es el diámetro de partícula (nm),  $mp$  la masa de la nanopartícula (ng) y  $\rho$  es la densidad ( $\text{g cm}^{-3}$ ). Con estos cálculos se obtuvo la distribución de tamaños que se muestra en la Figura 56 con un rango de diámetros entre 50 y 250 nm, un valor medio de 111 nm y una mediana de 103 nm. Distribuciones de tamaños similares se obtuvieron en otros trabajos.<sup>298</sup>

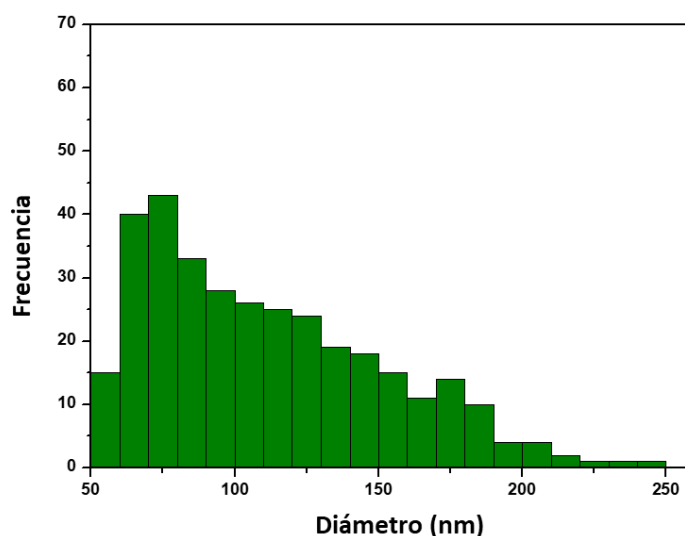


Figura 56. Distribución de tamaños obtenida en el lisado de la muestra Se-levadura1 mediante SP-ICP-MS.

Con el objetivo de obtener más evidencias sobre la presencia de estas nanopartículas, se realizaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la misma suspensión obtenida tras la lisis mecánica utilizada en los análisis anteriores. Para ello, se depositaron 150  $\mu\text{L}$  del lisado de la muestra Se-levadura1 en gradillas de cobre y se dejó evaporar el disolvente. Se realizaron imágenes de TEM en dos

microscopios diferentes, el microscopio MET JEOL-2000 operado a 160 kV y el microscopio de alta resolución JEOL JEM-2100F a 200 kV. Efectivamente, las imágenes mostraron la presencia de nanopartículas con diámetros entre 100 y 200 nm (Figura 57(a)). Debido a su baja abundancia, no se pudo obtener un histograma representativo del tamaño de estas.

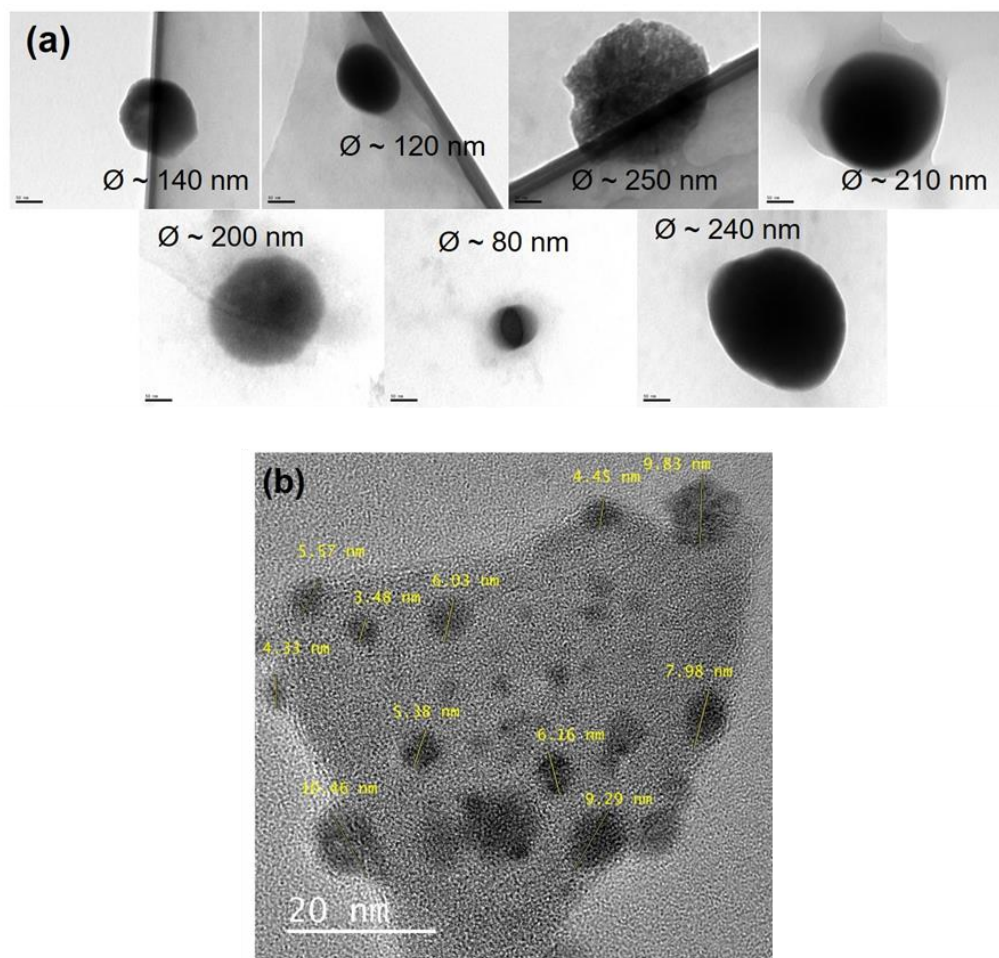


Figura 57. Imágenes de TEM de la suspensión obtenida tras la lisis celular y filtración de la muestra *Se-levadura1*. (a) Algunas partículas detectadas con diámetros entre 80 y 250 nm aproximadamente (barra de escala de 50 nm), y (b) Imagen de TEM de alta resolución donde se aprecia la presencia de partículas con diámetros entre 3,5 y 10,5 nm.

Con la ayuda del microscopio de alta resolución (HR-TEM), se observó un número significativo de nanopartículas de menor tamaño, con diámetros entre 3,5-10,5 nm, en la misma suspensión (Figura 57(b)). Estos tamaños de nanopartícula están por debajo del límite de detección de la técnica de SP-ICP-MS (40 nm utilizando 5 ms de tiempo de integración y considerando nanopartículas esféricas de selenio elemental) por lo que no se pudieron detectar mediante esta técnica. Además, el microscopio de alta resolución

está equipado con un microanalizador de energía dispersiva de rayos-X (EDX) que permitió evaluar la composición elemental de la muestra, confirmado la presencia de selenio en las nanopartículas observadas, como se puede ver en la Figura 58.

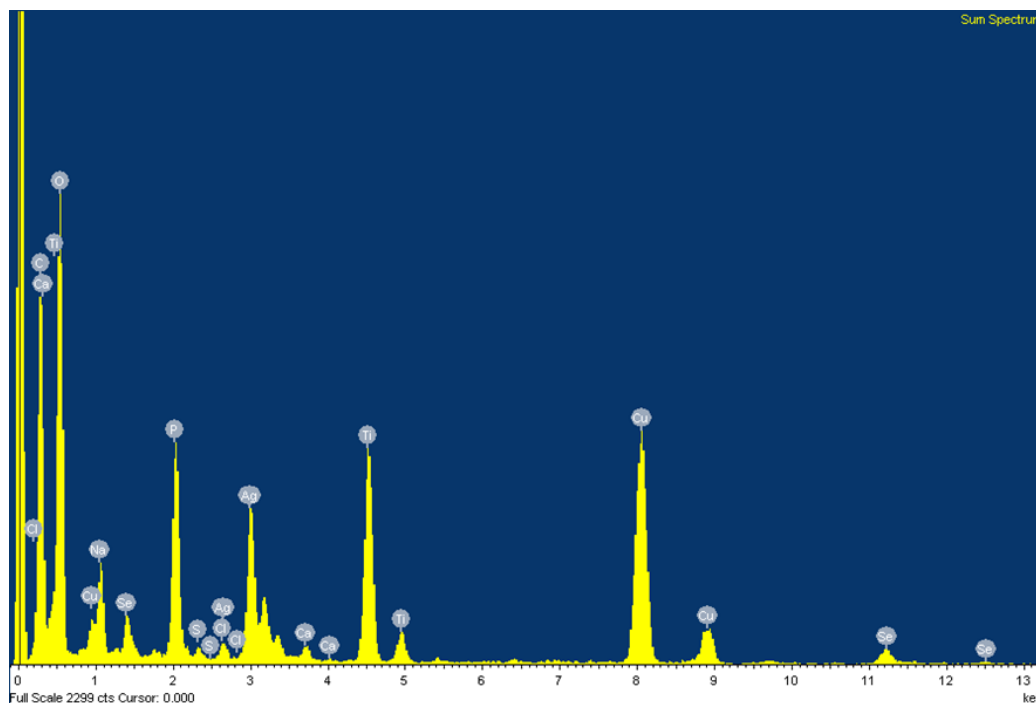


Figura 58. Espectro de EDX correspondiente a la imagen de HR-TEM que se muestra en la Figura 57(b), que indica la presencia de selenio.

Para investigar la presencia de nanopartículas de selenio con un tamaño menor al límite de detección de la metodología de SP-ICP-MS propuesta se utilizó el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

## II. Estudio de la presencia de nanopartículas de selenio mediante HPLC-ICP-MS

Como estrategia alternativa que permita el análisis de nanopartículas de menor tamaño se estudió la posibilidad de emplear el acoplamiento HPLC-ICP-MS desarrollado previamente en el grupo de investigación que demostró ser adecuado para la separación y detección de nanopartículas de menor tamaño (< 50 nm) de otros elementos.<sup>237,328</sup> El método cromatográfico se basa en el uso de una columna de fase reversa tipo C18 con un tamaño de poro de 1000 Å. Tras la adición de SDS en la fase móvil, se modifica la fase estacionaria de la columna consiguiendo una elución de las nanopartículas en función de

su tamaño mediante un mecanismo similar a la exclusión por tamaños, excepto para las partículas de mayor tamaño que no eluyen de la columna. Por lo tanto, las nanopartículas más grandes eluyen antes de la columna, seguidas de las de menor tamaño, permitiendo distinguir entre nanopartículas de diferentes tamaños y sus correspondientes especies de bajo peso molecular. En general, la resolución cromatográfica (R) entre partículas de diferentes tamaños depende fuertemente de su dispersión.

Para llevar a cabo las separaciones cromatográficas se acopló el equipo de HPLC Agilent 1260 series (Agilent Technologies) al ICP-TQ-MS utilizado a lo largo de este capítulo, en este caso con un tiempo de integración de 100 ms. Para ello, la salida de la columna se acopló directamente al ICP-MS equipado en este caso con un nebulizador concéntrico MicroMist y una cámara de nebulización ciclónica (ambos de ESI Elemental Service & Instruments GmbH). Las condiciones cromatográficas se pueden ver en la Tabla 7.

*Tabla 7. Condiciones de la separación cromatográfica con detección por ICP-TQ-MS.*

Columna	Nucleosil C18, 7 $\mu\text{m}$ , 1000 $\text{\AA}$ (250x4,6 mm)
Fase móvil	Acetato de amonio, SDS (ambos 10 $\text{mmol L}^{-1}$ ), pH 6,8
Flujo de fase móvil	0,5 $\text{mL min}^{-1}$
Volumen de inyección	20 $\mu\text{L}$
Tiempo de adquisición	480 s

La calibración de la columna se llevó a cabo diariamente mediante la inyección de patrones de nanopartículas de oro certificados de 10 y 30 nm (NIST RM 8011 y 8012, respectivamente) y un patrón inorgánico de oro. En la Figura 59, se muestra la separación obtenida en la que el pico de menor tiempo de retención corresponde a las nanopartículas de 30 nm (trazo negro) seguidas de las nanopartículas de 10 nm (trazo rojo) y, finalmente, el oro inorgánico (trazo azul).

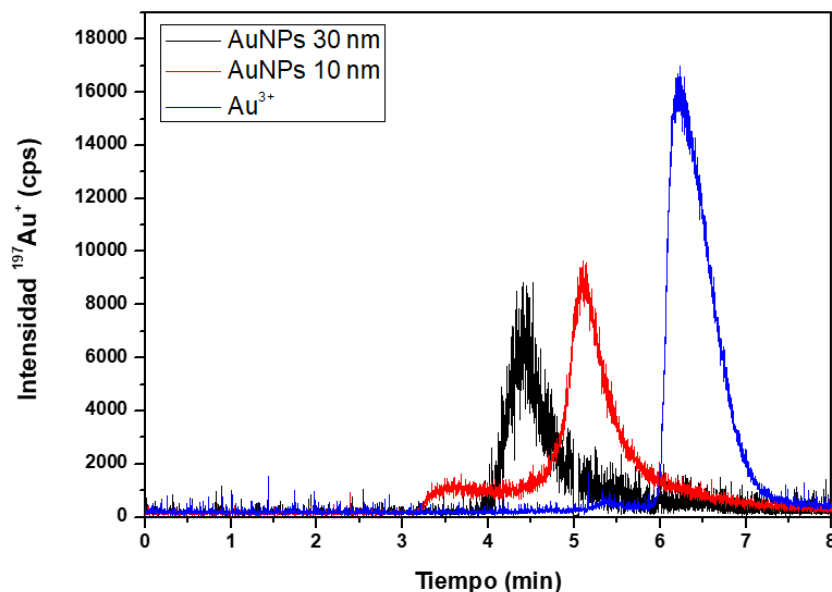


Figura 59. Cromatograma de HPLC-ICP-MS que muestra la separación de AuNPs de 30 nm (negro), 10 nm (rojo) y especies de oro de bajo peso molecular (azul).

Esta separación cromatográfica se aplicó a las suspensiones obtenidas tras la lisis de las levaduras enriquecidas en selenio, para investigar la presencia de nanopartículas de selenio de menor tamaño, no detectables mediante SP-ICP-MS. Además, para comprobar la presencia de selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ) como componente mayoritario de las nanopartículas detectadas, la separación cromatográfica fue realizada en el extracto celular antes y después de la adición de sulfito sódico,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . El sulfito reacciona selectivamente con el selenio elemental<sup>329,330</sup> degradando las nanopartículas y dando lugar a la formación de selenosulfato ( $\text{SeSO}_3^{2-}$ ), según la reacción (7) lo que implicaría una disrupción de las nanopartículas así como la posible aparición de nuevos picos cromatográficos de Se:



Para ello, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada lisado se mezcló con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sulfito sódico 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ . La mezcla se calentó a 50  $^\circ\text{C}$  durante 20 min. Tras su enfriamiento a temperatura ambiente, la mezcla se inyectó al sistema HPLC-ICP-MS y los cromatogramas obtenidos se compararon con los correspondientes a la misma muestra antes de la derivatización con sulfito, diluidos 1:1 en agua para su inyección en la misma dilución que las muestras derivatizadas.

En la Figura 60, se muestra los cromatogramas comparativos para la muestra Se-levadura1. En el cromatograma obtenido antes de la adición de sulfito sódico (trazo azul), se obtienen dos picos mayoritarios. El primer pico, con un tiempo de retención de 4,9 min, corresponde a la fracción de nanopartículas que contienen selenio. Comparando este tiempo de retención con el obtenido para los patrones de nanopartículas de oro de tamaño conocido, los cromatogramas indicaron la presencia de SeNPs con diámetros comprendidos entre 4 y 6 nm. Estos resultados concuerdan perfectamente con las imágenes obtenidas mediante TEM de alta resolución en esta muestra (Figura 57). El segundo pico, con un tiempo de retención de 5,7 min, se asoció a la presencia de especies de selenio de bajo peso molecular, probablemente selenito.

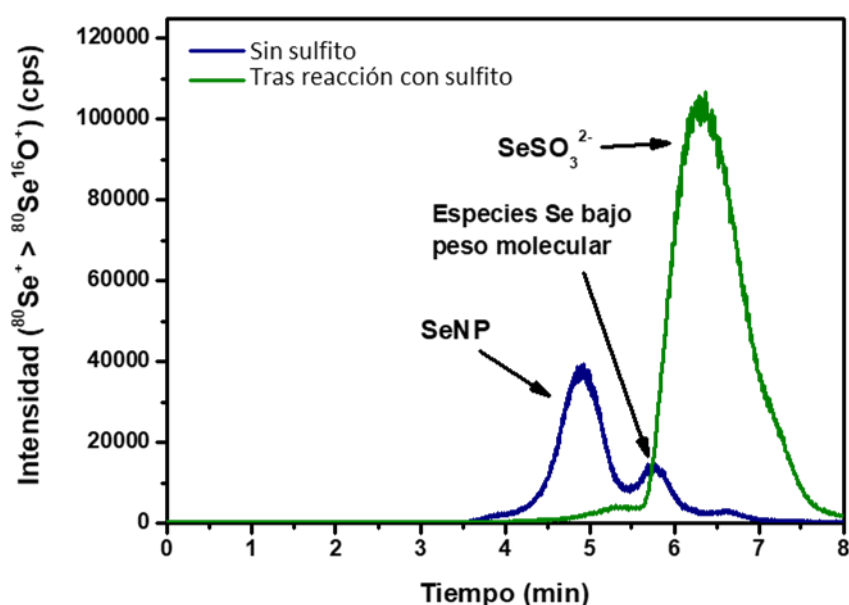


Figura 60. Cromatograma de HPLC-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 tras la lisis celular, antes (azul) y después (verde) de la reacción con sulfito.

Después de la reacción con sulfito en las condiciones descritas anteriormente, (trazo verde en la Figura 60), se observaron dos cambios relevantes. Primero, la señal de la fracción de SeNPs desaparece casi por completo. Esta observación indica el rendimiento cuantitativo de la reacción de derivatización realizada y la presencia de partículas formadas por selenio elemental en el rango de tamaños mencionado anteriormente. Revisando la bibliografía, puede observarse que resultados similares fueron encontrados en otros microorganismos después de la incubación con altas concentraciones de selenito.<sup>331,332</sup> Se sugiere que la reducción microbiana de selenito a selenio elemental



sirve generalmente con un mecanismo de detoxificación, que también podría ser llevada a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* en este caso.

El segundo cambio drástico está relacionado con la formación del producto de la reacción, presumiblemente el selenosulfato. El pico observado en el trazo verde de la Figura 60 a un tiempo de retención de 6,4 min representa su formación. Sin embargo, la intensidad obtenida para este pico es desproporcionadamente alta en comparación con la fracción de SeNPs obtenida inicialmente. Una posible explicación a esta observación reside en la presencia de SeNPs de mayor tamaño, detectadas previamente en esta muestra mediante SP-ICP-MS y observadas en las imágenes de TEM (Figura 54 y Figura 57(a), respectivamente) y que bajo las condiciones cromatográficas utilizadas no eluyen de la columna.<sup>333</sup> No obstante, estas nanopartículas de mayor tamaño están presentes igualmente en la suspensión obtenida después de la lisis celular sobre la que se realizó la reacción de derivatización con sulfito. Siempre que estas SeNPs hayan reaccionado con el sulfito sódico, son esperables altas intensidades del pico correspondiente a la formación de selenosulfato.

Asimismo, se decidió evaluar la reacción de derivatización del sulfito con selenio elemental mediante SP-ICP-MS en las condiciones utilizadas en el apartado anterior. Las medidas de la Figura 61 muestran una disminución significativa del número de eventos y, por lo tanto, del número de partículas en la suspensión tras la reacción con sulfito. En concreto, el número de partículas se redujo en un 78 %. Estos resultados demostraron que al menos una parte importante de la fracción de SeNPs de mayor tamaño también están compuestas de Se<sup>0</sup>.

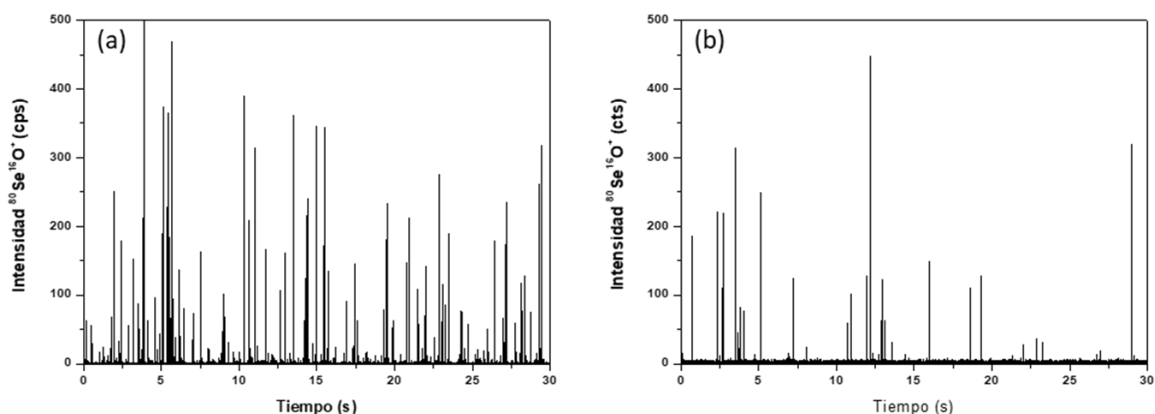


Figura 61. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la muestra Se-levadura1 después de la lisis celular: (a) antes y (b) después de la reacción con sulfito sódico, con un tiempo de integración de 5 ms.

Paralelamente, se evaluó la presencia de nanopartículas en el material de referencia SELM-1, también mediante HPLC-ICP-MS. En el análisis de esta muestra mediante SP-ICP-MS no se habían detectado señales de selenio, descartando la presencia de SeNPs con un diámetro mayor de 40 nm (Figura 55). Sin embargo, la aplicación del método de HPLC-ICP-MS propuesto permite la discriminación de partículas de menor tamaño, como se ha visto. La Figura 62 muestra un cromatograma de la muestra SELM-1 después de la lisis celular (trazo azul). En esta ocasión, además de la presencia de especies de selenio de bajo peso molecular (tiempo de retención entre 5,8 y 7 min aproximadamente), se observó una señal entre 4 y 5,8 min. Esta observación constituye el primer indicio de la presencia de SeNPs de menor tamaño en esta muestra. Este tiempo de retención coincide con el obtenido en el análisis del material de referencia NIST 8011 (nanopartículas de oro de 10 nm de diámetro).

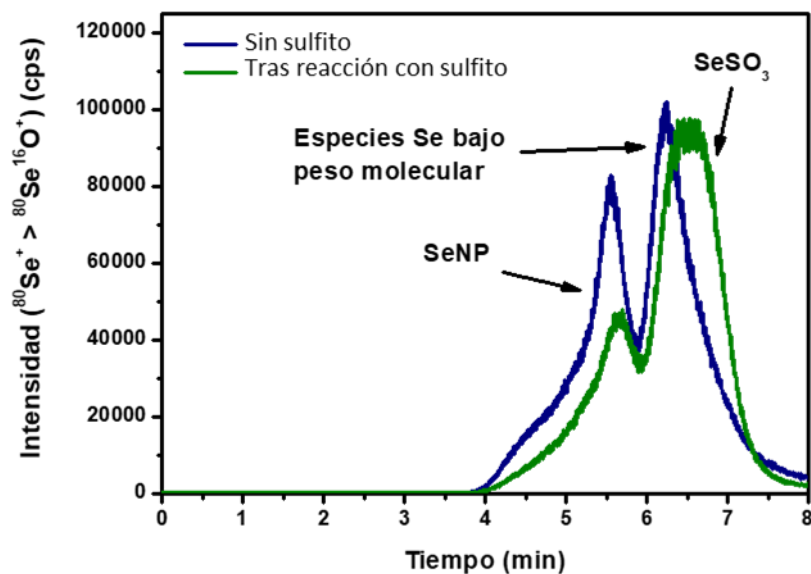


Figura 62. Cromatograma de HPLC-ICP-MS de la muestra SELM-1 tras la lisis celular, antes (azul) y después (verde) de la reacción con sulfito.

Para confirmar estos resultados, se recogió la fracción cromatográfica entre 4 y 6 min para su análisis mediante HR-TEM. En las imágenes obtenidas, como la que se puede ver en la Figura 63, se aprecian principalmente nanopartículas esféricas con diámetros comprendidos entre 4 y 7 nm. Los resultados obtenidos mediante HPLC-ICP-MS y HR-TEM concuerdan y demuestran la presencia de estas SeNPs de pequeño tamaño en las células de levadura del material de referencia SELM-1.

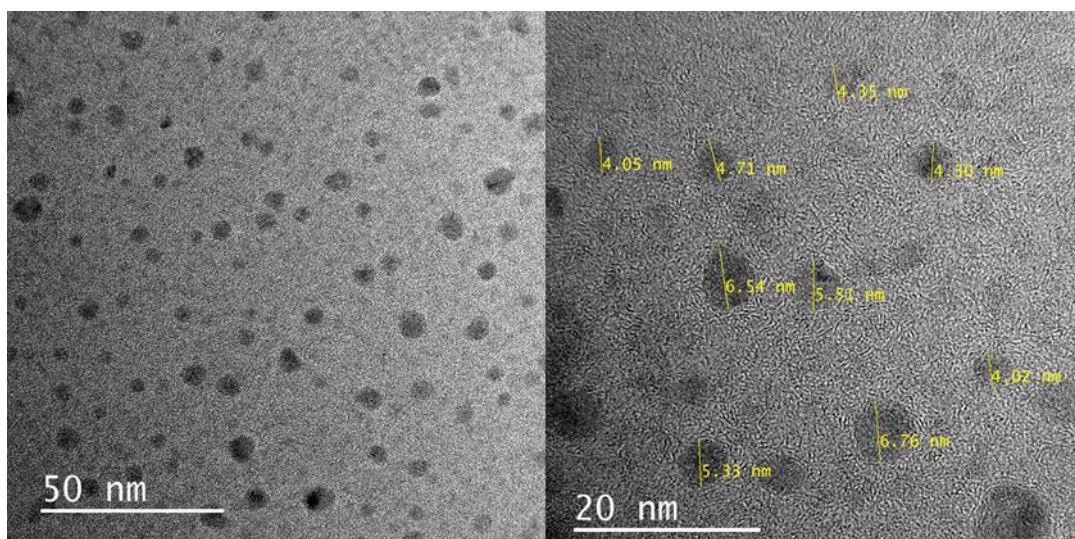


Figura 63. Imágenes de HR-TEM de la fracción cromatográfica recogida de la muestra SELM-1.

Adicionalmente, se derivatizó la suspensión obtenida tras la lisis de SELM-1 con sulfito para su posterior medida por HPLC-ICP-MS. En comparación con el cromatograma obtenido antes del tratamiento, el cromatograma resultante, representado por el trazo verde en la Figura 62, mostró un descenso en la señal correspondiente a la fracción de SeNPs, indicando la presencia de selenio elemental, de forma análoga a los resultados obtenidos previamente en la muestra Se-levadura1. No obstante, en este caso, un pico de menor intensidad permanece en ese tiempo de retención. Este pico pertenece a especies de selenio no identificadas que coeluyen con la fracción de SeNPs. Podría tratarse de nanopartículas de selenio de otra composición (no selenio elemental) o especies de mayor peso molecular como proteínas con selenometionina en su secuencia aminoacídica.

Estos resultados confirman por primera vez la presencia de nanopartículas de selenio biogénicas en levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en medios de cultivo con niveles de selenio en las bajas ppm. Estas están presentes dentro de las células en un rango entre 4-7 nm según las imágenes de TEM obtenidas y, al menos parte de ellas, están compuestas por selenio elemental. Asimismo, se podría seguir investigando para estudiar la presencia de SeNPs de diferente composición. Otro aspecto que requiere trabajo futuro es la cuantificación de las nanopartículas detectadas. La metodología propuesta no es totalmente cuantitativa, necesitando de una optimización de los diferentes procesos, con especial atención en la lisis celular y purificación de las nanopartículas de selenio.

Diferentes técnicas analíticas fueron aplicadas para evaluar la posible presencia de nanopartículas compuestas por selenio en *Saccharomyces cerevisiae*. Con la ayuda de *single particle* ICP-MS, fue posible la detección de nanopartículas de selenio biogénicas, siempre que su tamaño sea mayor al límite de detección de la técnica (20 nm utilizando un tiempo de integración de 100  $\mu$ s). Para la detección de NPs de tamaños inferiores, se requirió de técnicas complementarias como TEM y HPLC-ICP-MS cuya aplicación fue demostrada satisfactoriamente en este estudio. En el futuro se espera que las técnicas basadas en ICP-MS reciban creciente atención para la caracterización de SeNPs biogénicas, por sus importantes propiedades como agentes antioxidantes o antimicrobianos.

## 4.2.2. Empleo de técnicas complementarias basadas en ICP-MS para el estudio de la degradación de nanopartículas de oro en tejidos animales

En las últimas dos décadas, el uso industrial de nanomateriales (NMs) se ha incrementado enormemente, surgiendo la preocupación por su impacto en el medio ambiente y en la biosfera. Entre ellos, las nanopartículas de oro (AuNPs) atraen gran interés debido a su utilización en electrónica, catálisis, células solares y, sobre todo, en aplicaciones biomédicas. La evaluación del impacto potencial de estos materiales emergentes en los organismos vivos requiere de técnicas analíticas capaces de proporcionar información de su composición elemental, tamaño, forma y concentración, además de la posible liberación de especies iónicas en el caso de nanomateriales metálicos.<sup>239,334</sup>

El gran interés de detectar NPs en muestras medioambientales y biológicas ha fomentado el desarrollo de métodos para el análisis de AuNPs y, particularmente, la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) ha resultado ser una herramienta muy útil en diversas aplicaciones. Además de las técnicas híbridas como fraccionamiento en campo de flujo de flujo asimétrico (*asymmetrical flow field-flow fractionation, AF4*),<sup>335-337</sup> cromatografía líquida<sup>338,339</sup> y electroforesis<sup>340,341</sup> acopladas al ICP-MS, el análisis de partículas individuales (SP-ICP-MS) ha resultado ser una potente alternativa gracias a su simplicidad, rapidez y la valiosa información proporcionada, teniendo la capacidad de detectar la presencia de iones solubles junto con las NPs.<sup>40,41</sup>

Todas estas técnicas se combinaron con diferentes estrategias de extracción para estudiar el destino de NPs en muestras biológicas en estudios previos llevados a cabo en distintas publicaciones.<sup>342</sup> En estos experimentos, los tejidos se solubilizaron con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) obteniendo recuperaciones entre el 86 y el 123 % de AuNPs de 10 y 60 nm como Au total. Sin embargo, la separación de las AuNPs extraídas de esta manera mediante AF4 no tuvo éxito.<sup>336</sup> La extracción mediante TMAH fue adecuada para el análisis de Au y AgNPs en carne picada utilizando SP-ICP-MS.<sup>343</sup>

Loeschner y colaboradores compararon el uso de digestiones alcalinas (TMAH) y digestiones enzimáticas (proteínasa K) para el análisis por SP-ICP-MS de AuNPs de 60 nm en tejidos de bazo de rata Wistar después de su inyección intravenosa.<sup>344</sup> Los resultados revelaron una recuperación significativamente menor en la digestión enzimática debido a la menor eficiencia de transporte de las AuNPs en presencia de residuos de tejido de la digestión. Por otro lado, se analizaron AuNPs en plantas de tomate mediante SP-ICP-MS tras su extracción mediante la enzima Macerozima R-10.<sup>345</sup> Jenkins y colaboradores investigaron el uso de SP-ICP-MS para diferenciar AuNPs de sus agregados tras ser adicionadas en muestras de sangre.<sup>346</sup>

Posteriormente, el uso de métodos basados en cromatografía líquida acoplada a ICP-MS cobró importancia debido a su capacidad para distinguir entre metales asociados a NPs y sus correspondientes especies iónicas.<sup>328,347</sup> En un trabajo reciente, se analizaron células HeLA y su medio de cultivo después de la incubación con AuNPs de 10 nm o Au<sup>3+</sup> para estudiar su transformación en ambos medios.<sup>348</sup> Un estudio similar se llevó a cabo en lisados de células de alga tras su incubación con AuNPs de 10 nm o Au<sup>3+</sup>.<sup>349</sup> Recientemente, se estudió el uso de HPLC-ICP-MS para el análisis de AuNPs de 10 nm (NIST RM 8011) en hígado y bazo de ratas Wistar después de su inyección intraperitoneal.<sup>259</sup> Tras la solubilización con proteínasa K, una parte notable del Au total (~ 30 %) resultó estar presente como especies iónicas indicando la importancia de los procesos de degradación de las nanopartículas durante su transporte, acumulación y metabolismo en los organismos vivos. Esta degradación de las AuNPs también fue observada para otros tamaños de partícula.<sup>258</sup>

Entender el destino de las AuNPs en los sistemas biológicos es, por tanto, de suma importancia, y se requieren técnicas analíticas para monitorizar su acumulación y posible degradación. En este apartado, se pretende realizar un estudio comparativo de las técnicas SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS y TEM para el seguimiento de AuNPs estabilizadas con citrato en tejidos de hígado de rata tras su inyección intraperitoneal. Se pretende demostrar que el uso de estas técnicas puede proporcionar datos complementarios que ofrezcan una idea más completa sobre la degradación y transformación de AuNPs en sistemas biológicos.

#### **4.2.2.1. Administración de las nanopartículas de oro**

Para el estudio se utilizaron dos ratas Wistar adultas de entre 180-200 g de peso. Se inyectó a una de las ratas una suspensión de nanopartículas de oro de 40 nm estabilizadas con citrato por vía intraperitoneal, es decir, directamente en la cavidad abdominal que contiene los órganos abdominales. Se inyectaron 2 mL de la suspensión de nanopartículas a una concentración de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A la segunda rata, utilizada como control, se le inyectó el mismo volumen de agua ultrapura.

Cuatro horas después de la administración de nanopartículas, las ratas fueron anestesiadas mediante una disolución de ketamina (0,75  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y xilacina (0,10  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Finalmente fueron desangradas mediante canulación de la aorta posterior. El hígado de los animales fue extraído, pesado y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Todos los experimentos realizados con las ratas se llevaron a cabo de acuerdo con las guías para el cuidado y uso de los animales en el laboratorio en colaboración con el grupo del Profesor Juan Llopis, del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, y todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Granada.

#### **4.2.2.2. Extracción de nanopartículas de oro de tejidos animales**

El hígado extraído de las ratas se escindió en pequeñas porciones que se congelaron y homogeneizaron rápidamente en un mortero con nitrógeno líquido para moler y pulverizar las muestras. El polvo de hígado congelado resultante se resuspendió en el volumen apropiado de disolución de lisis (150  $\text{mmol L}^{-1}$  NaCl, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA, 20  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7,5), 1 % (v/v) Triton X-100). Concretamente, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de lisis por cada 10 mg de muestra de hígado. Esta suspensión se introdujo en un recipiente con hielo y se sometió a sonicación durante 15 min. Los lisados se lavaron mediante centrifugación a 13000 g durante 15 min ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se utilizaron para las medidas de SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS y TEM.

#### 4.2.2.3. Análisis de nanopartículas de oro mediante SP-ICP-MS, HPLC-ICP-MS y TEM

El propósito de la aplicación de diferentes técnicas analíticas basadas en ICP-MS es la obtención de información complementaria acerca de la distribución de tamaños mediante SP-ICP-MS, así como la detección de potenciales nanopartículas de pequeño tamaño y especies de oro de bajo peso molecular mediante HPLC-ICP-MS. Para la visualización directa de las nanopartículas, se utilizó TEM como técnica complementaria.

El primer paso fue la caracterización del patrón de nanopartículas utilizado para la inyección de las ratas. El tamaño nominal proporcionado por el fabricante es de 40 nm. Se obtuvieron imágenes de HR-TEM de estas nanopartículas, como la que se puede ver en la Figura 64. Tras la medida de cien nanopartículas mediante HR-TEM, se estimó una distribución de tamaños del patrón de  $37 \pm 2$  nm.

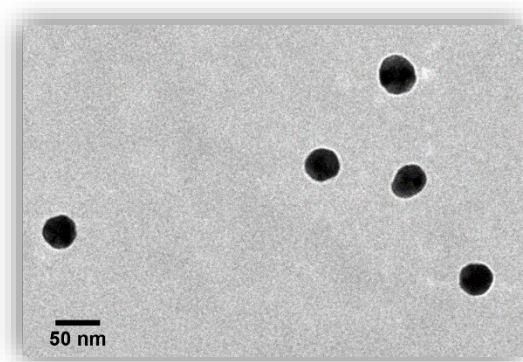


Figura 64. Imagen de HR-TEM de las AuNPs inyectadas (tamaño nominal 40 nm).

Posteriormente, se caracterizó la suspensión de AuNPs de 40 nm utilizada para la inyección intraperitoneal del animal mediante ICP-MS en modo *single particle*. Para ello, se utilizó el sistema de introducción de muestra desarrollado en el primer capítulo de esta Tesis, basado en el nebulizador Enya Mist y una cámara de paso simple y pequeño volumen. En dicho capítulo, se optimizó la concentración de metanol para obtener la mejor eficiencia de transporte y sensibilidad en las medidas mediante el uso de AuNPs de 30 nm del NIST (RM 8012). Se obtuvieron los valores óptimos para una concentración de metanol de un 10 %. Por ello, el patrón de nanopartículas se diluyó en metanol al 10 % a una concentración de  $50 \text{ ng L}^{-1}$  de oro total y se introdujo al sistema SP-ICP-MS, utilizando



los parámetros instrumentales recogidos en la Tabla 8, para caracterizar el patrón en términos de distribución de tamaños.

Tabla 8. Parámetros instrumentales del ICP-MS acoplado al sistema HPLC y en modo *single particle*.

<b>ICP-MS</b>	
Equipo	Agilent 7700
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	15,5 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas auxiliar	0,87 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas portador	1,1 L min <sup>-1</sup>
Isótopo monitorizado	<sup>197</sup> Au
Tiempo de integración	100 ms (HPLC)
	10 ms (SP-ICP-MS)
Nebulizador	Meinhard (HPLC)
	Enya Mist (SP-ICP-MS)
Cámara de nebulización	Tipo Scott (2°C) (HPLC)
	Consumo total (SP-ICP-MS)
Flujo de introducción de muestra	0,5 mL min <sup>-1</sup> (HPLC)
	10 µL min <sup>-1</sup> (SP-ICP-MS)
<b>HPLC</b>	
Equipo	Shimadzu LC-10AD
Columna	Nucleosil C18, 7 µm, 1000 Å (250x4,6 mm)
Fase móvil	Acetato de amonio, SDS (ambos 10 mmol L <sup>-1</sup> ), pH 6,8
Volumen de inyección	20 µL

Los eventos obtenidos se pueden ver en la Figura 65(a). Como se hizo anteriormente para el selenio, la intensidad de los eventos se transformó en masa de Au por nanopartícula mediante la construcción de una curva de calibrado externa con patrones inorgánicos de oro (utilizando la ecuación (2)). Posteriormente, mediante la ecuación (6), se transformó la masa de nanopartícula en diámetro, considerando una geometría esférica como la que se apreció en las imágenes de HR-TEM. De esta manera, se obtuvo la distribución de tamaños que se muestra en la Figura 65(b). El tamaño medio obtenido, de  $34 \pm 5$  nm, concuerda perfectamente con los datos obtenidos mediante TEM ( $37 \pm 2$  nm). Este resultado se utilizó como referencia en los siguientes experimentos para estudiar la posible degradación de las nanopartículas de oro.

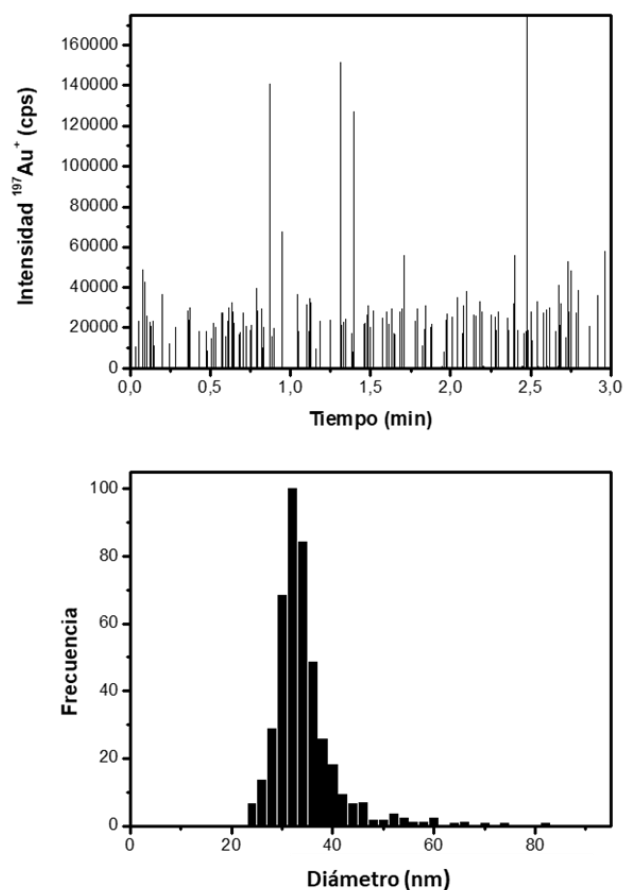


Figura 65. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de la suspensión de AuNPs de 40 nm ( $50 \text{ ng L}^{-1}$ ), y (b) distribución de tamaños resultante.

La suspensión de AuNPs de 40 nm fue inyectada de forma intraperitoneal en una rata Wistar y el hígado fue extraído y preparado para su análisis como se describió en el apartado anterior. El extracto del tejido de hígado se diluyó 1:20 en metanol al 10 % y se analizó mediante SP-ICP-MS en las mismas condiciones. Los resultados se pueden ver en la Figura 66. No se observaron efectos de matriz significativos en la sensibilidad obtenida para los eventos. Así, la distribución de tamaños resultante (Figura 66(b)) fue equivalente a la obtenida previamente para la suspensión de 40 nm original utilizada en la inyección, lo que indica que la estrategia de extracción llevada a cabo es adecuada para preservar las características de las AuNPs inyectadas.

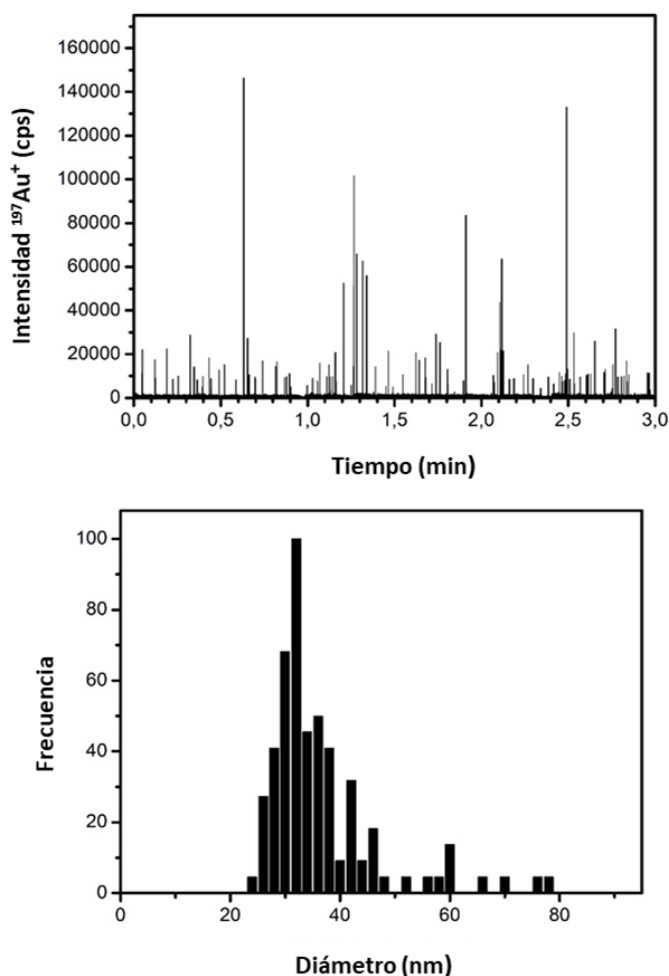
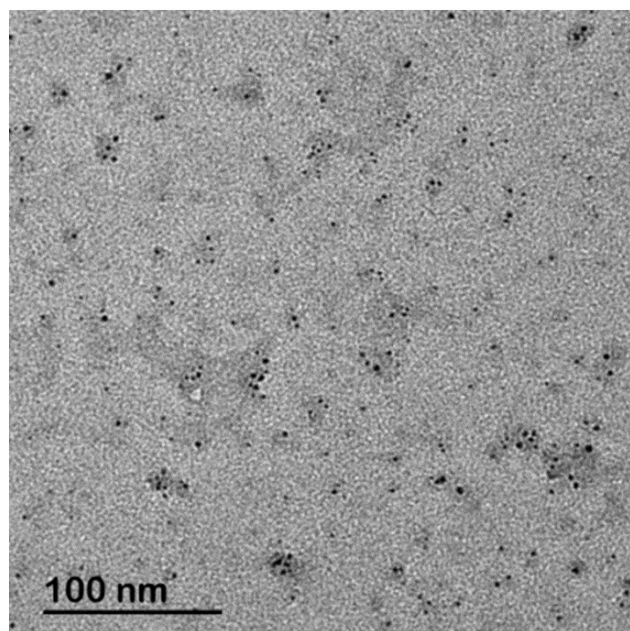


Figura 66. (a) Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de las AuNPs extraídas de hígado de rata, y (b) distribución de tamaños resultante.

En este caso, el fondo obtenido en las medidas de SP-ICP-MS fue ligeramente mayor al obtenido para la suspensión patrón, observándose un incremento de la señal de oro de aproximadamente 100 cps a 1000 cps. Esta observación sugiere la presencia de especies de oro disueltas o de nanopartículas de oro de un tamaño menor que el límite de detección de la metodología, que en las condiciones utilizadas fue de 18 nm (utilizando el criterio  $3\sigma$ ).<sup>41</sup> A su vez, esta observación indica la posible degradación de las AuNPs originalmente administradas. Esta degradación fue observada previamente en otros trabajos, por ejemplo, se observó la degradación de nanopartículas de plata en tejidos de rata tras su administración oral.<sup>350</sup>

Para demostrar estos resultados, se realizaron imágenes de TEM en los extractos obtenidos del tejido de rata. Estas imágenes deberían revelar la presencia de las AuNPs administradas inicialmente, así como posibles NPs de menor diámetro. La Figura 67

representa una imagen de HR-TEM de las AuNPs extraídas del hígado de rata. Tras la medida del diámetro de las AuNPs que aparecen en la imagen, se obtuvo una distribución de tamaños relativamente estrecha con un tamaño medio de  $6 \pm 2$  nm. Al contrario que en el análisis por SP-ICP-MS, no se observaron las AuNPs iniciales ( $37 \pm 2$  nm). Como la población de estas partículas pequeñas presenta un tamaño menor al del límite de detección obtenido para SP-ICP-MS, este método solo permitió detectar la presencia de las AuNPs de mayor tamaño, presentes en menor proporción en los extractos de hígado de rata. Las imágenes de TEM proporcionaron la primera prueba de la acumulación predominante de las nanopartículas más pequeñas en el hígado, probablemente debido a su degradación durante los procesos de transporte y/o acumulación en el tejido.



*Figura 67. Imagen de HR-TEM de las AuNPs extraídas de hígado de rata.*

Dado que el acoplamiento HPLC-ICP-MS ha demostrado ser una herramienta versátil para el análisis de Au y AgNPs en un rango de tamaños desde apenas 2 hasta 50 nm y sus correspondientes especies iónicas,<sup>258,259,333</sup> esta fue la siguiente estrategia aplicada para el análisis de las muestras. Las condiciones de la separación cromatográfica llevada a cabo se pueden ver en la Tabla 8. En estas condiciones se consigue la elución de las nanopartículas en función de su tamaño siguiendo un mecanismo similar a una exclusión por tamaños. Para el análisis, el extracto obtenido a partir de hígado de rata se diluyó 1:10 con la fase móvil (10 mmol L<sup>-1</sup> acetato de amonio, 10 mmol L<sup>-1</sup> SDS, pH 6,8)

antes de su inyección. El uso de SDS, además de ser necesario para la elución de las nanopartículas de la columna, debería facilitar la desnaturalización de proteínas y reducir la corona proteica formada alrededor de las nanopartículas. La columna se calibró antes del análisis utilizando AuNPs certificadas de 10 y 30 nm (NIST RM 8011 y 8012, respectivamente) y un patrón de oro iónico, como se mostró en el apartado 4.2.1.2 (ver Figura 59). El cromatograma obtenido para el extracto de hígado de rata en estas condiciones se puede ver en la Figura 68. En este, se pueden distinguir tres fracciones diferentes. Una fracción de nanopartículas relativamente ancha eluyó entre los 3,5 y 4,5 min, que se pudo correlacionar con la presencia de AuNPs con tamaños de alrededor de 30 nm ya que el tiempo de retención de NIST RM 8012 (AuNPs de 30 nm) fue de 3,9 min. Esta fracción representa las partículas administradas inicialmente al animal y detectadas previamente en los experimentos de SP-ICP-MS. La segunda fracción (entre 4,5 y 5 min) refleja la presencia de nanopartículas de menor tamaño, de entre 6 y 10 nm (el tiempo de retención de las AuNPs de 10 nm NIST RM 8011 fue de 4,6 min). Esta segunda fracción confirma los resultados obtenidos por TEM.

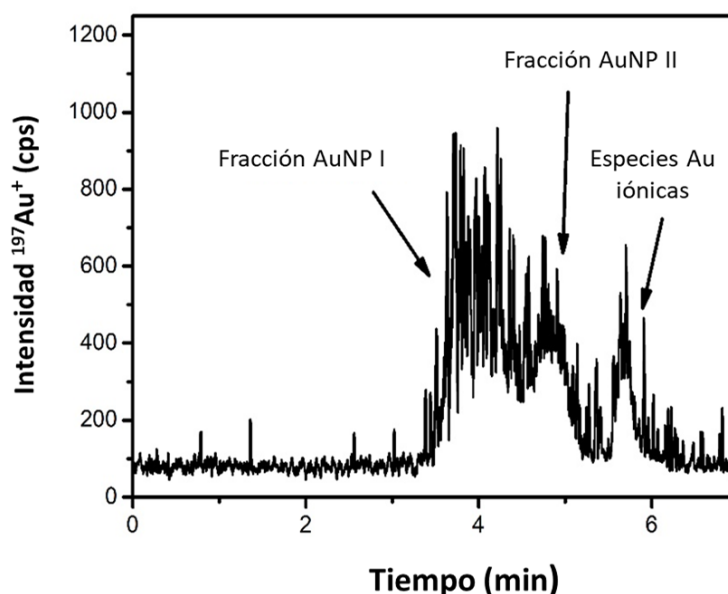


Figura 68. Cromatograma de HPLC-ICP-MS del extracto de hígado.

Comparando las áreas de pico de ambas fracciones se obtuvo una relación de aproximadamente 2:1 (fracción I : fracción II, en la Figura 68). Esto contradice los resultados de TEM en los que la fracción de AuNPs de pequeño tamaño era la predominante. Para explicar este resultado, hay que tener en cuenta que cada partícula

de la fracción de mayor tamaño (~37 nm de diámetro) contiene sobre 200 veces más átomos de Au que las partículas de menor tamaño (~6 nm de diámetro).<sup>1</sup> Esto significa que el mismo número de nanopartículas proporcionaría un pico con un área aproximadamente 200 veces mayor para las AuNPs grandes. Por tanto, la intensidad del pico obtenida para la fracción de AuNPs pequeñas revelan una cantidad de nanopartículas claramente mayor.

El tercer pico confirmó la presencia de especies de Au de bajo peso molecular, que aparecen debido a la degradación de las nanopartículas, detectadas previamente mediante un aumento del fondo en las medidas de SP-ICP-MS. Así, la metodología basada en HPLC-ICP-MS ha sido útil para confirmar la presencia de dos poblaciones de AuNPs de diferentes tamaños y, adicionalmente, de especies de Au de bajo peso molecular. Otros estudios han revelado la presencia de estas especies de Au en diferentes sistemas biológicos<sup>259,347-349</sup> y su presencia se debería considerar para cualquier estudio toxicológico.<sup>351</sup>

Estos resultados han demostrado claramente que las AuNPs administradas se degradaron predominantemente a otras de menor tamaño. Aunque el mecanismo no se conoce, esta significativa reducción del tamaño de las nanopartículas podría resultar en una reducción de su citotoxicidad.<sup>351</sup> Se ha demostrado la influencia de compuestos que contiene azufre, como la cisteína, en la degradación de AgNPs.<sup>352</sup> Estos podrían desempeñar un papel importante en los efectos observados en las AuNPs. Como resultado de esta degradación, se han formado especies de Au de bajo peso molecular. Estos hallazgos ponen de manifiesto que la monitorización del destino de las nanopartículas en sistemas biológicos requiere del uso de diferentes técnicas complementarias para estudiar la evolución de las diferentes especies. Aunque se sabe poco sobre el mecanismo de degradación de las nanopartículas en el organismo, la detección de partículas de pequeño diámetro y las correspondientes especies de bajo peso molecular podrían ayudar a comprender los mecanismos de defensa de los organismos vivos a la exposición de nanomateriales.

---

<sup>1</sup> Para nanopartículas esféricas de un determinado volumen (V) y diámetro (d) siguiendo  $V = \frac{1}{6}\pi d^3$

### **4.3. Evaluación del impacto celular generado por la exposición a nanopartículas de oro con diferentes recubrimientos en cultivos celulares**

El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en el mundo. Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), el número de nuevos casos ascenderá en las siguientes dos décadas y alrededor del 40 % de la población mundial podrá ser diagnosticada durante sus vidas. Por ello, existe una alta demanda del desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico precoz y tratamiento del cáncer. Aunque la quimioterapia es uno de los métodos más comunes para el tratamiento de esta enfermedad, su potencial se ve muchas veces limitado por sus severos efectos secundarios debido a interacciones no específicas de los fármacos utilizados con células y tejidos sanos. Además, se puede ver obstaculizada por un microambiente tumoral cambiante y la resistencia a un determinado fármaco.

Uno de los mayores desafíos que enfrenta la quimioterapia hoy en día es el desarrollo de sistemas de administración de fármacos que sean eficaces y selectivos en cuanto a su diana terapéutica.<sup>353</sup> Gracias al rápido desarrollo de la nanotecnología, surge como alternativa el uso de nanotransportadores, existiendo una gran variedad de nanomateriales diferentes con propiedades especiales que despiertan un particular interés para solventar las desventajas de las terapias clásicas. Así, se han utilizado para este fin nanotransportadores como dendrímeros,<sup>354</sup> liposomas,<sup>355</sup> micelas poliméricas o vesículas<sup>356</sup> y nanopartículas metálicas.<sup>357</sup> Entre estas, la aplicación de AuNPs como nanotransportadores de fármacos es un campo que se está expandiendo rápidamente debido a las propiedades inherentes a estas nanoestructuras como son su síntesis en diferentes formas y tamaños con una baja dispersión.<sup>358</sup> Además, la fácil funcionalización de su superficie permite la unión de las partículas con múltiples agentes como fármacos o biomoléculas que aumentan su selectividad como anticuerpos, a la vez que les proporciona protección frente a la agregación y aumenta su biocompatibilidad. Por otro lado, el núcleo metálico suele presentar baja toxicidad, siendo biocompatible e inerte.<sup>359-</sup>

El uso de AuNPs con diferentes recubrimientos o funcionalizaciones superficiales permite el diseño de una gran variedad de estrategias para transporte y administración de fármacos. Así, se pueden cargar las AuNPs de fármacos hidrofóbicos a través de interacciones no covalentes, que no requieren la modificación estructural del fármaco para su liberación.<sup>362</sup> Por otro lado, se pueden unir profármacos (compuestos que tras su administración se metabolizan en un compuesto farmacológicamente activo) a las nanopartículas mediante enlaces covalentes para administrarlos a las células donde se pueden liberar mediante estímulos externos<sup>363</sup> o internos.<sup>364</sup>

Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden entrar fácilmente en las células, así como desplazarse a través de las células, tejidos y órganos. Por ello, son atractivas para su utilización en aplicaciones biomédicas ya que pueden atravesar las barreras biológicas para ejercer su función dentro de la célula. Sin embargo, de esta inicial ventaja también pueden surgir efectos adversos.<sup>365,366</sup> En nanomedicina, la entrada controlada y segura de las NPs en las células es importante para obtener alta eficacia terapéutica. Como la membrana celular es permeable a moléculas pequeñas y no polares principalmente, las NPs utilizan mecanismos endocíticos para entrar en las células.<sup>367,368</sup> La inducción de citotoxicidad por las NPs está determinada por su vía de entrada y su localización intracelular. Todos estos procesos se pueden optimizar mediante cambios en las propiedades fisicoquímicas de las NPs como tamaño, forma y propiedades superficiales.<sup>369</sup> Así, las células internalizan los diferentes tipos de NPs utilizando diferentes mecanismos según sus propiedades. En consecuencia, se debe tener en cuenta el efecto las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como el tamaño, la forma, la carga y el recubrimiento en el mecanismo de absorción y la función biológica de las nanopartículas.

En cuanto al tamaño, generalmente, las partículas pequeñas en el rango de los nm se internalizan mediante pinocitosis,<sup>370</sup> mecanismo que se puede subdividir en endocitosis mediada por clatrina, mediada por caveolina, endocitosis independiente de clatrina y caveolina y macropinocitosis.<sup>371,372</sup> En el caso de las AuNPs, los mecanismos utilizados dependerán también de sus propiedades, afectando directamente a la cantidad de nanopartículas incorporadas por las células y a su citotoxicidad.



Estudios realizados anteriormente pusieron de manifiesto que las NPs en un rango de tamaños de 30-50 nm interactúan eficientemente con los receptores de la membrana celular y, posteriormente, se internalizan a través de endocitosis mediada por receptores.<sup>373</sup> En la aplicación de AuNPs como nanotransportadores de fármacos, la principal limitación es evitar que el retículo endotelial elimine las NPs para prolongar su tiempo de circulación en la sangre, mejorando así su biodisponibilidad para las células diana. En este sentido, el aumento del tamaño de las NPs por encima de ese rango aumenta la tasa de eliminación.<sup>374-376</sup> Por lo tanto, comprender el papel del tamaño de la NP en la incorporación celular es crucial para diseñar NPs eficaces y seguras en este tipo de aplicaciones. No obstante, a pesar de que se ha investigado la relación entre el tamaño de NPs y las vías de absorción, los resultados entre diferentes trabajos siempre han sido inconsistentes.<sup>377-379</sup> Estas contradicciones pueden estar relacionadas con la variabilidad en otras propiedades de las NPs cuando se controla solamente el tamaño. Además, los tamaños de las NPs medidos después de su síntesis pueden sufrir cambios durante los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* debido a la formación de agregados, lo que a su vez puede afectar al mecanismo de incorporación utilizado.<sup>380,381</sup> La mayor incorporación celular de AuNPs se observó para nanopartículas en el rango de 25-50 nm.<sup>382</sup>

Otro factor crítico es la carga superficial. La carga negativa de la membrana celular mejora la absorción de NPs con superficies catiónicas, respecto a NPs con carga neutra o carga negativa.<sup>383,384</sup> La carga superficial también afecta al mecanismo de absorción. Así, las NPs cargadas positivamente se internalizan principalmente mediante macropinocitosis, mientras que las negativas utilizan principalmente mecanismos de endocitosis independiente de clatrina y caveolina.<sup>385</sup>

La carga superficial depende de la modificación de la misma. En aplicaciones biomédicas, la modificación química de la superficie de la NP es un paso crítico utilizado para disminuir la toxicidad, aumentar la estabilidad y controlar y modular la internalización celular de la NP y, así, su destino dentro de la célula.<sup>386</sup> Una de las funcionalizaciones más típicas consiste en el uso de polietilenglicol (PEG) y grupos funcionales con carga negativa como el carboxilo (-COOH), grupos neutros como grupos hidroxilo (-OH) y grupos positivos como aminas (-NH<sub>2</sub>). El aumento en la cantidad de

grupos amino conduce a una carga superficial positiva y, por lo tanto, aumenta la incorporación de las NPs en las células.<sup>387–389</sup>

Como se puede apreciar, aún quedan muchas cuestiones in resolver respecto al impacto biológico del uso de AuNPs en este tipo de aplicaciones biomédicas, lo que puede influir enormemente en la generalización de su utilización. La evaluación de la biocompatibilidad de estas, no solo a nivel de citotoxicidad si no de la alteración de procesos subcelulares, es crucial. Por lo tanto, es imprescindible conocer los mecanismos celulares y moleculares activados por la exposición a AuNPs. Por otro lado, se debe evaluar exhaustivamente la relación entre las características de las partículas (forma, tamaño y recubrimiento superficial) y los efectos biológicos observados.

En la presente Tesis Doctoral se aborda el estudio de la incorporación celular de AuNPs con diferentes recubrimientos superficiales a nivel de célula individual, aprovechando el potencial de análisis multielemental en señales de corta duración del ICP-TOF-MS. Además, se evalúa la citotoxicidad de las AuNPs utilizadas en cultivos celulares y se lleva a cabo un experimento de metabolómica dirigida utilizando un espectrómetro de masas de tipo orbitrap con fuente de ionización de electrospray (ESI) para investigar el efecto de la exposición a AuNPs en el metaboloma celular, respecto a células control. Todos estos estudios se realizaron durante una estancia en el grupo de investigación de la Profesora Gunda Köllensperger en la Universidad de Viena.

### **4.3.1. Cultivos celulares y tratamiento de las células**

Para abordar la evaluación del impacto de la exposición a nanopartículas *in vitro*, se decidió utilizar dos tipos de AuNPs con distintos recubrimientos superficiales y dos líneas celulares diferentes.

Las nanopartículas utilizadas se representan en la Figura 69. Ambas poseen un núcleo metálico de oro de 30 nm, según el fabricante, pero difieren en su recubrimiento. Esto permite comparar el efecto del recubrimiento de la nanopartícula, una de sus propiedades más importantes, en los análisis posteriores relacionados con la citotoxicidad, incorporación celular y efecto en el metaboloma celular. La superficie de

ambos tipos de nanopartículas está modificada con PEG, recubrimiento que se utiliza típicamente para proteger el núcleo metálico de la degradación. Sin embargo, en uno de los casos el PEG está funcionalizado con grupos carboxilo (AuNP-PEG-COOH), mientras que en el otro, con grupos amino (AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>).

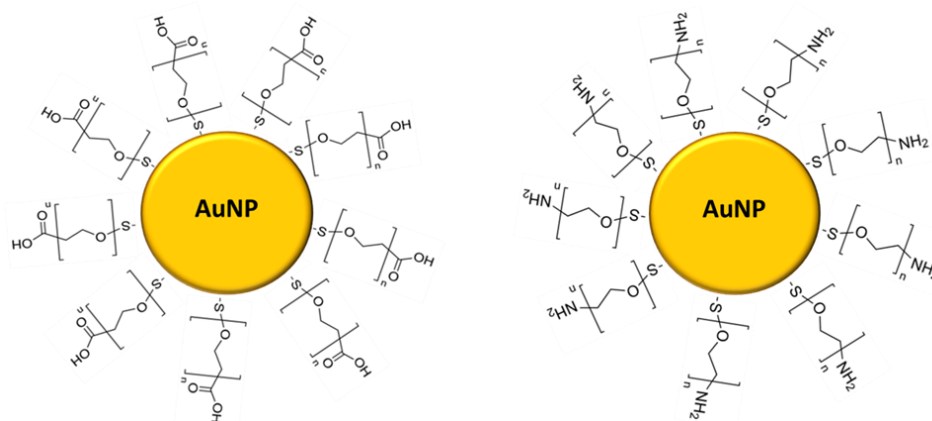


Figura 69. Representación de AuNPs modificadas en su superficie con PEG-COOH y PEG-NH<sub>2</sub>.

Por otro lado, se decidió utilizar dos líneas celulares diferentes. Se trata de dos líneas celulares humanas de adenocarcinoma colorectal, conocidas como HT-29 y Caco-2. Las condiciones de cultivo de ambas líneas celulares se pueden consultar en el apartado 3.3. Para el tratamiento de las células se decidió utilizar 4 dosis diferentes de ambos tipos de nanopartículas en ambas líneas celulares. Las concentraciones de nanopartículas utilizadas fueron de 0,5, 1, 10 y 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de oro total durante un tiempo de exposición o tratamiento de 24 h, condiciones similares a otros estudios en los que se utilizaron nanopartículas parecidas.<sup>83,263,390</sup>

#### 4.3.2. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad de las nanopartículas de oro

El primer paso fue evaluar la citotoxicidad causada por los dos tipos de AuNPs en las condiciones de concentración y tiempo mencionadas en el apartado anterior. Para ello, se sembraron las dos líneas celulares en placas de 96 pocillos. En concreto, se sembraron 10000 y 12500 células por pocillo para las líneas HT-29 y Caco-2, respectivamente. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras 24 horas de incubación,

con las células adheridas, pero todavía no confluentes, se realizaron los tratamientos con las nanopartículas.

Para el tratamiento de las células, se diluyeron los patrones de AuNPs (ambos de concentración inicial de oro total de  $0,46 \text{ mg mL}^{-1}$ , según el fabricante) en medio de cultivo sin suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*, FBS) al doble de la concentración requerida para cada pocillo y se añadieron  $100 \mu\text{L}$  de esta suspensión a cada pocillo. Posteriormente, se añadieron  $100 \mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado con FBS al 20 % por pocillo, de manera que se consiguió la concentración final de AuNPs deseada y la concentración de FBS óptima para el crecimiento celular (10 %). Esta estrategia fue utilizada para evitar la formación de la corona proteica alrededor de la superficie de las AuNPs tras su interacción con las proteínas del suero antes de su interacción con las células. De esta manera se trataron las células HT-29 y Caco-2 con AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> en las cuatro concentraciones diferentes ( $0,5$ ,  $1$ ,  $10$  y  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) durante 24 h.

En estas condiciones, se decidió evaluar la citotoxicidad causada por la exposición a las AuNPs mediante dos ensayos de citotoxicidad diferentes, que permiten evaluar la viabilidad celular después del tratamiento mediante diferentes mecanismos. El primero de ellos, conocido como *Alamar Blue* (AB), se basa en el uso de la resazurina, un colorante no fluorescente, estable en medio de cultivo, no tóxico para la célula y permeable a la membrana celular. Tras entrar en la célula actúa como intermediario en la cadena de transporte de electrones. A medida que acepta electrones se reduce a resorufina, que presenta una coloración rosada y es altamente fluorescente. Por ello, la medida de fluorescencia será proporcional a la viabilidad celular utilizando el poder reductor de las células viables. El segundo ensayo utilizado es el ensayo de captación de rojo neutro (*Neutral Red*, NR). Se trata simplemente de un ensayo de incorporación en el que las células viables son capaces de incorporar el colorante rojo mediante transporte activo. Una vez dentro de las células, el colorante se dirige a los lisosomas que quedan teñidos. El protocolo seguido para la realización de ambos ensayos de citotoxicidad se puede ver en la sección experimental, en el apartado 3.4.3. Para obtener datos estadísticamente significativos, cada condición de tratamiento (tipo de NP en tipo de célula a determinada concentración) se ensayó por triplicado y cada ensayo se repitió tres veces. Los resultados

de ambos ensayos para los diferentes tratamientos en las líneas celulares HT-29 y Caco-2 se pueden ver en la Figura 70 y Figura 71, respectivamente.

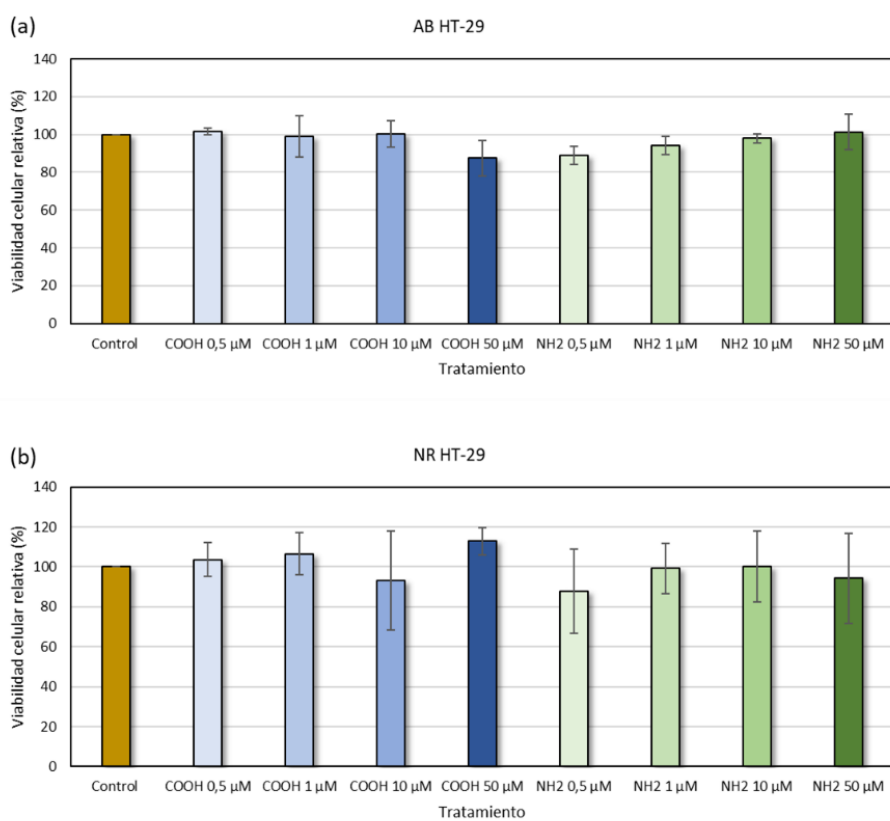


Figura 70. Resultados de los ensayos de citotoxicidad (a) alamar blue y (b) rojo neutro para la línea celular HT-29 tratada con diferentes concentraciones de AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>.

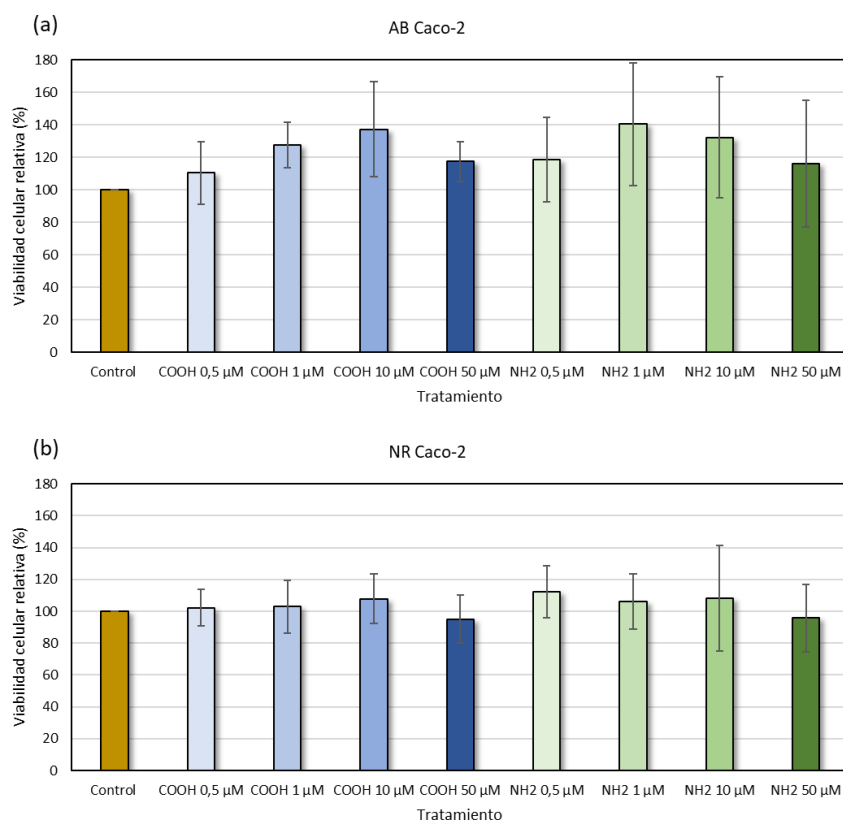


Figura 71. Resultados de los ensayos de citotoxicidad (a) alamar blue y (b) rojo neutro para la línea celular Caco-2 tratada con diferentes concentraciones de AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>.

En todos los casos se representa la viabilidad celular relativa respecto a células control no tratadas (a las que se les asigna un valor del 100 %), representadas en color amarillo en la Figura 70 y Figura 71. En las gráficas se pueden apreciar en color azul los tratamientos con concentraciones crecientes de AuNP-PEG-COOH y, de forma análoga, en verde para los tratamientos con AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>. Las propias barras de error obtenidas indican que no hay diferencias entre la viabilidad de las células control y las células tratadas. No obstante, se aplicó una prueba *t de student* que permitió confirmar la ausencia de diferencias significativas entre las medias de los datos obtenidos para las células tratadas y células control, en todos los tratamientos. Asimismo, se realizó el análisis de la varianza ANOVA, obteniendo los mismos resultados.

A la vista de los resultados, se puede concluir que ninguno de los dos tipos de AuNPs utilizadas causa una citotoxicidad significativa en las concentraciones ensayadas. Resultados de citotoxicidad similares se obtuvieron previamente para otro tipo de AuNPs en cultivos celulares.<sup>361,390</sup> Por ello, se decidió utilizar la concentración más elevada, de 50

$\mu\text{mol L}^{-1}$  para los siguientes estudios de incorporación celular y metabolómica, esperando obtener un efecto más claro del tratamiento celular con AuNPs sin afectar a la viabilidad celular.

### 4.3.3. Caracterización de las nanopartículas de oro mediante SP-ICP-MS

Antes de evaluar la incorporación celular de las nanopartículas, se decidió caracterizar los patrones de ambos tipos de nanopartículas utilizadas para el tratamiento de las células, en términos de distribución de tamaños. Para ello se utilizó el ICP-MS en modo *single particle*. En este caso, se utilizó el icpTOF 2R (TOFWERK), un equipo provisto de un analizador de masas de tipo tiempo de vuelo, cuyo uso tendrá una especial utilidad en el análisis de células individuales, que se comentará en el siguiente apartado. Tanto para el análisis de partículas como de células individuales, el ICP-MS se equipó con un sistema de introducción de muestra de alta eficiencia comercializado por Glass Expansion bajo el nombre de *High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS*. La base de este sistema es la misma que la del sistema HECIS utilizado en el capítulo anterior. Consiste en un nebulizador concéntrico de vidrio diseñado para proporcionar altas eficiencias de nebulización a bajos flujos de introducción de muestra ( $10 - 45 \mu\text{L min}^{-1}$ ) y utilizando bajos flujos de Ar como gas portador, lo que minimiza el daño a las membranas y paredes celulares en el análisis de células individuales. Tras el nebulizador se coloca una cámara de nebulización de vidrio de borosilicato y de consumo total a la que se introduce un flujo adicional envolvente de Ar que previene la deposición de las células en las paredes de la cámara aumentando la eficiencia de transporte, a la vez que reduce el tiempo de lavado entre muestras. En la Figura 72 se muestra en un esquema del sistema de introducción de muestra explicado, en el que se pueden distinguir sus diferentes partes.

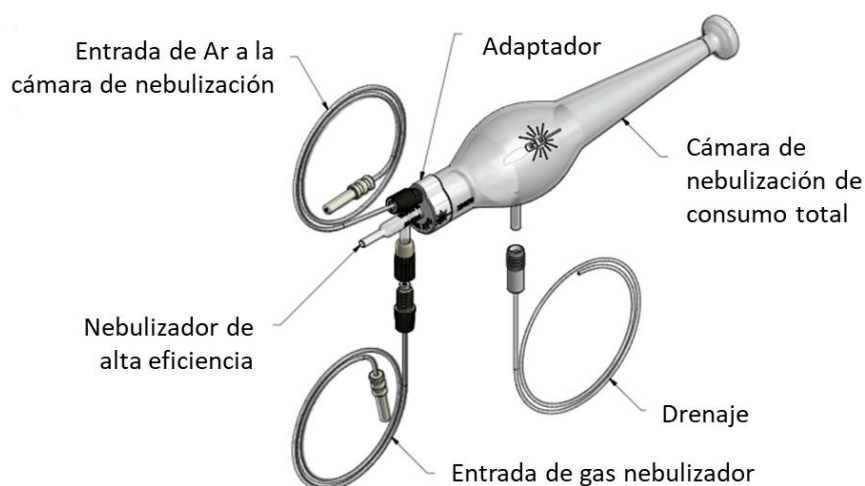


Figura 72. Representación esquemática del sistema de introducción de células de alta eficiencia de Glass Expansion.<sup>391</sup>

Para la introducción de suspensiones de nanopartículas, soluciones de lavado y patrones de calibración, se utilizó el automuestreador MVX-7100 (Teledyne CETAC Technologies) cuyo funcionamiento se explicó brevemente en la sección experimental 3.1.1. El flujo de introducción de muestra utilizado fue de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ .

Tabla 9. Parámetros instrumentales de las medidas de SP-ICP-TQ-MS realizadas en el equipo icpTOF2R.

Equipo	icpTOF 2R (TOFWERK)
Potencia de radiofrecuencia	1550 W
Flujo de gas refrigerante	$14,0 \text{ L min}^{-1}$
Flujo de gas auxiliar	$0,8 \text{ L min}^{-1}$
Flujo de gas portador	$0,4 \text{ L min}^{-1}$
Flujo de gas envolvente	45 %
Frecuencia de adquisición	3 ms
Flujo de introducción de muestra	$0,01 \text{ mL min}^{-1}$

Para la caracterización de los patrones de AuNPs utilizados para el tratamiento celular, se necesita caracterizar la eficiencia de transporte del sistema de introducción de muestra propuesto. En esta ocasión, se utilizaron para este fin partículas de poliestireno dopadas con lantánidos, debido a la no disponibilidad de nanopartículas certificadas. Estas partículas de poliestireno presentan un diámetro aproximado de  $3 \mu\text{m}$  y están dopadas con concentraciones conocidas de Ce, Eu, Ho y Lu. La suspensión comercial contiene



$3,3 \times 10^5$  partículas  $\text{mL}^{-1}$ . Las partículas se diluyeron 1:10 en agua a una concentración final de 33000 partículas  $\text{mL}^{-1}$  y se introdujeron al ICP-MS en las condiciones expuestas en la Tabla 9.

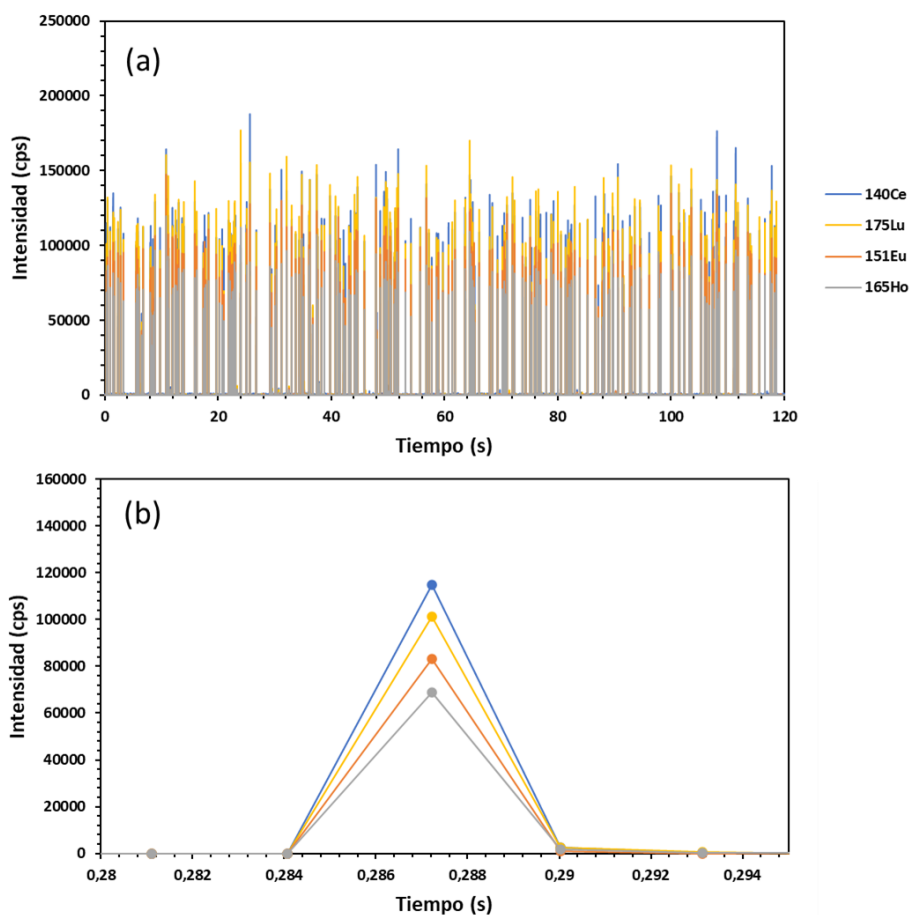


Figura 73. Resultados de la medida mediante SP-ICP-TOF-MS de partículas de poliestireno dopadas con lantánidos: (a) eventos obtenidos para una suspensión de 33000 partículas  $\text{mL}^{-1}$ , y (b) ampliación de un evento.

En la Figura 73(a) se representan los eventos obtenidos para las partículas dopadas con lantánidos. La medida cuasi-simultánea del ICP-TOF-MS permitió obtener el espectro de masas completo en cada evento. En la Figura 73(b), se puede ver la ampliación de un único evento definido por solo un punto de medida, ya que se utilizó un tiempo de integración de 3 ms, en el que se aprecia perfectamente la medida simultánea en este caso de  $^{140}\text{Ce}$ ,  $^{151}\text{Eu}$ ,  $^{165}\text{Ho}$  y  $^{175}\text{Lu}$ . La intensidad de los eventos y el despreciable fondo obtenido permitió el conteo de manera sencilla de los eventos detectados con intensidad mayor a 3 veces la desviación estándar sobre la medida del conjunto de datos. Como en ocasiones anteriores, se calculó la eficiencia de transporte mediante la comparación entre

los eventos detectados en los 120 s de medida y las partículas introducidas en ese tiempo. De esta manera, se obtuvo una eficiencia de transporte de un  $50,2 \pm 4,3 \%$ .

El siguiente paso fue la medida de los patrones de AuNPs. Para ello, tanto las AuNP-PEG-COOH como las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> con una concentración inicial de oro total de 460 mg L<sup>-1</sup> se diluyeron 1:10<sup>7</sup> en agua para obtener suspensiones diluidas de nanopartículas de una concentración de 46 ng L<sup>-1</sup>. Ambas suspensiones se analizaron mediante SP-ICP-MS en las mismas condiciones utilizadas previamente. Los eventos obtenidos para las AuNP-PEG-COOH y AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> se representan en la Figura 74(a) y Figura 74(b), respectivamente.

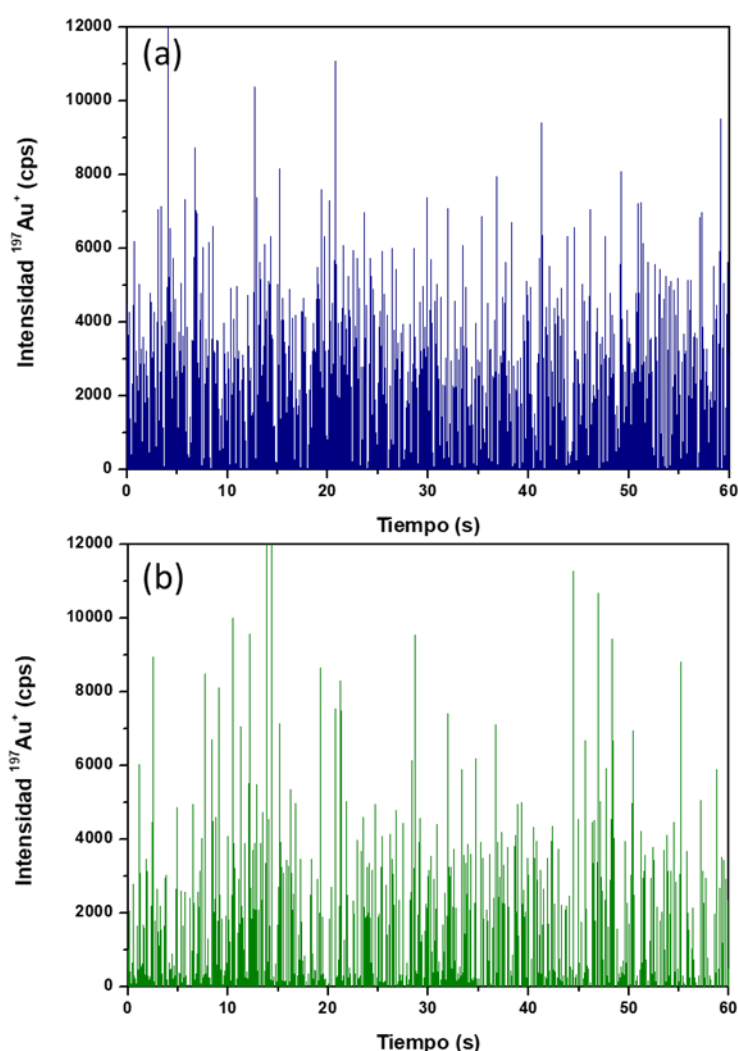


Figura 74. Resultados de la medida mediante SP-ICP-MS de suspensiones de (a) AuNP-PEG-COOH y (b) AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>.

Posteriormente, se construyó una curva de calibrado mediante la medida de patrones inorgánicos de Au en concentraciones comprendidas entre 0 y 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,

preparados mediante dilución en agua a partir de una disolución de Au de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . Tras la medida de los patrones en las mismas condiciones que las nanopartículas, se pudo obtener la masa de Au por partícula (aplicando la ecuación (2)). Se obtuvo un promedio de  $0,23 \pm 0,15 \text{ fg}$  de Au por partícula para las AuNP-PEG-COOH y de  $0,27 \pm 0,18 \text{ fg}$  para las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>.

Como en ocasiones anteriores, tras obtener la masa de Au por partícula, se pudo determinar el diámetro de estas mediante la ecuación (6), asumiendo una geometría esférica de las nanopartículas y teniendo en cuenta la densidad del Au. Con estos cálculos se obtuvieron las distribuciones de tamaños de la Figura 75.

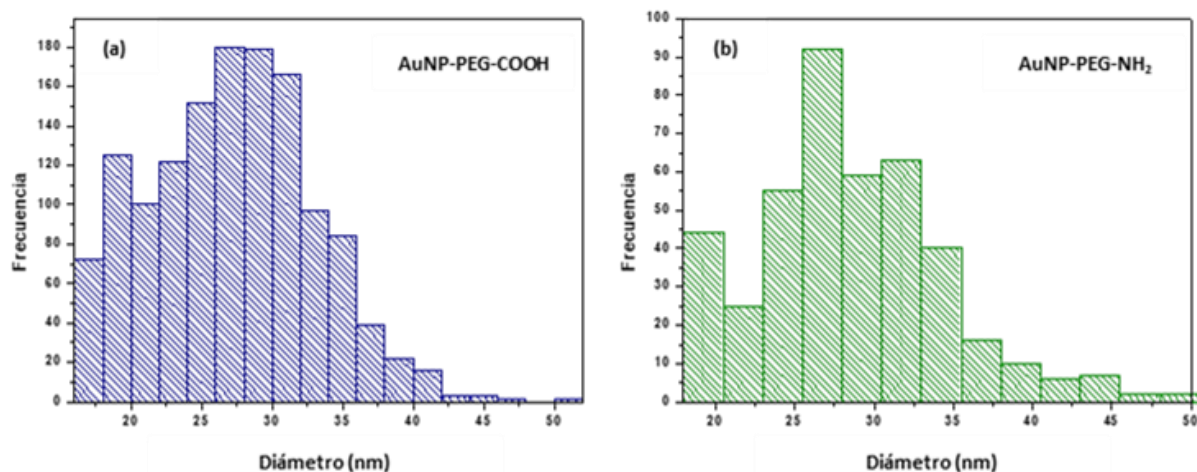


Figura 75. Distribuciones de tamaños obtenidas mediante SP-ICP-MS para (a) AuNP-PEG-COOH y (b) AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>.

En el caso de las AuNP-PEG-COOH se obtuvo un tamaño promedio de  $27,1 \pm 5,8 \text{ nm}$  y una mediana de  $27,2 \text{ nm}$ , mientras que para las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> el tamaño promedio obtenido fue de  $28,6 \pm 5,8 \text{ nm}$  y la mediana de  $27,7 \text{ nm}$ . Los resultados obtenidos en ambos casos concuerdan con el tamaño nominal proporcionado por el fabricante ( $30 \text{ nm}$ ).

#### 4.3.4. Evaluación cuantitativa de la incorporación de nanopartículas de oro en células individuales mediante SC-ICP-TOF-MS

El siguiente paso fue evaluar la incorporación celular de ambos tipos de AuNPs con diferentes recubrimientos en las dos líneas celulares, HT-29 y Caco-2. En vista de los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, se decidió comparar las dos concentraciones más altas de 10 y 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , donde se espera una mayor incorporación celular de nanopartículas sin afectar a la viabilidad de las células.

Para ello, se sembró una placa de seis pocillos para cada línea celular, HT-29 y Caco-2 (300000 células por pocillo en ambos casos). Después de 24 horas de incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, se cambió el medio de cultivo utilizado para la siembra por su correspondiente tratamiento. En dos de los pocillos de cada placa se añadió medio de cultivo fresco para obtener células no tratadas que se utilizaron como control. En otros dos pocillos se añadieron las suspensiones de AuNP-PEG-COOH diluidas en medio de cultivo en concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . La misma operación se repitió en los dos pocillos restantes con las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>. Para el tratamiento de las células se siguió el protocolo explicado anteriormente para los ensayos de citotoxicidad. El tiempo de exposición fue nuevamente de 24 h. Tras este tiempo, se eliminó el medio de cultivo y las células aun adherentes se lavaron tres veces con 1 mL de PBS. Finalmente, se recogieron las células mediante tripsinización obteniendo una suspensión celular de cada tratamiento en PBS. En este punto, se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer.

Tras el conteo celular, las células se centrifugaron a 300 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió con TBS (*Tris buffered saline*) en lugar de PBS (*phosphate buffered saline*) para minimizar la contribución de fósforo al fondo del análisis. Posteriormente, se repitió la centrifugación y el pellet se resuspendió en esta ocasión con 1 mL de una mezcla 1:1 de TBS y una solución tamponada de formaldehído al 4 % (Histofix®). Las células se incubaron en esta mezcla durante 15 min a temperatura ambiente. Con este paso se consigue la fijación de la estructura celular que

ayuda a preservar la arquitectura de las células proporcionando rigidez mecánica y previniendo la degradación de las células durante el tiempo necesario hasta su medida y en su manipulación previa a la medida, como pueden ser los lavados por centrifugación o su dilución. El formaldehído produce un entrecruzamiento entre proteínas y ácidos nucleicos. Con las células ya fijadas, se realizaron cuatro lavados adicionales mediante centrifugación a 500 g durante 5 min. El pellet final se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua Milli-Q.

Las suspensiones obtenidas de células en agua, tanto control como tratadas, se analizaron mediante SC-ICP-MS en las condiciones utilizadas previamente para el análisis de partículas individuales, resumidas en la Tabla 9. En los capítulos anteriores se utilizaron analizadores secuenciales de tipo cuadrupolo simple o triple cuadrupolo. Por ello, la monitorización de más de un isótopo en células individuales requería de medidas independientes. En este caso, la adquisición cuasi-simultánea del analizador de tiempo de vuelo, explicada en la sección 1.2.2., permite la adquisición de todo el espectro de masas cada 30  $\mu$ s, por lo que se pudo realizar análisis multielemental de células individuales. En este caso, se decidió utilizar el fósforo, como uno de los elementos constitutivos mayoritario en las células, y el oro para estudiar la incorporación de las AuNPs. Esto permite distinguir entre AuNPs asociadas a las células y AuNPs libres ya que las primeras deberían generar un *spike* o evento tanto de P (como elemento constitutivo de una célula) como de Au, mientras que en la medida de las segundas se debería observar un evento de Au y una señal de P no distinguible del fondo del análisis. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 76.

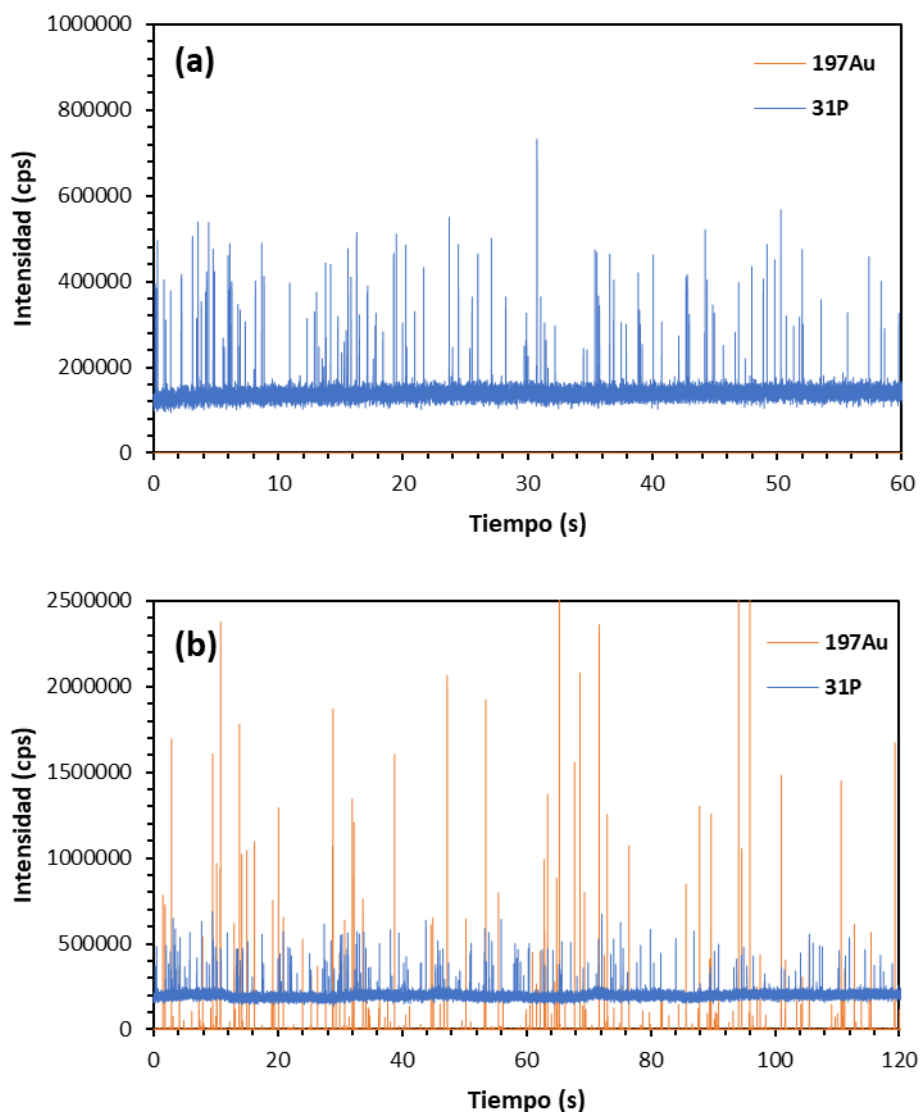


Figura 76. Resultados de la medida mediante SC-ICP-TOF-MS de células HT-29 (a) control y (b) tratadas con  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{AuNP-PEG-NH}_2$ .

En la Figura 76(a) se muestran las señales de P y Au obtenidas para las células control (no tratadas con AuNPs) de la línea HT-29. A pesar del elevado fondo obtenido para el P, se pueden apreciar los eventos de P causados por la llegada de células individuales al plasma. Además, tal y como se esperaba, no se observaron eventos de Au, solamente un fondo de baja intensidad. Resultados similares se obtuvieron para las células control de la línea Caco-2. Sin embargo, tras la exposición de las células a los diferentes tipos de AuNPs se obtuvieron resultados como el de la Figura 76(b), que representa un ejemplo para las células HT-29 tratadas durante 24 h con  $\text{AuNP-PEG-NH}_2$  a una concentración de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . En esta se pueden observar eventos de los dos elementos, sin embargo, en muchas ocasiones no coinciden en tiempo. Esto indica, por

un lado, la presencia de nanopartículas libres, a pesar de los múltiples lavados realizados tanto con las células adherentes en la superficie de cultivo como fijadas en suspensión mediante centrifugación. Por otro lado, también es una indicación de que hay células que no han incorporado nanopartículas de oro. Sin embargo, considerando como eventos celulares aquellos que presentan una señal de  $^{31}\text{P}$  distinguible del fondo, se puede apreciar que, al ampliar los eventos individuales, se obtiene también en la mayoría de los casos una señal de  $^{197}\text{Au}$  (Figura 77).

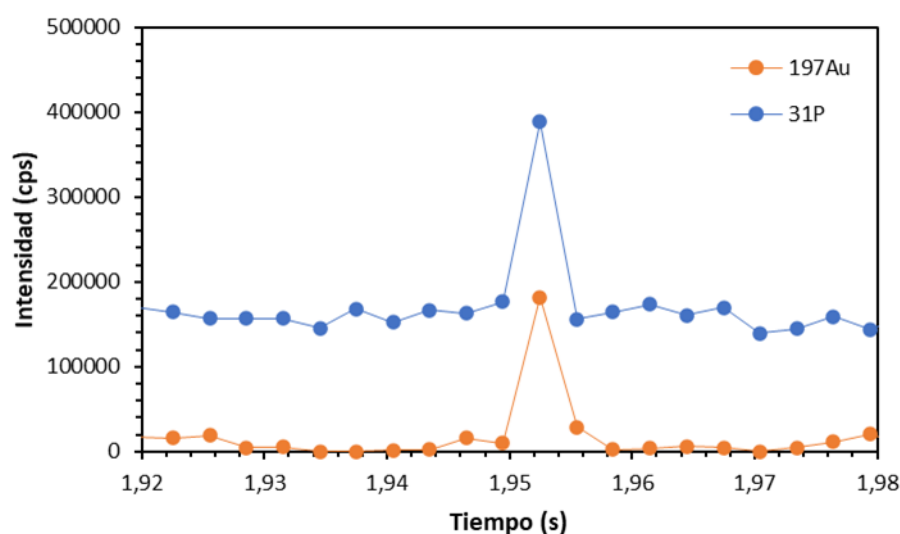


Figura 77. Ampliación de un evento celular de células HT-29 tratadas con AuNP-PEG-COOH en el que se puede ver la señal de  $^{31}\text{P}$  y de  $^{197}\text{Au}$ .

La señal de  $^{31}\text{P}$ , como elemento constitutivo celular, y de  $^{197}\text{Au}$  en el mismo evento, se observó para todas las condiciones de tratamiento con ambos tipos de nanopartículas en las dos líneas celulares HT-29 y Caco-2. Esta observación indica la incorporación celular de ambos tipos de nanopartículas. Para evaluar cuantitativamente esta incorporación, el tratamiento de datos se realizó de forma ligeramente diferente respecto a los capítulos anteriores. En esta ocasión, se utilizó la señal de  $^{31}\text{P}$  para filtrar los eventos celulares y descartar la contribución de nanopartículas libres que puedan interferir en la evaluación de la incorporación de nanopartículas en las células. Para ello, como en ocasiones anteriores, se aplicó un procedimiento iterativo para filtrar los eventos cuya intensidad de  $^{31}\text{P}$  sea mayor de  $3\sigma$  sobre la media. Con los eventos celulares filtrados, se cuantificó la señal de  $^{197}\text{Au}$  en cada evento para lo que se construyó una curva de calibrado mediante la medida de patrones inorgánicos de Au entre 0 y  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , en las mismas condiciones que

las células. En la Figura 78 se muestran los diagramas de cajas donde se reflejan los resultados para todos los tratamientos realizados. Además, en la Tabla 10 se muestran los valores de masa de Au promedio y el rango encontrado entre células individuales sometidas al mismo tratamiento. En estas condiciones, se obtuvo un LOD de 0,023 fg de Au.

Tabla 10. Valores promedio y rango de masa de Au obtenida mediante SC-ICP-TOF-MS en células individuales de las líneas HT-29 y Caco-2 tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs recubiertas de PEG con grupos -COOH y -NH<sub>2</sub>.

Tratamiento	Masa Au por célula (fg)	
	Promedio	Rango
HT-29, AuNP-PEG-COOH, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	21,7	0-256
HT-29, AuNP-PEG-COOH, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	145,4	0-1281
HT-29, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	48,3	0-933
HT-29, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	256,8	0-3903
Caco-2, AuNP-PEG-COOH, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	62,3	0-726
Caco-2, AuNP-PEG-COOH, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4,5	0-162
Caco-2, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	33,4	0-618
Caco-2, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	65,3	0-1832

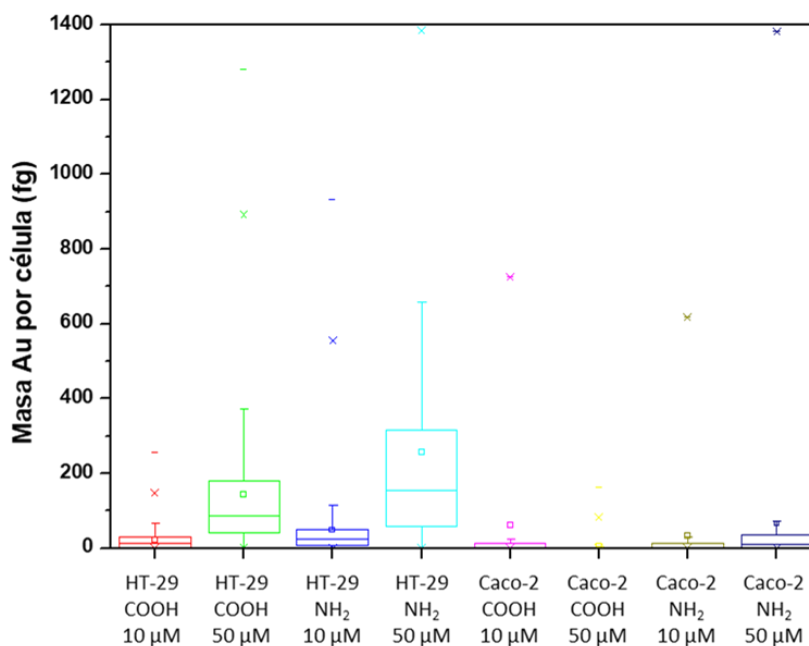


Figura 78. Diagramas de cajas que muestran el contenido de Au (fg) observado en células individuales de las líneas HT-29 y Caco-2 tratadas con diferentes concentraciones de AuNPs recubiertas de PEG con grupos -COOH y -NH<sub>2</sub>.



En los resultados obtenidos se pueden observar claras diferencias entre tratamientos con el mismo tipo de nanopartícula en diferente concentración, entre nanopartículas con diferentes recubrimientos y entre células de diferentes líneas celulares.

Si se comparan los resultados obtenidos entre células tratadas con AuNPs del mismo recubrimiento, la incorporación de nanopartículas aumentó con la concentración de estas utilizada para el tratamiento celular. Así, los resultados obtenidos en la línea HT-29 muestran un aumento en la incorporación de oro de 6,7 veces al aumentar la concentración de AuNP-PEG-COOH en el medio de cultivo de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Este aumento fue de 5,3 veces para las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>. Además, la incorporación celular de ambos tipos de AuNPs fue claramente mayor en las células de la línea HT-29, comparando los resultados obtenidos para las dos líneas celulares sometidas a las mismas condiciones de tratamiento.

Por otro lado, los resultados indicaron que la modificación superficial de las nanopartículas tuvo una clara influencia en la incorporación celular. Así, las partículas recubiertas con grupos -NH<sub>2</sub> se incorporaron en mayor cantidad que las partículas recubiertas con grupos -COOH, tanto en las células de la línea HT-29 como Caco-2. Atendiendo de nuevo a los resultados de la línea HT-29, se obtuvieron aumentos de 2,2 y 1,7 veces para los tratamientos con 10 y 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, de AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> respecto a los tratamientos con AuNP-PEG-COOH. Los únicos resultados que se desvían de estas tendencias son los obtenidos para las células de la línea Caco-2 tratadas con 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de las AuNP-PEG-COOH. En estas condiciones se obtuvo una incorporación de nanopartículas excesivamente alta en comparación con el resto de los resultados, por ello las tendencias se explicaron atendiendo generalmente a la línea HT-29. Estas observaciones podrían ser una causa de la carga superficial de las nanopartículas, debido a sus diferentes recubrimientos. La funcionalización de las nanopartículas con grupos amino conlleva a una carga superficial positiva de estas, que favorece su paso a través de las membranas celulares, cargadas negativamente.

Además, se observó una gran heterogeneidad en la incorporación de AuNPs entre células individuales del mismo tipo celular sometidas al mismo tratamiento. En todas las condiciones ensayadas, se obtuvieron eventos de <sup>31</sup>P en los que la señal de <sup>197</sup>Au no era

distinguible del fondo. Estos corresponden a células que no han incorporado nanopartículas. En cuanto a las células que han incorporado nanopartículas de oro, la heterogeneidad en la incorporación celular fue mayor para las condiciones que proporcionaron mayor incorporación de oro por célula en promedio.

Puesto que en el apartado anterior se caracterizaron ambos patrones de nanopartículas de oro utilizados para los tratamientos celulares, estos valores permitieron obtener la masa de Au promedio por nanopartícula, tanto para las AuNP-PEG-COOH como para las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>. Con este valor, se pudo transformar fácilmente los resultados de masa de Au por célula en número de NPs incorporadas por célula. Estos resultados se recogen en la Tabla 11 y la Figura 79.

*Tabla 11. Valores promedio y rango de número de AuNPs incorporadas por célula en los diferentes tratamientos.*

Tratamiento	Número AuNPs por célula	
	Promedio	Rango
HT-29, AuNP-PEG-COOH, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	94	0-1112
HT-29, AuNP-PEG-COOH, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	632	0-5568
HT-29, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	179	0-3454
HT-29, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	951	0-14456
Caco-2, AuNP-PEG-COOH, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	271	0-3156
Caco-2, AuNP-PEG-COOH, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20	0-702
Caco-2, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	124	0-2289
Caco-2, AuNP-PEG-NH <sub>2</sub> , 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	242	0-5119

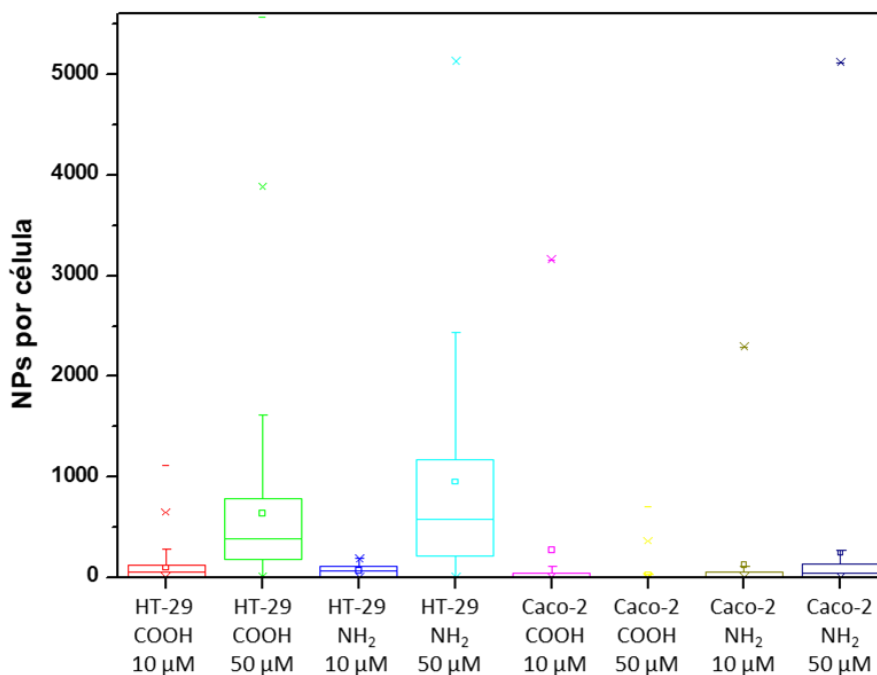


Figura 79. Diagramas de cajas que muestran el número de AuNPs incorporadas por célula en los diferentes tratamientos.

Por último, se calculó el porcentaje de células que incorporaron AuNPs en cada condición de tratamiento. Para ello, se consideró el conteo total de los eventos de  $^{31}\text{P}$  obtenidos como el número total de células detectadas. De entre estos eventos, se consideraron aquellos que no presentaron una señal de  $^{197}\text{Au}$  distinguible del fondo del análisis, mediante el proceso iterativo de  $3\sigma$ , como células que no incorporaron nanopartículas durante el tratamiento. Mediante la comparación del número de eventos restantes con el número total de eventos de  $^{31}\text{P}$  detectados, se determinó el porcentaje de células que presentaron una incorporación de AuNPs detectable mediante la metodología desarrollada en los diferentes tratamientos. Estos resultados se pueden ver en la Figura 80. Las células HT-29, además de presentar una mayor incorporación de AuNPs en promedio, presentaron un mayor porcentaje de células que contienen AuNPs tras el tratamiento, con valores entre el 85 y el 97 % aproximadamente. En el caso de las células de la línea Caco-2, se obtuvieron porcentajes más bajos (entre 42-68 %) que, además, fueron mayores para las nanopartículas recubiertas con grupos amino.

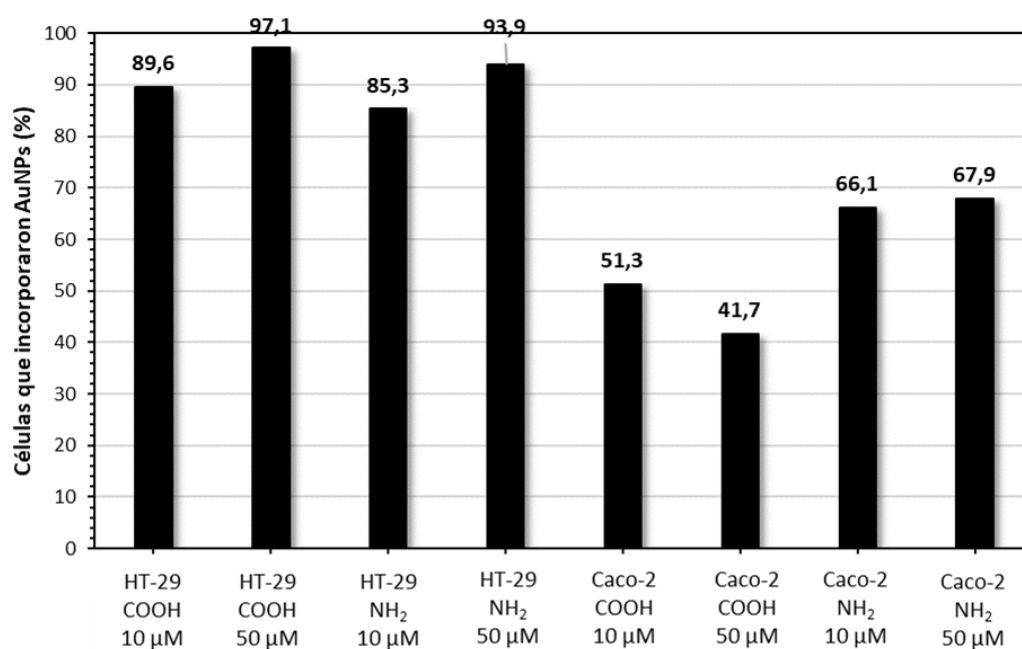


Figura 80. Porcentaje de células que incorporaron AuNPs en los diferentes tratamientos.

La metodología propuesta para el análisis tanto de nanopartículas como de células individuales ha permitido evaluar cuantitativamente la incorporación celular de nanopartículas de oro de 30 nm con diferentes recubrimientos, PEG-COOH y PEG-NH<sub>2</sub>. Además, el uso de un analizador de tipo tiempo de vuelo ha permitido monitorizar simultáneamente el oro y elementos constitutivos celulares, como el fósforo, permitiendo distinguir entre nanopartículas libres y asociadas a las células. Este problema surge habitualmente cuando se realizan estudios de incorporación mediante ICP-MS de manera global. En comparación con este tipo de estrategias, el método desarrollado proporcionó tanto la masa de oro como el número de nanopartículas de oro incorporadas por célula, permitiendo obtener el valor promedio, así como su distribución entre las células individuales. Además, se pudo calcular el porcentaje de células que incorporaron nanopartículas de oro en la población celular. Los resultados permitieron ver la influencia del recubrimiento de la nanopartícula en la incorporación celular, siendo mayor en las partículas recubiertas con grupos amino.

### 4.3.5. Efecto de la exposición celular a AuNPs en el metaboloma celular mediante HILIC-HR-MS

El metaboloma se define como el conjunto completo de todos los metabolitos presentes en un organismo, entendiendo por metabolitos especies de bajo peso molecular (de 50 a 1500 Da) que son sustancias orgánicas endógenas que surgen como intermediarios o productos del metabolismo, conjunto de reacciones químicas que ocurren en un organismo.<sup>392</sup> La metabolómica corresponde al estudio del conjunto completo de metabolitos en una célula, tejido, órgano u organismo. Estos dependen del contexto y varían en función de la fisiología, el desarrollo o el estado patológico de la célula,<sup>393</sup> siendo los últimos eventos de señalización celular resultantes de cambios transcripcionales y traduccionales.<sup>394</sup> Mientras que el genoma, el transcriptoma y el proteoma pueden considerarse como niveles intermedios en el flujo de la expresión génica, el metaboloma representa el último nivel que refleja cambios en el fenotipo y la función celular.<sup>395</sup>

El problema o reto analítico para la medida del metaboloma completo de una célula reside en la gran variedad y diversidad de metabolitos presentes. El metaboloma representa un gran número de compuestos que pertenecen a una gran variedad de clases. Esto conlleva a grandes diferencias en propiedades químicas y físicas, encontrando desde carbohidratos hidrofílicos hasta lípidos altamente hidrofóbicos. Además, los metabolitos están presentes en los sistemas biológicos en un amplio rango de concentraciones, de entre 7-9 órdenes de magnitud (pmol-mmol).<sup>396</sup> La gran diversidad de propiedades y concentraciones de los metabolitos hace que el objetivo de medir todo su conjunto no sea realista ya que es difícil encontrar un método de preparación de muestra (extracción de metabolitos, almacenamiento, etc.) y una plataforma analítica aplicable a todos ellos.

Por ello, la metabolómica es un término muy amplio que incluye diferentes tipos de aproximaciones o estrategias. Así, se puede distinguir entre metabolómica dirigida y no dirigida. La primera estrategia se refiere a la detección y cuantificación precisa de un metabolito o un grupo reducido de estos, que normalmente están relacionados por estar presentes en una misma ruta metabólica o pertenecer a la misma clase de compuestos. En este tipo de estrategia, se seleccionan metabolitos concretos cuya identidad se conoce

y se desarrollan métodos analíticos para su determinación. En cambio, la metabolómica no dirigida consiste en la comparación de los niveles de todos los metabolitos accesibles que cambian en respuesta a un factor que se pretende estudiar. Es una estrategia abierta a nuevos descubrimientos en la que la identificación de metabolitos se realiza después del análisis, lo que aún puede presentar un reto.

La técnica más utilizada para metabolómica es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, NMR). Esta técnica es altamente reproducible, rápida, no destructiva y requiere una mínima preparación de muestra, pero su principal limitación es la sensibilidad. En cambio, la espectrometría de masas (MS) proporciona una alta sensibilidad extremadamente útil para la medida de especies presentes en baja abundancia pero que pueden proporcionar una información muy valiosa. Otra ventaja del uso de MS es su alta especificidad. En cuanto a la metabolómica basada en espectrometría de masas, se pueden emplear diferentes modos de adquisición de la señal. El más común es el modo *full scan*, especialmente para metabolómica no dirigida,<sup>397</sup> en el que se monitoriza un rango determinado de  $m/z$  en el analizador de masas. En este modo se utilizan generalmente instrumentos con un alto poder de resolución de masa ( $R > 10000$ ) como FT-ICR (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*) o Orbitrap. Para metabolómica dirigida se utilizan normalmente modos más selectivos como MS/MS, con equipos de triple cuadrupolo. En cuanto a la introducción de muestra, a menudo se utiliza infusión directa con fuentes de ionización a presión atmosférica como electrospray. Este método ha sido utilizado satisfactoriamente en muestras con matrices de baja complejidad o tras la purificación de las muestras<sup>398</sup> pero su actuación se puede deteriorar dramáticamente por efectos de matriz, en particular por la supresión de la ionización.<sup>399</sup> Para solucionar estos problemas, los espectrómetros de masas se acoplan con una técnica de separación previa como cromatografía líquida (LC) o de gases (GC), que permiten la separación de compuestos con la misma  $m/z$  pero propiedades fisicoquímicas diferentes que hacen que su tiempo de retención sea diferente. La cromatografía de gases está limitada a compuestos térmicamente estables con una presión de vapor suficiente para su volatilización durante la inyección. El análisis de especies iónicas o no volátiles puede realizarse mediante cromatografía líquida.<sup>400</sup> Los compuestos hidrofóbicos podrían analizarse mediante cromatografía de fase reversa,

mientras que los compuestos hidrofílicos y neutros son más adecuados para una separación hidrofílica (HILIC).<sup>401</sup> La fuente de ionización ESI es la más común para su acoplamiento con LC.

Para estudiar el efecto de la exposición de las células a nanopartículas de oro con diferentes recubrimientos en el metaboloma celular, se decidió utilizar un método de metabolómica dirigida previamente desarrollado en el grupo de investigación de la Profesora Gunda Köllensperger, basado en una separación HILIC con detección por espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) utilizando un espectrómetro de masas de tipo Orbitrap con fuente de electrospray.<sup>402</sup> Este método permite la determinación de un amplio rango de metabolitos que incluyen ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares fosfato, bases nitrogenadas, nucleósidos, nucleótidos y coenzimas.

Par realizar el experimento se sembraron las células de las líneas HT-29 y Caco-2 en placas de 12 pocillos (aproximadamente 120000 y 150000 células por pocillo, respectivamente) de las cuales se utilizaron 9 para obtener un triplicado en ambas líneas celulares de células control, células tratadas con AuNP-PEG-COOH y células tratadas con AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>, a una concentración de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  durante 24 h, la concentración más alta utilizada para los ensayos de citotoxicidad sin afectar a la viabilidad de las células. Tras el tratamiento de las células, un método de preparación de muestra ideal debe incorporar un paso de parada del metabolismo para conseguir una representación real de la composición de metabolitos en el tiempo de muestreo, mediante la parada de las reacciones metabólicas, por lo que se lavaron los pocillos tres veces con PBS y se paró el metabolismo celular directamente añadiendo nitrógeno líquido simultáneamente a todos los pocillos. A continuación, se aplicó el protocolo seguido para la extracción de metabolitos de muestras de cultivos celulares que se explica en el apartado 3.4.4 de la sección experimental. Básicamente, consistió en una extracción en metanol frío utilizando una derivatización con N-etilmaleimida (NEM) para proteger los tioles primarios que actúan como intermediarios en la ruta metabólica del azufre. El aumento de masa de estos compuestos producido por la derivatización se debe tener en cuenta posteriormente en el tratamiento de datos.

Para la cuantificación se utilizó una calibración externa utilizando patrón interno. La utilización de patrones internos para fines cuantitativos es importante en la extracción

de metabolitos de las muestras celulares para corregir posibles pérdidas de los analitos durante la preparación o almacenamiento de las muestras y para compensar efectos de matriz durante la medida que puedan causar la supresión de la ionización. El método ideal para solucionar estos problemas consiste en la adición de patrones internos estables marcados isotópicamente, que se comportan igual que los analitos en la separación cromatográfica, pero presentan una masa diferente. El mayor problema para la aplicación de estos patrones internos enriquecidos isotópicamente es la limitada disponibilidad para muchas de las biomoléculas que no permite cubrir la enorme variedad de metabolitos de manera eficiente, además de los costes que supone. La solución a este problema se obtuvo mediante el uso de un extracto de metabolitos de la levadura *Pichia pastoris* crecida en medio de cultivo con  $^{13}\text{C}_6$ -glucosa como única fuente de carbono.<sup>403</sup> Así, se consigue un enriquecimiento isotópico mayor del 99 % en  $^{13}\text{C}$ . En concreto, cada alícuota de este material comercial corresponde a un extracto seco de 2 billones de células de levadura. El extracto se reconstituyó en 2 mL de la disolución de extracción (80 % metanol, 20 % 10 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>, 25 mmol L<sup>-1</sup> NEM pH 7). Este extracto se utilizó tanto en la extracción de metabolitos (ver apartado 3.4.4.) como en la preparación de los patrones de calibración.

Los patrones de calibración se elaboraron a partir de una mezcla de prácticamente todos los metabolitos disponibles comercialmente, que se mezclaron y dividieron en alícuotas previamente. Estas alícuotas se evaporaron y conservaron a -80 °C. Para la preparación de los patrones se reconstituyó una de estas alícuotas en 200 µL de una disolución de 25 mmol L<sup>-1</sup> de NEM para dar una concentración de los metabolitos de 50 µmol L<sup>-1</sup>. A partir de esta, se elaboraron los patrones en concentraciones entre 0 y 10 µmol L<sup>-1</sup> en un 50 % de acetonitrilo y añadiendo la misma alícuota del patrón interno que se añadió a las muestras antes de la extracción de los metabolitos y en la misma proporción. De esta manera, la dilución del patrón interno es de 1:10 en ambos casos (20 µL a las muestras a las que se añadieron 180 µL de la disolución de extracción y 50 µL a los patrones llevados a un volumen final de 500 µL).

Las condiciones de medida se pueden ver en la Tabla 12. Se utilizó una columna de interacción hidrofílica polimérica, en lugar de las de sílice convencionales, lo que permite utilizar un pH alcalino en la fase móvil sin deteriorar la columna. Se utilizó un gradiente de



acetonitrilo/agua en 15 min. El orden de medida de las muestras fue aleatorio y cada 10 muestras se inyectó un control de calidad (QC), que consiste en una mezcla de extractos de metabolitos de todas las muestras analizadas, y un blanco.

Tabla 12. Parámetros instrumentales de las medidas de metabolómica dirigida mediante HILIC-HR-MS.

<b>HPLC</b>	
Equipo	Vanquish DUO UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
Columna	SeQuant® Zic® pHILIC (5 µm, 150x2,1 mm)
Temperatura columna	40 °C
Volumen de inyección	5 µL
Flujo de fase móvil	0,3 mL min <sup>-1</sup>
Fase móvil A	90 % 10 mmol L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> pH 9,2, 10 % ACN
Fase móvil B	100 % ACN
Gradiente de elución	0-6 min: 75-45 % B
	6-7 min: 45-30 % B
	7-10 min: 30 % B
	10 min: 75 % B
	10-15 min: 75 % B
<b>ESI-Orbitrap-MS</b>	
Equipo	Q Exactive™ HF Hybrid Qudarupole-Orbitrap
Resolución	120000
Rango m/z	65-900

El tratamiento de los datos obtenidos en las medidas de HILIC-HR-MS fue llevado a cabo por Mate Rusz, bajo la supervisión de la Profesora Gunda Koellensperger, de la Universidad de Viena. Tras la eliminación de los metabolitos con una RSD mayor al 100 % en los controles de calidad, el conjunto de datos resultante contuvo 167 metabolitos, 101 encontrados en modo negativo, 66 en modo positivo y un total de 113 metabolitos comunes.

Los experimentos de metabolómica revelaron diferencias en el metaboloma celular entre las diferentes líneas celulares y los tratamientos con las diferentes nanopartículas desde el principio, como se puede ver mediante estadística multivariante en el análisis de componentes principales de la Figura 81. En esta se puede ver una clara separación entre ambas líneas celulares y, dentro de cada línea celular, entre células no

tratadas (control) y después del tratamiento con las nanopartículas de oro. Además, el control de calidad aparece en medio de la gráfica, lo que es una buena indicación de la validez de las medidas realizadas al tratarse de una muestra constituida por una mezcla de los extractos de todas las condiciones utilizadas en el experimento y en la misma proporción. En cuanto al tratamiento con AuNPs de diferente recubrimiento, se aprecia que las células tratadas con las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> presentan mayores diferencias respecto a las células control, al encontrarse más alejadas de estas en el análisis de componentes principales.

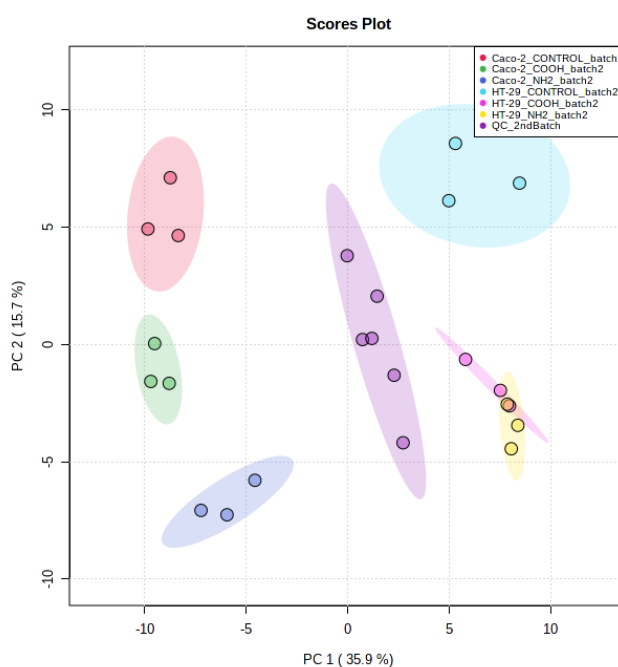


Figura 81. Análisis de componentes principales de las líneas celulares HT-29 y Caco-2 en todas las condiciones de tratamiento (control y tratadas con 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> y AuNP-PEG-COOH).

Por otro lado, el mapa de calor que se representa en la Figura 82, muestra una agrupación en un primer nivel entre células control y células tratadas. En un segundo nivel, se aprecia una agrupación de características similares entre células de la misma línea celular (HT-29 y Caco-2). Por lo tanto, en esta agrupación jerárquica se puede ver una clara separación entre las dos líneas celulares y entre células tratadas y control, como en el caso anterior.



reducida (GSH) disminuye de manera significativa en tres de estas. Esto puede ser una causa del estrés oxidativo producido de manera general por la exposición de las células a las AuNPs, observado previamente en otros trabajos.<sup>249</sup>

Las rutas metabólicas mencionadas se encuentran altamente perturbadas, especialmente en los tratamientos con las AuNP-PEG-NH<sub>2</sub>, con efectos similares, pero más leves, en las células tratadas con AuNP-PEG-COOH. Curiosamente, aunque la línea celular HT-29 presenta una incorporación de nanopartículas de oro mayor, como se vio en la sección anterior, esto no se refleja en un mayor cambio en el metaboloma celular. De hecho, el metaboloma de las células Caco-2 tratadas con AuNP-PEG-NH<sub>2</sub> también está altamente perturbado a pesar de presentar una incorporación de nanopartículas cuatro veces menor (951 frente a 242 nanopartículas por célula, ver Tabla 11).

Este experimento permitió la comparación del efecto en el metaboloma celular producido por la exposición de las células a nanopartículas de oro con diferentes recubrimientos, demostrando el fuerte impacto de la utilización de nanopartículas en el metaboloma celular, a pesar de no causar una citotoxicidad significativa (ver apartado 4.3.2.). Este impacto podría ser un importante factor a tener en cuenta para la utilización de este tipo de nanomateriales en aplicaciones biomédicas, como nanotransportadores de fármacos, por ejemplo.

---

## ***5. Conclusiones***

---



## 5.1. Conclusiones generales

1. En la presente Tesis Doctoral se han evaluado diferentes sistemas de introducción de células individuales al ICP-MS, concluyéndose que la nebulización neumática con nebulizadores de microflujos y cámaras de nebulización de consumo total, que además proporcionen un flujo adicional de gas Ar para evitar el contacto de las células con las paredes de las mismas, proporcionan un transporte más eficaz, tanto en células humanas como en otros modelos celulares más resistentes como las esporas de la bacteria *Streptomyces coelicolor* o las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
2. La optimización y aplicación del sistema desarrollado, basado en el uso del nebulizador microconcéntrico Enya Mist y la cámara de nebulización de consumo total, a células de cáncer de ovario tratadas con cisplatino permite distinguir directamente entre células sensibles y resistentes al fármaco, obteniendo información adicional sobre las diferencias entre células individuales.
3. La incorporación celular de cisplatino es dependiente de la dosis y es más baja en las células resistentes al fármaco que, por otro lado, presentan una menor dispersión a nivel de célula individual. Por ello, se concluye que parte de la resistencia a cisplatino viene asociada a una menor incorporación celular del fármaco.
4. La determinación de cobre en esporas y micelio de varias cepas de *Streptomyces coelicolor* permite concluir que la concentración de cobre citosólico está muy regulada y se tampona de forma muy precisa por medio de transportadores. Además, se correlaciona con la germinación de esporas, metabolismo primario/secundario, esporulación y con la expresión de genes clave para la homeostasis del cobre. Por otro lado, la aplicación del sistema de introducción de células individuales desarrollado a la determinación de cobre en esporas individuales revela que la asincronía en la germinación de las esporas depende, al menos en parte, de la concentración de cobre citosólico en las esporas durmientes.
5. La estrategia de SC-ICP-TQ-MS constituye una herramienta rápida y valiosa para distinguir entre selenio incorporado en células de levadura y selenio extracelular,

pudiendo ser útil para controlar el proceso biotecnológico de fabricación de levaduras selenizadas comerciales y proporcionando información cuantitativa de la incorporación de selenio por célula y la fracción de células que contienen selenio.

6. El uso de técnicas complementarias como SP-ICP-MS, TEM y HPLC-ICP-MS es necesario para la detección de nanopartículas en un amplio rango de tamaños. Mediante estas técnicas se ha confirmado la presencia de nanopartículas de selenio biogénicas en células de levadura crecidas en medios de cultivo enriquecidos con diferentes fuentes de selenio, que han sido caracterizadas en tamaño y, parcialmente, en composición.
7. El estudio del destino de las nanopartículas en sistemas biológicos requiere de diversas técnicas complementarias. Así, la aplicación de estas tres técnicas (SP-ICP-MS, TEM y HPLC-ICP-MS) ha permitido constatar la degradación de nanopartículas de oro estabilizadas con citrato en muestras de hígado de rata tras su administración por vía intraperitoneal, revelando la presencia de las nanopartículas administradas originalmente junto con una población de tamaño significativamente menor y especies de oro de bajo peso molecular, como producto de la degradación de las nanopartículas observada.
8. La metodología de SC-ICP-TOF-MS desarrollada se presenta como una estrategia prometedora para evaluar la incorporación de nanopartículas de oro en células individuales, ya que permite distinguir entre nanopartículas libres y asociadas a las células gracias a la capacidad de análisis multielemental simultáneo del analizador TOF.
9. El recubrimiento de las nanopartículas influye notablemente en la incorporación celular de las mismas, siendo una importante característica a tener en cuenta para su aplicación, por ejemplo, en el diseño de nuevos nanotransportadores de fármacos. En este sentido, las nanopartículas modificadas con grupos amino presentan una mayor incorporación que las modificadas con grupos carboxilo en modelos celulares de enterocitos.
10. A pesar de no causar una citotoxicidad significativa en las líneas celulares utilizadas, las nanopartículas de oro recubiertas de polietilenglicol modificado tanto con grupos amino como con grupos carboxilo causan un fuerte impacto en



el metaboloma celular, alterando los niveles de metabolitos involucrados en importantes rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, glucólisis, síntesis de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Estos resultados reflejan el potencial de la metabolómica para evaluar los efectos asociados al uso de nanomateriales.

### 5.2. General conclusions

1. In the present Doctoral Thesis, different systems for introducing individual cells to the ICP-MS have been evaluated, concluding that pneumatic nebulization with microflow nebulizers and total consumption spray chambers, which also provide an additional flow of gas to avoid the collision of cells with their walls, provides a more efficient transport, both in human cells and in other more resistant cell models such as the spores of the bacterium *Streptomyces coelicolor* or the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells.
2. The optimization and application of the developed system, based on the use of the Enya Mist microconcentric nebulizer and the total consumption spray chamber, to ovarian cancer cells treated with cisplatin allow to directly distinguish between drug-resistant and sensitive cells, obtaining additional information on the differences between drug-resistant and sensitive cells, obtaining additional information on the differences between individual cells.
3. Cisplatin cellular uptake is dose-dependent and is lower in the drug-resistant cells which, on the other hand, present a more homogeneous behaviour at the single cell level. Therefore, it is concluded that the resistance to cisplatin is partially associated with a lower cellular uptake of the drug.
4. The determination of copper in spores and mycelium of various strains of *Streptomyces coelicolor* allows to conclude that the cytosolic copper concentration is highly regulated and is very precisely buffered. In addition, it is correlated with spore germination, primary/secondary metabolism, sporulation and with the expression of key genes for copper homeostasis. On the other hand, the application of the developed single cell introduction system to the determination of copper in individual spores reveals that the asynchrony in spore germination depends, at least partially, on the cytosolic copper concentration in the dormant spores.
5. The SC-ICP-TQ-MS strategy provides a rapid and useful tool to distinguish between incorporated and extracellular selenium in yeast cells, being helpful to control the biotechnological process of commercial selenized yeast production and providing

quantitative information on selenium uptake per cell and the fraction of selenium-containing cells.

6. The use of complementary techniques such as SP-ICP-MS, TEM and HPLC-ICP-MS is necessary for the detection of nanoparticles in a wide size range. These techniques allowed to confirm the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells grown in culture medium enriched with different selenium sources, as well as characterize them in terms of size and composition.
7. The monitoring of the fate of nanoparticles in biological systems requires various techniques. In this way, the application of these three techniques (SP-ICP-MS, TEM and HPLC-ICP-MS) have made it possible to study the degradation of citrate stabilized gold nanoparticles in rat liver samples after their intraperitoneal administration, revealing the presence of the originally administrated nanoparticles together with nanoparticles with a significantly smaller size and low-molecular gold species, as product of the observed degradation process.
8. The SC-ICP-TOF-MS method is a promising strategy to evaluate the uptake of gold nanoparticles in individual cells, since it allows to distinguish between free and cell-associated nanoparticles thanks to the simultaneous multielement analysis of the TOF analyzer.
9. The coating of the nanoparticles substantially influences their cellular uptake, being an important property to consider for their application, for example, in the design of new drug nanocarriers. In this way, amino pegylated gold nanoparticles present much higher uptake than the carboxyl pegylated ones in enterocyte cell models.
10. Despite not causing significant cytotoxicity in the cell lines used, both the amino and carboxy pegylated gold nanoparticles have a remarkable impact on the cell metabolome, highly perturbing the levels of metabolites involved in important metabolic pathways such as the Krebs cycle, glycolysis, nucleic acid or amino acid synthesis. These results underline the potential of metabolomics to evaluate the effects associated with the use of nanomaterials.

### 5.3. Sugerencias para trabajos futuros

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, centrada en el desarrollo y aplicación de metodologías analíticas basadas en ICP-MS para el análisis de pequeñas estructuras como células y nanopartículas individuales, surgen diversas posibilidades de trabajos futuros para continuar en esta línea de investigación. Algunos de ellos se detallan a continuación:

1. Aplicación de los sistemas de introducción de células individuales propuestos para evaluar la incorporación celular de metalofármacos diferentes a cisplatino. Así, sería de interés estudiar la incorporación celular, a nivel de célula individual, de fármacos basados en As, Bi o Ru, pero también de otros fármacos basados en Pt como el oxaliplatino o carboplatino. La aplicación de la metodología desarrollada permitiría obtener resultados relevantes acerca de su utilización como alternativa al cisplatino, intentando minimizar sus problemas de toxicidad y resistencia. Asimismo, la misma metodología es prometedora para investigar el uso de nanotransportadores y sistemas de encapsulación de fármacos y comprobar si permiten aumentar la incorporación celular del fármaco respecto a su forma libre.

2. Desarrollo de un método de lisis celular de levaduras que permita evaluar cuantitativamente la presencia de nanopartículas biogénicas, como las de selenio. En este sentido, se propone el desarrollo de un sistema para la lisis celular en línea, liberando así las nanopartículas presentes dentro de las células para su análisis mediante *single particle* ICP-MS. Podría utilizarse, por ejemplo, un sistema de ultrasonidos para este fin. Además, las metodologías desarrolladas podrían ser utilizadas para evaluar la presencia de nanopartículas biogénicas en otros sistemas celulares. De esta manera, se podría investigar la presencia de nanopartículas biogénicas con cobre en su composición en las esporas de la bacteria *Streptomyces coelicolor*, utilizadas en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral.

3. La metabolómica se postula como una herramienta sensible para la evaluación de riesgos para la salud, presentando un inmenso potencial en el campo de la nanotoxicología para evaluar los efectos y toxicidad asociados al uso de nanomateriales.

Así, se podrían aplicar experimentos similares al descrito en esta Tesis a otros tipos de nanomateriales presentes en productos de uso cotidiano, como las nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Por otro lado, a pesar de que el método utilizado cubre un amplio rango de metabolitos, sería muy útil la optimización de un método de metabolómica no dirigida que permita la determinación de la abundancia relativa de todos los metabolitos detectables en las diferentes condiciones biológicas, así como un estudio más intensivo de las implicaciones biológicas que suponen las rutas metabólicas alteradas. Esto contribuiría a elucidar los mecanismos involucrados en la toxicidad inducida por el nanomaterial y al descubrimiento de potenciales biomarcadores de dicha toxicidad.



---

## ***6. Bibliografía***

---





1. Elsasser WM. Outline of a theory of cellular heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(16 I):5126-5129. doi:10.1073/pnas.81.16.5126
2. Altschuler SJ, Wu LF. Cellular Heterogeneity: Do Differences Make a Difference? *Cell*. 2010;141(4):559-563. doi:10.1016/j.cell.2010.04.033
3. Tomlinson I, Sasieni P, Bodmer W. How many mutations in a cancer? *Am J Pathol*. 2002;160(3):755-758. doi:10.1016/S0002-9440(10)64896-1
4. Huang S. Non-genetic heterogeneity of cells in development: More than just noise. *Development*. 2009;136(23):3853-3862. doi:10.1242/dev.035139
5. Cai L, Friedman N, Xie XS. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*. 2006;440(7082):358-362. doi:10.1038/nature04599
6. Weinberger LS, Burnett JC, Toettcher JE, Arkin AP, Schaffer D V. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*. 2005;122(2):169-182. doi:10.1016/j.cell.2005.06.006
7. Rosenfeld N, Young JW, Alon U, Swain PS, Elowitz MB. Gene regulation at the single-cell level. *Science*. 2005;307(5717):1962-1965. doi:10.1126/science.1106914
8. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(19):1441-1454. doi:10.1093/jnci/djm135
9. Li S, Garrett-Bakelman FE, Chung SS, et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2016;22(7):792-799. doi:10.1038/nm.4125
10. Tabassum DP, Polyak K. Tumorigenesis: it takes a village. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(8):473-483. doi:10.1038/nrc3971
11. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81-94. doi:10.1038/nrclinonc.2017.166
12. Amable L. New Research Evaluating Cisplatin Uptake in Ovarian Cancer Cells by Single Cell ICP-MS. *Perkin Elmer*. 2017:1-6.

13. Armbrecht L, Dittrich PS. Recent Advances in the Analysis of Single Cells. *Anal Chem.* 2017;89(1):2-21. doi:10.1021/acs.analchem.6b04255
14. Yang Y, Huang Y, Wu J, Liu N, Deng J, Luan T. Single-cell analysis by ambient mass spectrometry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2017;90:14-26. doi:10.1016/j.trac.2017.02.009
15. Jehan Z. *Single-Cell Omics: An Overview*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-814919-5.00001-4
16. Wang L, Yan L, Liu J, Chen C, Zhao Y. Quantification of Nanomaterial/Nanomedicine Trafficking in Vivo. *Anal Chem.* 2018;90(1):589-614. doi:10.1021/acs.analchem.7b04765
17. Tringe SG. Single-cell genomics for the maasses. *Nat Biotechnol.* 2017;35(7):635-636. doi:10.1038/nbt.3914
18. Lan F, Demaree B, Ahmed N, Abate AR. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding. *Nat Biotechnol.* 2017;35(7):640-646. doi:10.1038/nbt.3880
19. Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet.* 2019;20(5):257-272. doi:10.1038/s41576-019-0093-7
20. Lazar IM, Gulakowski NS, Lazar AC. Protein and Proteome Measurements with Microfluidic Chips. *Anal Chem.* 2019. doi:10.1021/acs.analchem.9b04711
21. Chen P, Chen D, Li S, Ou X, Liu B-F. Microfluidics towards single cell resolution protein analysis. *TrAC Trends Anal Chem.* 2019;117:2-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.022
22. Wen L, Tang F. Single cell epigenome sequencing technologies. *Mol Aspects Med.* 2018;59:62-69. doi:10.1016/j.mam.2017.09.002
23. Ali A, Abouleila Y, Shimizu Y, et al. Single-cell metabolomics by mass spectrometry: Advances, challenges, and future applications. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2019;120:115436. doi:10.1016/j.trac.2019.02.033
24. Zhang XC, Zang Q, Zhao H, et al. Combination of Droplet Extraction and Pico-ESI-MS

- Allows the Identification of Metabolites from Single Cancer Cells. *Anal Chem.* 2018;90(16):9897-9903. doi:10.1021/acs.analchem.8b02098
25. Trouillon R, Passarelli MK, Wang J, Kurczyk ME, Ewing AG. Chemical analysis of single cells. *Anal Chem.* 2013;85(2):522-542. doi:10.1021/ac303290s
  26. Budnik B, Levy E, Harmange G, Slavov N. SCoPE-MS: mass spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation. *Genome Biol.* 2018;19(1):1-16. doi:10.1186/s13059-018-1547-5
  27. Xie W, Gao D, Jin F, Jiang Y, Liu H. Study of Phospholipids in Single Cells Using an Integrated Microfluidic Device Combined with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2015;87(14):7052-7059. doi:10.1021/acs.analchem.5b00010
  28. Schober Y, Guenther S, Spengler B, Römpf A. Single cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Anal Chem.* 2012;84(15):6293-6297. doi:10.1021/ac301337h
  29. Lanekoff I, Kurczyk ME, Hill R, et al. Time of flight mass spectrometry imaging of samples fractured in situ with a spring-loaded trap system. *Anal Chem.* 2010;82(15):6652-6659. doi:10.1021/ac101243b
  30. Mellors JS, Jorabchi K, Smith LM, Ramsey JM. Integrated microfluidic device for automated single cell analysis using electrophoretic separation and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(3):967-973. doi:10.1021/ac902218y
  31. Mao P, Wang HT, Yang P, Wang D. Multinozzle emitter arrays for nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83(15):6082-6089. doi:10.1021/ac2011813
  32. Yin H, Marshall D. Microfluidics for single cell analysis. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(1):110-119. doi:10.1016/j.copbio.2011.11.002
  33. Williams RJP, Fraústo Da Silva JJR. The trinity of life: The genome, the proteome, and the mineral chemical elements. *J Chem Educ.* 2004;81(5):738-749. doi:10.1021/ed081p738

34. Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED. Metal-binding sites in proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 1991;2(4):582-591. doi:[https://doi.org/10.1016/0958-1669\(91\)90084-I](https://doi.org/10.1016/0958-1669(91)90084-I)
35. Outten CE, O'Halloran T V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science.* 2001;292(5526):2488-2492. doi:10.1126/science.1060331
36. Hoare HC, Mostyn RA. Emission Spectrometry of Solutions and Powders with a High-Frequency Plasma Source. *Anal Chem.* 1967;39(10):1153-1155. doi:10.1021/ac60254a025
37. Degueldre C, Favarger PY. Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: A feasibility study. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2003;217(1-3):137-142. doi:10.1016/S0927-7757(02)00568-X
38. Degueldre C, Favarger PY, Bitea C. Zirconia colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2004;518(1-2):137-142. doi:10.1016/j.aca.2004.04.015
39. Degueldre C, Favarger PY. Thorium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta.* 2004;62(5):1051-1054. doi:10.1016/j.talanta.2003.10.016
40. Degueldre C, Favarger PY, Wold S. Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode. *Anal Chim Acta.* 2006;555(2):263-268. doi:10.1016/j.aca.2005.09.021
41. Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Anal Chem.* 2014;86(5):2270-2278. doi:10.1021/ac402980q
42. Li F, Armstrong DW, Houk RS. Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77(5):1407-1413. doi:10.1021/ac049188I
43. Tanner SD, Bandura DR, Ornatsky O, Baranov VI, Nitz M, Winnik MA. Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell

- biomarker assay. *Pure Appl Chem.* 2008;80(12):2627-2641. doi:10.1351/pac200880122627
44. Olesik JW, Gray PJ. Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: Determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *J Anal At Spectrom.* 2012;27(7):1143-1155. doi:10.1039/c2ja30073g
45. Mueller L, Traub H, Jakubowski N, Drescher D, Baranov VI, Kneipp J. Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(27):6963-6977. doi:10.1007/s00216-014-8143-7
46. Todolí JL, Mermet JM. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc.* 2006;61(3):239-283. doi:10.1016/j.sab.2005.12.010
47. Caruso F, Mantellato S, Palacios M, Flatt RJ. ICP-OES method for the characterization of cement pore solutions and their modification by polycarboxylate-based superplasticizers. *Cem Concr Res.* 2017;91:52-60. doi:10.1016/j.cemconres.2016.10.007
48. Canals A, Aguirre MA. Roles of nebulizers in Analytical Chemistry. *Encycl Anal Chem.* 2015:1-45. doi:10.1002/9780470027318.a9391
49. Ho K-S, Chan W-T. Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry. *J Anal At Spectrom.* 2010;25(7):1114. doi:10.1039/c002272a
50. Montaser A, Minnich MG, McLean JA, Liu HY, Gustavsson AGT, Browner RF. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. In: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.* Wiley-VHC: ; 1998:335-420.
51. Todoli JL, Hernandis V, Canals A, Mermet JM. Comparison of characteristics and limits of detection of pneumatic micronebulizers and a conventional nebulizer operating at low uptake rates in ICP-AES. *J Anal At Spectrom.* 1999;14(9):1289-1295. doi:10.1039/a900598f
52. Liu H, Montaser A. Phase-Doppler Diagnostic Studies of Primary and Tertiary

- Aerosols Produced by a High-Efficiency Nebulizer. *Anal Chem.* 1994;66(19):3233-3242. doi:10.1021/ac00091a037
53. Pergantis SA, Heithmar EM, Hinnert TA. Microscale Flow Injection and Microbore High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry via a High-Efficiency Nebulizer. *Anal Chem.* 1995;67(24):4530-4535. doi:10.1021/ac00120a016
54. Olesik JW, Bates LC. Characterization of aerosols produced by pneumatic nebulizers for inductively coupled plasma sample introduction: effect of liquid and gas flow rates on volume based drop size distributions. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 1995;50(4-7):285-303. doi:10.1016/0584-8547(94)00151-K
55. Sharp BL. Pneumatic nebulisers and spray chambers for inductively coupled plasma spectrometry: A review: Part 1. Nebulisers. *J Anal At Spectrom.* 1988;3(5):613-652. doi:10.1039/JA9880300613
56. Todolí JL, Mermet JM. Effect of the spray chamber design on steady and transient acid interferences in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2000;15(7):863-867. doi:10.1039/b000589o
57. Isoyama H, Uchida T, Iida C, Nakagawa G. Small spray chamber with a concentric nebuliser for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 1990;5(4):307-310. doi:10.1039/ja9900500307
58. Koropchak JA, Sadain S, Szostek B. Dispersion of discrete sample signals within aerosol spray chambers: Preliminary investigations. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc.* 1996;51(14 SPEC. ISS.):1733-1745. doi:10.1016/S0584-8547(96)01537-6
59. Nomizu T, Kaneco S, Tanaka T, Ito D, Kawaguchi H, Vallee BT. Determination of Calcium Content in Individual Biological Cells by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Anal Chem.* 1994;66(19):3000-3004. doi:10.1021/ac00091a004
60. Meyer S, López-Serrano A, Mitze H, Jakubowski N, Schwerdtle T. Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite. *Metallomics.* 2018;10(1):73-76. doi:10.1039/c7mt00285h

61. Zheng L-N, Wang M, Zhao L-C, et al. Quantitative analysis of Gd@C82(OH)22 and cisplatin uptake in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407:2383-2391. doi:10.1007/s00216-014-8422-3
62. Zheng LN, Wang M, Wang B, et al. Determination of quantum dots in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta.* 2013;116:782-787. doi:10.1016/j.talanta.2013.07.075
63. Wang H, Wang B, Wang M, et al. Time-resolved ICP-MS analysis of mineral element contents and distribution patterns in single cells. *Analyst.* 2015;140(2):523-531. doi:10.1039/c4an01610f
64. Groombridge AS, Miyashita SI, Fujii SI, et al. High sensitive elemental analysis of single yeast cells (*saccharomyces cerevisiae*) by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system. *Anal Sci.* 2013;29(6):597-603. doi:10.2116/analsci.29.597
65. Miyashita SI, Groombridge AS, Fujii SI, et al. Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(9):1598-1606. doi:10.1039/c4ja00040d
66. Miyashita S ichi, Mitsuhashi H, Fujii S ichiro, Takatsu A, Inagaki K, Fujimoto T. High transport efficiency of nanoparticles through a total-consumption sample introduction system and its beneficial application for particle size evaluation in single-particle ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(6):1531-1545. doi:10.1007/s00216-016-0089-5
67. Corte-Rodríguez M, Blanco-González E, Bettmer J, Montes-Bayón M. Quantitative Analysis of Transferrin Receptor 1 (TfR1) in Individual Breast Cancer Cells by Means of Labeled Antibodies and Elemental (ICP-MS) Detection. *Anal Chem.* 2019;91(24):15532-15538. doi:10.1021/acs.analchem.9b03438
68. Merrifield RC, Stephan C, Lead JR. Quantification of Au Nanoparticle Biouptake and Distribution to Freshwater Algae Using Single Cell - ICP-MS. *Environ Sci Technol.* 2018;52(4):2271-2277. doi:10.1021/acs.est.7b04968
69. Mavrakis E, Mavroudakos L, Lydakos-Simantiris N, Pergantis SA. Investigating the

- uptake of arsenate by *Chlamydomonas reinhardtii* cells and its effect on their lipid profile using single cell ICP-MS and Easy Ambient Sonic-Spray Ionization-MS. *Anal Chem.* 2019;91(15):9590-9598. doi:10.1021/acs.analchem.9b00917
70. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al. Mass cytometry: Technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2009;81(16):6813-6822. doi:10.1021/ac901049w
71. Shi J, Ji X, Wu Q, et al. Tracking Mercury in Individual Tetrahymena Using a Capillary Single-Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System. *Anal Chem.* 2020;92 (1):622-627. doi:10.1021/acs.analchem.9b03719
72. Wei X, Zhang X, Guo R, et al. A Spiral-Helix (3D) Tubing Array That Ensures Ultrahigh-Throughput Single-Cell Sampling. *Anal Chem.* 2019;91(24):15826-15832. doi:10.1021/acs.analchem.9b04122
73. Cao Y, Feng J, Tang L, Yu C, Mo G, Deng B. A highly efficient introduction system for single cell- ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells. *Talanta.* 2020;206(July 2019):120174. doi:10.1016/j.talanta.2019.120174
74. Au M von der, Schwinn M, Kuhlmeier K, Büchel C, Meermann B. Development of an automated on-line purification HPLC single cell-ICP-MS approach for fast diatom analysis. *Anal Chim Acta.* 2019;1077:87-94. doi:10.1016/j.aca.2019.05.045
75. Franze B, Strenge I, Engelhard C. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: Evaluation of three different pneumatic and piezo-based sample introduction systems for the characterization of silver nanoparticles. *J Anal At Spectrom.* 2012;27(7):1074-1083. doi:10.1039/c2ja00003b
76. Gschwind S, Flamigni L, Koch J, et al. Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets. *J Anal At Spectrom.* 2011;26(6):1166-1174. doi:10.1039/c0ja00249f
77. Shigeta K, Koellensperger G, Rampler E, et al. Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into



- an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements. *J Anal At Spectrom.* 2013;28(5):637. doi:10.1039/c3ja30370e
78. Shigeta K, Traub H, Panne U, Okino A, Rottmann L, Jakubowski N. Application of a micro-droplet generator for an ICP-sector field mass spectrometer – optimization and analytical characterization. *J Anal At Spectrom.* 2013;28(5):646-656. doi:10.1039/c2ja30207a
79. Ishihara Y, Aida M, Nomura A, Miyahara H, Hokura A, Okino A. Development of desolvation system for single-cell analysis using droplet injection inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Anal Sci.* 2015;31(8):781-785. doi:10.2116/analsci.31.781
80. He M, Chen B, Wang H, Hu B. Microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry for trace elements and their species analysis in cells. *Appl Spectrosc Rev.* 2019;54(3):250-263. doi:10.1080/05704928.2019.1565864
81. Verboket PE, Borovinskaya O, Meyer N, Günther D, Dittrich PS. A new microfluidics-based droplet dispenser for ICPMS. *Anal Chem.* 2014;86(12):6012-6018. doi:10.1021/ac501149a
82. Wang H, Chen B, He M, Hu B. A Facile Droplet-Chip-Time-Resolved Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System for Determination of Zinc in Single Cell. *Anal Chem.* 2017;89(9):4931-4938. doi:10.1021/acs.analchem.7b00134
83. Wang H, Chen B, He M, Li X, Chen P, Hu B. Study on uptake of gold nanoparticles by single cells using droplet microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta.* 2019;200:398-407. doi:10.1016/j.talanta.2019.03.075
84. Wei X, Zheng DH, Cai Y, et al. High-Throughput/High-Precision Sampling of Single Cells into ICP-MS for Elucidating Cellular Nanoparticles. *Anal Chem.* 2018;90(24):14543-14550. doi:10.1021/acs.analchem.8b04471
85. Yu X, Chen B, He M, Wang H, Hu B. 3D Droplet-Based Microfluidic Device Easily Assembled from Commercially Available Modules Online Coupled with ICPMS for Determination of Silver in Single Cell. *Anal Chem.* 2019;91:2869-2875. doi:10.1021/acs.analchem.8b04844

86. Ellis SR, Bruinen AL, Heeren RMA. A critical evaluation of the current state-of-the-art in quantitative imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(5):1275-1289. doi:10.1007/s00216-013-7478-9
87. Löhr K, Traub H, Wanka AJ, Panne U, Jakubowski N. Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging. *J Anal At Spectrom.* 2018;33(9):1579-1587. doi:10.1039/c8ja00191j
88. Pisonero J, Bouzas-Ramos D, Traub H, et al. Critical evaluation of fast and highly resolved elemental distribution in single cells using LA-ICP-SFMS. *J Anal At Spectrom.* 2019;34(4):655-663. doi:10.1039/c8ja00096d
89. Wang HAO, Grolimund D, Giesen C, et al. Fast chemical imaging at high spatial resolution by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(21):10107-10116. doi:10.1021/ac400996x
90. Theiner S, Schreiber-Brynzak E, Jakupec MA, Galanski M, Koellensperger G, Keppler BK. LA-ICP-MS imaging in multicellular tumor spheroids - A novel tool in the preclinical development of metal-based anticancer drugs. *Metallomics.* 2016;8(4):398-402. doi:10.1039/c5mt00276a
91. Mueller L, Herrmann AJ, Techritz S, Panne U, Jakubowski N. Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(14):3667-3676. doi:10.1007/s00216-017-0310-1
92. Drescher D, Giesen C, Traub H, Panne U, Kneipp J, Jakubowski N. Quantitative imaging of gold and silver nanoparticles in single eukaryotic cells by laser ablation ICP-MS. *Anal Chem.* 2012;84(22):9684-9688. doi:10.1021/ac302639c
93. Hsiao IL, Bierkandt FS, Reichardt P, et al. Quantification and visualization of cellular uptake of TiO<sub>2</sub> and Ag nanoparticles: Comparison of different ICP-MS techniques. *J Nanobiotechnology.* 2016;14(1):1-13. doi:10.1186/s12951-016-0203-z
94. Van Acker T, Van Malderen SJM, Van Heerden M, McDuffie JE, Cuyckens F, Vanhaecke F. High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects. *Anal Chim*

- Acta*. 2016;945:23-30. doi:10.1016/j.aca.2016.10.014
95. Chang Q, Ornatsky OI, Siddiqui I, Loboda A, Baranov VI, Hedley DW. Imaging Mass Cytometry. *Cytom Part A*. 2017;91(2):160-169. doi:10.1002/cyto.a.23053
96. Van Malderen SJM, Managh AJ, Sharp BL, Vanhaecke F. Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bioimaging applications. *J Anal At Spectrom*. 2016;31(2):423-439. doi:10.1039/c5ja00430f
97. Douglas DN, Managh AJ, Reid HJ, Sharp BL. High-Speed, Integrated Ablation Cell and Dual Concentric Injector Plasma Torch for Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2015;87(22):11285-11294. doi:10.1021/acs.analchem.5b02466
98. Van Malderen SJM, Van Elteren JT, Vanhaecke F. Development of a fast laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry cell for sub- $\mu\text{m}$  scanning of layered materials. *J Anal At Spectrom*. 2015;30(1):119-125. doi:10.1039/c4ja00137k
99. Straus RN, Carew A, Sandkuijl D, Closson T, Baranov VI, Loboda A. Analytical figures of merit for a novel tissue imaging system. *J Anal At Spectrom*. 2017;32(5):1044-1051. doi:10.1039/c6ja00420b
100. Herrmann AJ, Techritz S, Jakubowski N, et al. A simple metal staining procedure for identification and visualization of single cells by LA-ICP-MS. *Analyst*. 2017;142(10):1703-1710. doi:10.1039/c6an02638a
101. Buckle T, Der Wal S Van, Van Malderen SJM, et al. Hybrid imaging labels: Providing the link between mass spectrometry-based molecular pathology and theranostics. *Theranostics*. 2017;7(3):624-633. doi:10.7150/thno.17484
102. Van Malderen SJM, Van Elteren JT, Vanhaecke F. Submicrometer Imaging by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry via Signal and Image Deconvolution Approaches. *Anal Chem*. 2015;87(12):6125-6132. doi:10.1021/acs.analchem.5b00700

103. Managh AJ, Edwards SL, Bushell A, et al. Single cell tracking of gadolinium labeled CD4+ T cells by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(22):10627-10634. doi:10.1021/ac4022715
104. Van Malderen SJM, Vergucht E, De Rijcke M, Janssen C, Vincze L, Vanhaecke F. Quantitative Determination and Subcellular Imaging of Cu in Single Cells via Laser Ablation-ICP-Mass Spectrometry Using High-Density Microarray Gelatin Standards. *Anal Chem.* 2016;88(11):5783-5789. doi:10.1021/acs.analchem.6b00334
105. Wang M, Zheng LN, Wang B, et al. Quantitative analysis of gold nanoparticles in single cells by laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chem.* 2014;86(20):10252-10256. doi:10.1021/ac502438n
106. Zhai J, Wang Y, Xu C, et al. Facile approach to observe and quantify the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Integrin on a Single-Cell. *Anal Chem.* 2015;87(5):2546-2549. doi:10.1021/ac504639u
107. Jakubowski N, Prohaska T, Vanhaecke F, Roos PH, Lindemann T. Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry: Part II. Applications. *J Anal At Spectrom.* 2011;26(4):727-757. doi:10.1039/c0ja00007h
108. Hamester M, Wills J, Rottmann L, Yin S. Enhancing the Performance of Single Collector Sector Field ICP-MS for Isotope Ratio Determinations. *Appl Note 30104.* 2016.
109. Vanhaecke F, Degryse P. *Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS.* Wiley-VHC; 2012.
110. Montaña MD, Badiei HR, Bazargan S, Ranville JF. Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times. *Environ Sci Nano.* 2014;1(4):338-346. doi:10.1039/c4en00058g
111. Moldovan M, Krupp EM, Holliday AE, Donard OFX. High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: A review. *J Anal At Spectrom.* 2004;19(7):815-822. doi:10.1039/b403128h
112. Meermann B, Nischwitz V. ICP-MS for the analysis at the nanoscale-a tutorial

- review. *J Anal At Spectrom.* 2018;33(9):1432-1468. doi:10.1039/c8ja00037a
113. Hendriks L, Gundlach-Graham A, Hattendorf B, Günther D. Characterization of a new ICP-TOFMS instrument with continuous and discrete introduction of solutions. *J Anal At Spectrom.* 2017;32(3):548-561. doi:10.1039/c6ja00400h
114. Borovinskaya O, Hattendorf B, Tanner M, Gschwind S, Günther D. A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets. *J Anal At Spectrom.* 2013;28(2):226-233. doi:10.1039/c2ja30227f
115. Laborda F, Jiménez-Lamana J, Bolea E, Castillo JR. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2013;28(8):1220-1232. doi:10.1039/c3ja50100k
116. Kálomista I, Kéri A, Galbács G. On the applicability and performance of the single particle ICP-MS nano-dispersion characterization method in cases complicated by spectral interferences. *J Anal At Spectrom.* 2016;31(5):1112-1122. doi:10.1039/c5ja00501a
117. Fréchette-Viens L, Hadioui M, Wilkinson KJ. Practical limitations of single particle ICP-MS in the determination of nanoparticle size distributions and dissolution: case of rare earth oxides. *Talanta.* 2017;163(2016):121-126. doi:10.1016/j.talanta.2016.10.093
118. Jakubowski N, Moens L, Vanhaecke F. Sector field mass spectrometers in ICP-MS. *Spectrochim acta, Part B At Spectrosc.* 1998;53(13):1739-1763. doi:10.1016/S0584-8547(98)00222-5
119. Jakubowski N, Prohaska T, Rottmann L, Vanhaecke F. Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry: Part I. Tutorial: Fundamentals and instrumentation. *J Anal At Spectrom.* 2011;26(4):693-726. doi:10.1039/c0ja00161a
120. Bolea-Fernandez E, Balcaen L, Resano M, Vanhaecke F. Overcoming spectral

- overlap: Via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review. *J Anal At Spectrom.* 2017;32(9):1660-1679. doi:10.1039/c7ja00010c
121. Balcaen L, Bolea-Fernandez E, Resano M, Vanhaecke F. Inductively coupled plasma - Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the interference-free determination of (ultra)trace elements - A tutorial review. *Anal Chim Acta.* 2015;894:7-19. doi:10.1016/j.aca.2015.08.053
122. Bolea-Fernandez E, Leite D, Rua-Ibarz A, et al. On the effect of using collision/reaction cell (CRC) technology in single-particle ICP-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Anal Chim Acta.* 2019;1077:95-106. doi:10.1016/j.aca.2019.05.077
123. Galbraith DW, Anderson MT, Herzenberg LA. Flow cytometric analysis and FACS sorting of cells based on GFP accumulation. *Methods Cell Biol.* 1999;58(58):315-341. doi:10.1016/s0091-679x(08)61963-9
124. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:1160-1163.
125. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry.* 2002;48(2):113. doi:10.1002/cyto.10113
126. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 1998;281(5385):2013-2016. doi:10.1126/science.281.5385.2013
127. Baranov VI, Quinn ZA, Bandura DR, Tanner SD. The potential for elemental analysis in biotechnology. *J Anal At Spectrom.* 2002;17(9):1148-1152. doi:10.1039/b201494g
128. Ornatsky O, Baranov VI, Bandura DR, Tanner SD, Dick J. Multiple cellular antigen detection by ICP-MS. *J Immunol Methods.* 2006;308(1-2):68-76. doi:10.1016/j.jim.2005.09.020
129. Atkuri KR, Stevens JC, Neubert H. Mass cytometry: A highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(2):227-

233. doi:10.1124/dmd.114.060798
130. Darzynkiewicz Z. Critical Aspects in Analysis of Cellular DNA Content. *Curr Protoc Cytom.* 2010;52(1):7.2.1-7.2.8. doi:10.1002/0471142956.cy0702s52
131. Tinhofer I, Hristozova T, Stromberger C, Keilhoiz U, Budach V. Monitoring of circulating tumor cells and their expression of EGFR/phospho-EGFR during combined radiotherapy regimens in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(5):e685-e690. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.02.009
132. Ellinger B, Silber J, Prashar A, et al. A phenotypic screening approach to identify anticancer compounds derived from marine fungi. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(3):162-175. doi:10.1089/adt.2013.564
133. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol.* 2012;33(7):323-332. doi:10.1016/j.it.2012.02.010
134. Lou X, Zhang G, Herrera I, et al. Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays. *Angew Chemie - Int Ed.* 2007;46(32):6111-6114. doi:10.1002/anie.200700796
135. Majonis D, Herrera I, Ornatsky O, et al. Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays. *Anal Chem.* 2010;82(21):8961-8969. doi:10.1021/ac101901x
136. Ornatsky OI, Lou X, Nitz M, et al. Study of Cell Antigens and Intracellular DNA by Identification of Element-Containing Labels and Metallointercalators Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry proliferation in clinical samples is important for diagnostic. *Anal Chem.* 2008;80(7):2539-2547. doi:10.1039/b710510j.as
137. Porpiglia E, Samusik N, Van Ho AT, et al. High-resolution myogenic lineage mapping by single-cell mass cytometry. *Nat Cell Biol.* 2017;19(5):558-567. doi:10.1038/ncb3507
138. Ajami B, Samusik N, Wieghofer P, et al. Single-cell mass cytometry reveals distinct

- populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nat Neurosci.* 2018;21(4):541-551. doi:10.1038/s41593-018-0100-x
139. Duckworth AD, Gherardini PF, Sykorova M, et al. Multiplexed profiling of RNA and protein expression signatures in individual cells using flow or mass cytometry. *Nat Protoc.* 2019;14(3):901-920. doi:10.1038/s41596-018-0120-8
140. Churko JM, Garg P, Treutlein B, et al. Defining human cardiac transcription factor hierarchies using integrated single-cell heterogeneity analysis. *Nat Commun.* 2018;9(1). doi:10.1038/s41467-018-07333-4
141. Gonzalez VD, Samusik N, Chen TJ, et al. Commonly Occurring Cell Subsets in High-Grade Serous Ovarian Tumors Identified by Single-Cell Mass Cytometry. *Cell Rep.* 2018;22(7):1875-1888. doi:10.1016/j.celrep.2018.01.053
142. Pelissier Vatter FA, Schapiro D, Chang H, et al. High-Dimensional Phenotyping Identifies Age-Emergent Cells in Human Mammary Epithelia. *Cell Rep.* 2018;23(4):1205-1219. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.114
143. Han S, Jiang X, Sun XF, et al. Application value of CyTOF 2 mass cytometer technology at single-cell level in human gastric cancer cells. *Exp Cell Res.* 2019;384(1):111568. doi:10.1016/j.yexcr.2019.111568
144. Zhang Y, Liu F. Multidimensional Single-Cell Analyses in Organ Development and Maintenance. *Trends Cell Biol.* 2019;29(6):477-486. doi:10.1016/j.tcb.2019.02.006
145. Schulz D, Severin Y, Zanotelli VRT, Bodenmiller B. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-38127-9
146. Sen N, Mukherjee G, Arvin AM. Single cell mass cytometry reveals remodeling of human T cell phenotypes by varicella zoster virus. *Methods.* 2015;90:85-94. doi:10.1016/j.ymeth.2015.07.008
147. Schulz D, Zanotelli VRT, Fischer JR, et al. Simultaneous Multiplexed Imaging of mRNA and Proteins with Subcellular Resolution in Breast Cancer Tissue Samples by



- Mass Cytometry. *Cell Syst.* 2018;6(1):25-36.e5. doi:10.1016/j.cels.2017.12.001
148. Giesen C, Wang HAO, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014;11(4):417-422. doi:10.1038/nmeth.2869
149. Liu Z, Xue A, Chen H, Li S. Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(3):1475-1483. doi:10.1007/s00253-018-09587-w
150. Abad-Álvaro I, Peña-Vázquez E, Bolea E, Bermejo-Barrera P, Castillo JR, Laborda F. Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(19):5089-5097. doi:10.1007/s00216-016-9515-y
151. Hineman A, Stephan C. Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(7):1252-1257. doi:10.1039/c4ja00097h
152. Montaña MD, Majestic BJ, Jämting ÅK, Westerhoff P, Ranville JF. Methods for the Detection and Characterization of Silica Colloids by Microsecond spICP-MS. *Anal Chem.* 2016;88(9):4733-4741. doi:10.1021/acs.analchem.5b04924
153. Iwai T, Shigeta K, Aida M, Ishihara Y, Miyahara H, Okino A. A transient signal acquisition and processing method for micro-droplet injection system inductively coupled plasma mass spectrometry (M-DIS-ICP-MS). *J Anal At Spectrom.* 2015;30(7):1617-1622. doi:10.1039/c4ja00480a
154. Strenge I, Engelhard C. Capabilities of fast data acquisition with microsecond time resolution in inductively coupled plasma mass spectrometry and identification of signal artifacts from millisecond dwell times during detection of single gold nanoparticles. *J Anal At Spectrom.* 2016;31(1):135-144. doi:10.1039/c5ja00177c
155. Tsang CN, Ho KS, Sun H, Chan WT. Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single helicobacter pylori cells. *J Am Chem Soc.* 2011;133(19):7355-7357. doi:10.1021/ja2013278

156. Kuhn HR, Guillong M, Günther D. Size-related vaporisation and ionisation of laser-induced glass particles in the inductively coupled plasma. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(4):1069-1074. doi:10.1007/s00216-003-2346-7
157. Gustavsson A. The determination of some nebulizer characteristics. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 1984;39(5):743-746. doi:10.1016/0584-8547(84)80159-7
158. Ebdon L, Foulkes M, Sutton K. Slurry nebulization in plasmas. *J Anal At Spectrom.* 1997;12(2):213-229. doi:10.1039/a604914a
159. Ebdon L, Collier AR. Particle size effects on kaolin slurry analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 1988;43(4-5):355-369. doi:10.1016/0584-8547(88)80064-8
160. Ebdon L, Foulkes ME, Hill S. Direct atomic spectrometric analysis by slurry atomisation. Part 9. Fundamental studies of refractory samples. *J Anal At Spectrom.* 1990;5(1):67-73. doi:10.1039/ja9900500067
161. Goodall P, Foulkes ME, Ebdon L. Slurry nebulization inductively coupled plasma spectrometry-the fundamental parameters discussed. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 1993;48(13):1563-1577. doi:10.1016/0584-8547(93)80143-I
162. Mochizuki T, Sakashita A, Iwata H, Ishibashi Y, Gunji N. Application of slurry nebulization to trace elemental analysis of some biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Fresenius J Anal Chem.* 1991;339(12):889-894. doi:10.1007/BF00321672
163. Van Borm WAH, A.C. Broekaert J, Klockenkämper R, Tschöpel P, Adams FC. Aerosol sizing and transport studies with slurry nebulization in inductively coupled plasma spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 1991;46(6-7):1033-1049. doi:10.1016/0584-8547(91)80100-H
164. Pace HE, Rogers NJ, Jarolimek C, Coleman VA, Higgins CP, Ranville JF. Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83(24):9361-9369. doi:10.1021/ac201952t

- 
165. Smith DD, Browner RF. Measurement of Aerosol Transport Efficiency in Atomic Spectrometry. *Anal Chem.* 1982;54(3):533-537. doi:10.1021/ac00240a041
166. Cuello-Nuñez S, Abad-Álvaro I, Bartczak D, et al. The accurate determination of number concentration of inorganic nanoparticles using spICP-MS with the dynamic mass flow approach. *J Anal At Spectrom.* 2020. doi:10.1039/c9ja00415g
167. Absher M. *Hemocytometer Counting.* Vol 309. ACADEMIC PRESS, INC.; 1973. doi:10.1016/b978-0-12-427150-0.50098-x
168. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology.* 2005;63(4):992-1003. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.026
169. Schlenke P, Frohn C, Klüter H, et al. Evaluation of a flow cytometric method for simultaneous leukocyte phenotyping and quantification by fluorescent microspheres. *Cytometry.* 1998;33(3):310-317. doi:10.1002/(SICI)1097-0320(19981101)33:3<310::AID-CYTO4>3.0.CO;2-K
170. Tuoriniemi J, Cornelis G, Hassellöv M. Size discrimination and detection capabilities of single-particle ICPMS for environmental analysis of silver nanoparticles. *Anal Chem.* 2012;84(9):3965-3972. doi:10.1021/ac203005r
171. Cornelis G, Hassellöv M. A signal deconvolution method to discriminate smaller nanoparticles in single particle ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(1):134-144. doi:10.1039/c3ja50160d
172. Mozhayeva D, Engelhard C. A quantitative nanoparticle extraction method for microsecond time resolved single-particle ICP-MS data in the presence of a high background. *J Anal At Spectrom.* 2019;34(8):1571-1580. doi:10.1039/c9ja00042a
173. López-Serrano Oliver A, Baumgart S, Bremser W, et al. Quantification of silver nanoparticles taken up by single cells using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode. *J Anal At Spectrom.* 2018;33(7):1256-1263. doi:10.1039/c7ja00395a
174. Wei X, Hu LL, Chen ML, Yang T, Wang JH. Analysis of the distribution pattern of

- chromium species in single cells. *Anal Chem.* 2016;88(24):12437-12444. doi:10.1021/acs.analchem.6b03810
175. Shen X, Zhang H, He X, et al. Evaluating the treatment effectiveness of copper-based algaecides on toxic algae *Microcystis aeruginosa* using single cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(21):5531-5543. doi:10.1007/s00216-019-01933-9
176. Ulrich AB, Pour PM. Cell Lines. *Encycl Genet.* 2001:310-311. doi:10.1006/rwgn.2001.0173
177. Lehninger AL, Cox MM, Nelson DL. *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York: W.H. Freeman; 2008.
178. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):1-10. doi:10.1186/1423-0127-17-36
179. Walker K, Skelton H, Smith K. Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. *J Cutan Pathol.* 2002;29(10):616-618. doi:10.1034/j.1600-0560.2002.291009.x
180. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2006;23(3):185-202. doi:10.1002/yea.1349
181. Van Der Klei I, Veenhuis M, Brul S, et al. Cytology, cell walls and septa: A summary of yeast cell biology from a phylogenetic perspective. *The Yeasts.* 2011;1:111-128. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00008-2
182. Aguilar-Uscanga B, François JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37(3):268-274. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x
183. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl WH. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microb Cell Fact.* 2005;4:1-16. doi:10.1186/1475-2859-4-31
184. Anwar MI, Muhammad F, Awais MM, Akhtar M. A review of  $\beta$ -glucans as a growth

- promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *Worlds Poult Sci J.* 2017;73(3):651-661. doi:10.1017/S0043933917000241
185. Kubitschek HE. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J Bacteriol.* 1990;172(1):94-101. doi:10.1128/jb.172.1.94-101.1990
186. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32(2):149-167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
187. Vollmer W, Seligman SJ. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* 2010;18(2):59-66. doi:10.1016/j.tim.2009.12.004
188. Turner RD, Vollmer W, Foster SJ. Different walls for rods and balls: The diversity of peptidoglycan. *Mol Microbiol.* 2014;91(5):862-874. doi:10.1111/mmi.12513
189. Egan AJF, Cleverley RM, Peters K, Lewis RJ, Vollmer W. Regulation of bacterial cell wall growth. *FEBS J.* 2017;284(6):851-867. doi:10.1111/febs.13959
190. Domozych DS, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen MD, Ulvskov P, Willats WGT. The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. *Front Plant Sci.* 2012;3(MAY):1-8. doi:10.3389/fpls.2012.00082
191. Volcani BE. Cell Wall Formation in Diatoms: Morphogenesis and Biochemistry. *Silicon Siliceous Struct Biol Syst.* 1981:157-200. doi:10.1007/978-1-4612-5944-2\_7
192. Thavarajah R, Mudimbaimannar V, Rao U, Ranganathan K, Elizabeth J. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):400. doi:10.4103/0973-029X.102496
193. Rooban Thavarajah, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao U, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):400-405.
194. Troiano NW, Ciovacco WA, Kacena MA. The effects of fixation and dehydration on the histological quality of undecalcified murine bone specimens embedded in methylmethacrylate. *J Histotechnol.* 2009;32(1):27-31. doi:10.1179/his.2009.32.1.27
195. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the

- content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1961-1971. doi:10.1016/S0002-9440(10)64472-0
196. Kiernan JA. HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL METHODS:THEORY AND PRACTICE, 3rd EDITION. *Shock.* 1999;12(6). [https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/1999/12000/HISTOLOGICAL\\_AND\\_HISTOCHEMICAL\\_METHODS\\_THEORY\\_AND.12.aspx](https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/1999/12000/HISTOLOGICAL_AND_HISTOCHEMICAL_METHODS_THEORY_AND.12.aspx).
197. Haraguchi H. Metallomics: Integrated biometal science. *Met Recent Anal Tech Appl.* 2017;3-39. doi:10.1007/978-4-431-56463-8\_1
198. Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. Metalloproteins and metal sensing. *Nature.* 2009;460(7257):823-830. doi:10.1038/nature08300
199. Wang H, Wang M, Wang B, et al. Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system. *Anal Bioanal Chem.* 2017;409(5):1415-1423. doi:10.1007/s00216-016-0075-y
200. Shi J, Ji X, Wu Q, et al. Tracking Mercury in Individual Tetrahymena Using a Capillary Single-Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Online System. *Anal Chem.* 2019. doi:10.1021/acs.analchem.9b03719
201. Lau W-Y, Chun K, Chan WT. Correlation of single-cell ICP-MS intensity distribution for the study of heterogeneous cellular responses to environmental stresses. *J Anal At Spectrom.* 2017;32. doi:10.1039/C6JA00348F
202. Elser JJ, Kyle MM, Smith MS, Nagy JD. Biological Stoichiometry in Human Cancer. *PLoS One.* 2007;2(10):e1028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001028>.
203. Silva MP, Tomal A, Pérez CA, Ribeiro-Silva A, Poletti ME. Determination of Ca, Fe, Cu and Zn and their correlations in breast cancer and normal adjacent tissues. *X-Ray Spectrom.* 2009;38(2):103-111. doi:10.1002/xrs.1126
204. Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(6):542-564. doi:10.1016/j.ctrv.2007.05.001
205. Chen B, Liu Q, Popowich A, et al. Therapeutic and analytical applications of arsenic

- binding to proteins. *Metallomics*. 2015;7(1):39-55. doi:10.1039/c4mt00222a
206. Mann KK, Wallner B, Lossos IS, Miller WH. Darinaparsin: A novel organic arsenical with promising anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(11):1727-1734. doi:10.1517/13543780903282759
207. Zhou Y, Wang H, Tse E, Li H, Sun H. Cell Cycle-Dependent Uptake and Cytotoxicity of Arsenic-Based Drugs in Single Leukemia Cells. *Anal Chem*. 2018;90(17):10465-10471. doi:10.1021/acs.analchem.8b02444
208. Feillet C, van der Horst GTJ, Levi F, Rand DA, Delaunay F. Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: Implication for healthy cells and malignant growth. *Front Neurol*. 2015;6(MAY):1-7. doi:10.3389/fneur.2015.00096
209. Boucrot E, Kirchhausen T. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(19):7939-7944. doi:10.1073/pnas.0702511104
210. Tong J, Sun D, Yang C, et al. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells. *Res Vet Sci*. 2016;105:10-14. doi:10.1016/j.rvsc.2016.01.008
211. Zhou Y, Li H, Sun H. Cytotoxicity of arsenic trioxide in single leukemia cells by time-resolved ICP-MS together with lanthanide tags. *Chem Commun*. 2017;53(20):2970-2973. doi:10.1039/c7cc00143f
212. Ge R, Sun H. Bioinorganic chemistry of bismuth and antimony: Target sites of metallodrugs. *Acc Chem Res*. 2007;40(4):267-274. doi:10.1021/ar600001b
213. Yang N, Sun H. Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. *Coord Chem Rev*. 2007;251(17):2354-2366. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.03.003
214. Gersey ZC, Rodriguez GA, Barbarite E, et al. Curcumin decreases malignant characteristics of glioblastoma stem cells via induction of reactive oxygen species. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1-11. doi:10.1186/s12885-017-3058-2

215. Liao H, Wang Z, Deng Z, Ren H, Li X. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(6):8948-8957.
216. Sun QX, Wei X, Zhang SQ, Chen ML, Yang T, Wang JH. Single cell analysis for elucidating cellular uptake and transport of cobalt curcumin complex with detection by time-resolved ICPMS. *Anal Chim Acta*. 2019;1066:13-20. doi:10.1016/j.aca.2019.03.062
217. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573-584. doi:10.1038/nrc2167
218. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: A review. *Br J Cancer*. 1993;(67):1171-1176.
219. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14298-14302. doi:10.1073/pnas.162491399
220. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467-2498. doi:10.1021/cr980421n
221. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1):9-23. doi:10.1016/j.ctrv.2006.09.006
222. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res*. 2016;106:27-36. doi:10.1016/j.phrs.2016.01.001
223. Siddik ZH. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47 REV. ISS. 6):7265-7279. doi:10.1038/sj.onc.1206933
224. Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(2):298-307. doi:10.1016/j.bcp.2006.10.003
225. Espina M, Corte-Rodríguez M, Aguado L, et al. Cisplatin resistance in cell models evaluation of metallomic and biological predictive biomarkers to address early



- therapy failure. *Metallomics*. 2017;9(5):564-574. doi:10.1039/c7mt00014f
226. Gabano E, Cassino C, Bonetti S, et al. Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments: Biological activity of the resulting complexes. *Org Biomol Chem*. 2005;3(19):3531-3539. doi:10.1039/b507716h
227. Chang Q, Ornatsky OI, Koch CJ, et al. Single-cell measurement of the uptake, intratumoral distribution and cell cycle effects of cisplatin using mass cytometry. *Int J Cancer*. 2015;136(5):1202-1209. doi:10.1002/ijc.29074
228. Fienberg HG, Simonds EF, Fantl WJ, Nolan GP, Bodenmiller B. A platinum-based covalent viability reagent for single-cell mass cytometry. *Cytom Part A*. 2012;81A(6):467-475. doi:10.1002/cyto.a.22067
229. Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol*. 2018;9(1):1050-1074. doi:10.3762/bjnano.9.98
230. Dreaden EC, Alkilany AM, Huang X, Murphy CJ, El-Sayed MA. The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2740-2779. doi:10.1039/c1cs15237h
231. Cao G, Wang Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*.; 2011.
232. Hyeon T. Chemical Synthesis of Magnetic Nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 2003;34:927-934. doi:10.1002/chin.200324224
233. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. *J Nanoparticle Res*. 2008;10(3):507-517. doi:10.1007/s11051-007-9275-x
234. Xiao L, Takada H, Maeda K, Haramoto M, Miwa N. Antioxidant effects of water-soluble fullerene derivatives against ultraviolet ray or peroxy lipid through their action of scavenging the reactive oxygen species in human skin keratinocytes. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(7):351-358. doi:10.1016/J.BIOPHA.2005.02.004

235. Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE. Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicol Sci.* 2011;123(1):264-280. doi:10.1093/toxsci/kfr148
236. Candás-Zapico S, Kutscher DJ, Montes-Bayón M, Bettmer J. Single particle analysis of TiO<sub>2</sub> in candy products using triple quadrupole ICP-MS. *Talanta.* 2018;180:309-315. doi:10.1016/J.TALANTA.2017.12.041
237. Soto-Alvaredo J, Montes-Bayón M, Bettmer J. Speciation of silver nanoparticles and silver(I) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS. *Anal Chem.* 2013;85(3):1316-1321. doi:10.1021/ac302851d
238. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):MR17-MR71. doi:10.1116/1.2815690
239. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev.* 2012;41(6):2323-2343. doi:10.1039/c1cs15188f
240. Boyes SG, Rowe MD, Hotchkiss J. GOLD NANOPARTICLE CONJUGATES AND USES THEREOF. 2009;1(19).
241. Doria G, Conde J, Veigas B, et al. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors.* 2012;12(2):1657-1687. doi:10.3390/s120201657
242. Kim D, Yu MK, Lee TS, Park JJ, Jeong YY, Jon S. Amphiphilic polymer-coated hybrid nanoparticles as CT/MRI dual contrast agents. *Nanotechnology.* 2011;22(15). doi:10.1088/0957-4484/22/15/155101
243. Tiwari P, Vig K, Dennis V, Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials.* 2011;1(1):31-63. doi:10.3390/nano1010031
244. Gibson JD, Khanal BP, Zubarev ER. Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2007;(24):11653-11661.
245. Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum(IV) warheads. *J Am*

- Chem Soc.* 2009. doi:10.1021/ja9071282
246. Park H, Yang J, Lee J, Haam S, Choi IH, Yoo KH. Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments. *ACS Nano.* 2009;3(10):2919-2926. doi:10.1021/nn900215k
247. Prabakaran M, Grailer JJ, Pilla S, Steeber DA, Gong S. Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials.* 2009;30(30):6065-6075. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.048
248. Vankayala R, Huang YK, Kalluru P, Chiang CS, Hwang KC. First demonstration of gold nanorods-mediated photodynamic therapeutic destruction of tumors via near infra-red light activation. *Small.* 2014;10(8):1612-1622. doi:10.1002/smll.201302719
249. Pan Y, Leifert A, Ruau D, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small.* 2009;5(18):2067-2076. doi:10.1002/smll.200900466
250. Li JJ, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LYL. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials.* 2010;31(23):5996-6003. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.014
251. De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials.* 2008;29(12):1912-1919. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.037
252. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(4):649-655. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.046
253. Abdelhalim M, Jarrar BM. Gold nanoparticles administration induced prominent inflammatory, central vein intima disruption, fatty change and Kupffer cells hyperplasia. *Lipids Health Dis.* 2011;10:1-6. doi:10.1186/1476-511X-10-133

254. Hwang JH, Kim SJ, Kim YH, et al. Susceptibility to gold nanoparticle-induced hepatotoxicity is enhanced in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Toxicology*. 2012;294(1):27-35. doi:10.1016/j.tox.2012.01.013
255. Cardoso E, Londero E, Ferreira GK, et al. Gold nanoparticles induce DNA damage in the blood and liver of rats. *J Nanoparticle Res*. 2014;16(11). doi:10.1007/s11051-014-2727-1
256. Karmali PP, Simberg D. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: Implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(3):343-357. doi:10.1517/17425247.2011.554818
257. Szekeres GP, Fernández-Iglesias N, Kneipp J, Montes-Bayón M, Bettmer J. Mass spectrometric approach for the analysis of the hard protein corona of nanoparticles in living cells. *J Proteomics*. 2020;212:103582. doi:10.1016/j.jprot.2019.103582
258. Lopez-Chaves C, Soto-Alvaredo J, Montes-Bayon M, Bettmer J, Llopis J, Sanchez-Gonzalez C. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2018;14(1):1-12. doi:10.1016/j.nano.2017.08.011
259. Soto-Alvaredo J, López-Chaves C, Sánchez-González C, Montes-Bayón M, Llopis J, Bettmer J. Speciation of gold nanoparticles and low-molecular gold species in Wistar rat tissues by HPLC coupled to ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2017;32(1):193-199. doi:10.1039/c6ja00248j
260. Legat J, Matczuk M, Timerbaev AR, Jarosz M. Cellular processing of gold nanoparticles: CE-ICP-MS evidence for the speciation changes in human cytosol. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(3):1151-1156. doi:10.1007/s00216-017-0749-0
261. Wang X, Hu X, Li J, et al. Influence of cell size on cellular uptake of gold nanoparticles. *Biomater Sci*. 2016;4(6):970-978. doi:10.1039/c6bm00171h
262. Borker S, Patole M, Moghe A, Pokharkar V. Engineering of glycyrrhizin capped gold nanoparticles for liver targeting:: In vitro evaluation and in vivo biodistribution study. *RSC Adv*. 2016;6(51):44944-44954. doi:10.1039/c6ra05202a

- 
263. Yao M, He L, McClements DJ, Xiao H. Uptake of Gold Nanoparticles by Intestinal Epithelial Cells: Impact of Particle Size on Their Absorption, Accumulation, and Toxicity. *J Agric Food Chem*. 2015;63(36):8044-8049. doi:10.1021/acs.jafc.5b03242
264. López-Serrano Oliver A, Haase A, Peddinghaus A, et al. Mass Cytometry Enabling Absolute and Fast Quantification of Silver Nanoparticle Uptake at the Single Cell Level. *Anal Chem*. 2019;91(18):11514-11519. doi:10.1021/acs.analchem.9b01870
265. Ivask A, Mitchell AJ, Hope CM, Barry SC, Lombi E, Voelcker NH. Single Cell Level Quantification of Nanoparticle-Cell Interactions Using Mass Cytometry. *Anal Chem*. 2017;89(16):8228-8232. doi:10.1021/acs.analchem.7b01006
266. Braun GB, Friman T, Pang HB, et al. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat Mater*. 2014;13(9):904-911. doi:10.1038/nmat3982
267. Yang B, Chen B, He M, Hu B. Quantum Dots Labeling Strategy for “counting and Visualization” of HepG2 Cells. *Anal Chem*. 2017;89(3):1879-1886. doi:10.1021/acs.analchem.6b04314
268. Yang B, Chen B, He M, Yin X, Xu C, Hu B. Aptamer-Based Dual-Functional Probe for Rapid and Specific Counting and Imaging of MCF-7 Cells. *Anal Chem*. 2018;90(3):2355-2361. doi:10.1021/acs.analchem.7b04927
269. Li X, Chen B, He M, Hu B. Immunodetection and counting of circulating tumor cells (HepG2) by combining gold nanoparticle labeling, rolling circle amplification and ICP-MS detection of gold. *Microchim Acta*. 2019;186(6). doi:10.1007/s00604-019-3476-8
270. Haefeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J Bacteriol*. 1984;158(1):389-392. doi:10.1128/jb.158.1.389-392.1984
271. Nair B, Pradeep T. Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by *Lactobacillus* Strains. *Cryst Growth Des*. 2002;2(4):293-298. doi:10.1021/cg0255164

272. Senapati S, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R. Extracellular Biosynthesis of Bimetallic Au–Ag Alloy Nanoparticles. *Small*. 2005;1(5):517-520. doi:10.1002/sml.200400053
273. Zheng D, Hu C, Gan T, Dang X, Hu S. Preparation and application of a novel vanillin sensor based on biosynthesis of Au-Ag alloy nanoparticles. *Sensors Actuators, B Chem*. 2010;148(1):247-252. doi:10.1016/j.snb.2010.04.031
274. Sweeney RY, Mao C, Gao X, et al. Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. *Chem Biol*. 2004;11:1553-1559.
275. Labrenz M, Druschel GK, Gilbert B, et al. Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. *Science*. 2000;290:1744-1747.
276. Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles by a Novel Extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir*. 2003;15:3550-3553.
277. Li X, Xu H, Chen ZS, Chen G. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanomater*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/270974
278. Jeevanandam J, Chan YS, Danquah MK. Biosynthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *ChemBioEng Rev*. 2016;3(2):55-67. doi:10.1002/cben.201500018
279. Hosea M, Greene B, Mcpherson R, Henzl M, Dale Alexander M, Darnall DW. Accumulation of elemental gold on the alga *Chlorella vulgaris*. *Inorganica Chim Acta*. 1986;123(3):161-165. doi:10.1016/S0020-1693(00)86339-2
280. Scarano G, Morelli E. Properties of phytochelatin-coated CdS nanocrystallites formed in a marine phytoplanktonic alga (*Phaeodactylum tricornutum*, Bohlin) in response to Cd. *Plant Sci*. 2003;165(4):803-810. doi:10.1016/S0168-9452(03)00274-7
281. Priyabrata Mukherjee, Satyajyoti Senapati, Deendayal Mandal, Absar Ahmad, M. Islam Khan, RajivKumar and MS. Extracellular Synthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem Bio Chem*. 2002;5(5):461-463. doi:10.1002/02/03/05

282. Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, et al. Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*. *J Am Chem Soc.* 2002;124(41):12108-12109. doi:10.1021/ja027296o
283. Kowshik M, Vogel W, Urban J, Kulkarni S, Paknikar K. Microbial Synthesis of Semiconductor PbS Nanocrystallites. *Adv Mater.* 2002;14:815-818. doi:10.1002/1521-4095(20020605)14:11<815::AID-ADMA815>3.0.CO;2-K
284. Meenal K, Shriwas A, Sharmin K, et al. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnology.* 2003;14(1):95-100.
285. Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie MR. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;29:235-241. doi:10.1016/j.jtemb.2014.07.020
286. Cremonini E, Zonaro E, Donini M, et al. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microb Biotechnol.* 2016;9(6):758-771. doi:10.1111/1751-7915.12374
287. Herrero E, Wellinger RE. Yeast as a model system to study metabolic impact of selenium compounds. *Microb Cell.* 2015;2(5):139-149. doi:10.15698/mic2015.05.200
288. Lampis S, Zonaro E, Bertolini C, Bernardi P, Butler CS, Vallini G. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. *Microb Cell Fact.* 2014;13(1):1-14. doi:10.1186/1475-2859-13-35
289. Lampis S, Zonaro E, Bertolini C, et al. Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: Novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles. *J Hazard Mater.* 2017;324:3-14. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.02.035
290. Schrauzer GN. Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. *Pure Appl Chem.* 2006;78(1):105-109. doi:10.1351/pac200678010105

291. Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr.* 2004;92(4):557-573. doi:10.1079/BJN20041251
292. Bierla K, Szpunar J, Yiannikouris A, Lobinski R. Comprehensive speciation of selenium in selenium-rich yeast. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2012;41:122-132. doi:10.1016/j.trac.2012.08.006
293. Mester Z, Willie S, Yang L, et al. Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385(1):168-180. doi:10.1007/s00216-006-0338-0
294. Dhanjal S, Cameotra SS. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microb Cell Fact.* 2010;9:1-11. doi:10.1186/1475-2859-9-52
295. Elahian F, Reisi S, Shahidi A, Mirzaei SA. High-throughput bioaccumulation, biotransformation, and production of silver and selenium nanoparticles using genetically engineered *Pichia pastoris*. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2017;13(3):853-861. doi:10.1016/j.nano.2016.10.009
296. Dwivedi S, AlKhedhairy AA, Ahamed M, Musarrat J. Biomimetic Synthesis of Selenium Nanospheres by Bacterial Strain JS-11 and Its Role as a Biosensor for Nanotoxicity Assessment: A Novel Se-Bioassay. *PLoS One.* 2013;8(3):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0057404
297. Liang X, Perez MAMJ, Nwoko KC, et al. Fungal formation of selenium and tellurium nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(17):7241-7259. doi:10.1007/s00253-019-09995-6
298. Jiménez-Lamana J, Abad-Álvaro I, Bierla K, Laborda F, Szpunar J, Lobinski R. Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS. *J Anal At Spectrom.* 2018;33(3):452-460. doi:10.1039/c7ja00378a
299. Schwarz G, Mueller L, Beck S, Linscheid MW. DOTA based metal labels for protein quantification: A review. *J Anal At Spectrom.* 2014;29(2):221-233.



- doi:10.1039/c3ja50277e
300. Waentig L, Jakubowski N, Hardt S, Scheler C, Roos PH, Linscheid MW. Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2012;27(8):1311-1320. doi:10.1039/c2ja30068k
301. Mueller L, Mairinger T, Hermann G, Koellensperger G, Hann S. Characterization of metal-tagged antibodies used in ICP-MS-based immunoassays. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(1):163-169. doi:10.1007/s00216-013-7416-x
302. Yang YSS, Atukorale PU, Moynihan KD, et al. High-throughput quantitation of inorganic nanoparticle biodistribution at the single-cell level using mass cytometry. *Nat Commun.* 2017;8:1-9. doi:10.1038/ncomms14069
303. Liang Y, Liu Q, Zhou Y, et al. Counting and Recognizing Single Bacterial Cells by a Lanthanide-Encoding Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Approach. *Anal Chem.* 2019;91(13):8341-8349. doi:10.1021/acs.analchem.9b01130
304. Ortmayr K, Schwaiger M, Hann S, Koellensperger G. An integrated metabolomics workflow for the quantification of sulfur pathway intermediates employing thiol protection with N-ethyl maleimide and hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst.* 2015;140(22):7687-7695. doi:10.1039/c5an01629k
305. Stasio G De, Casalbore P, Pallini R, et al. Gadolinium in Human Glioblastoma Cells for Gadolinium Neutron Capture Therapy. *Cancer Res.* 2001:4272-4277.
306. Corte Rodriguez M, Espina M, Sierra LM, Blanco E, Ames T, Montes-Bayón M S-MA. Quantitative evaluation of cellular uptake , DNA incorporation and adduct formation in cisplatin sensitive and resistant cell lines : Comparison of different Pt-containing drugs. *Biochem Pharmacol.* 2015;(98):69-77. doi:10.1016/j.bcp.2015.08.112
307. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 2005;58(1):1-26. <https://0-www-nature-com.pugwash.lib.warwick.ac.uk/articles/ja20051.pdf>.

308. Flärdh K, Buttner MJ. Streptomyces morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(1):36-49. doi:10.1038/nrmicro1968
309. Yagüe P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca Á. Pre-sporulation stages of Streptomyces differentiation: State-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;342(2):79-88. doi:10.1111/1574-6968.12128
310. Bobek J, Šmídová K, Čihák M. A waking review: Old and novel insights into the spore germination in Streptomyces. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV):1-12. doi:10.3389/fmicb.2017.02205
311. Bobek J, Strakova E, Zikova A, Vohradsky J. Changes in activity of metabolic and regulatory pathways during germination of *S. coelicolor*. *BMC Genomics.* 2014;15(1). doi:10.1186/1471-2164-15-1173
312. Strakova E, Bobek J, Zikova A, et al. Systems insight into the spore germination of streptomyces coelicolor. *J Proteome Res.* 2013;12(1):525-536. doi:10.1021/pr300980v
313. De Jong W, Manteca A, Sanchez J, et al. NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol.* 2009;71(6):1591-1603. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06633.x
314. Ueda K, Tomaru Y, Endoh K, Beppu T. Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in Streptomyces tanashiensis. *J Antibiot (Tokyo).* 1997;50(8):693-695. doi:10.7164/antibiotics.50.693
315. Keijser BJ, van Wezel GP, Canters GW, Kieser T, Vijgenboom E. The ram-dependence of Streptomyces lividans differentiation is bypassed by copper. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2000;2(4):565-574. <http://europepmc.org/abstract/MED/11075933>.
316. Dwarakanath S, Chaplin AK, Hough MA, Rigali S, Vijgenboom E, Worrall JAR. Response to copper stress in Streptomyces lividans extends beyond genes under direct control of a copper-sensitive operon repressor protein (CsoR). *J Biol Chem.* 2012;287(21):17833-17847. doi:10.1074/jbc.M112.352740

317. Worrall JAR, Vijgenboom E. Copper mining in *Streptomyces*: Enzymes, natural products and development. *Nat Prod Rep.* 2010;27(5):742-756. doi:10.1039/b804465c
318. Salas JA, Guijarro JA, Hardisson C. High calcium content in *Streptomyces* spores and its release as an early event during spore germination. *J Bacteriol.* 1983;155(3):1316-1323. doi:10.1128/jb.155.3.1316-1323.1983
319. Clark LC, Combs Jr GF, Turnbull BW, et al. Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin: A Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 1996;276(24):1957-1963. doi:10.1001/jama.1996.03540240035027
320. Klein EA. Selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:234-241. doi:10.1196/annals.1331.023
321. Gilbert-López B, Dernovics M, Moreno-González D, Molina-Díaz A, García-Reyes JF. Detection of over 100 selenium metabolites in selenized yeast by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017;1060(May):84-90. doi:10.1016/j.jchromb.2017.06.001
322. Sutton KL, Ponce De Leon CA, Ackley KL, Sutton RMC, Stalcup AM, Caruso JA. Development of chiral HPLC for selenoamino acids with ICP-MS detection: Application to selenium nutritional supplements. *Analyst.* 2000;125(2):281-286. doi:10.1039/a907847i
323. Ponce de León CA, Bayón MM, Paquin C, Caruso JA. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *J Appl Microbiol.* 2002;92(4):602-610. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01562.x
324. Jagtap R, Maher W. Determination of selenium species in biota with an emphasis on animal tissues by HPLC-ICP-MS. *Microchem J.* 2016;124:422-529. doi:10.1016/j.microc.2015.07.014
325. Kubachka KM, Hanley T, Mantha M, et al. Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chem.* 2017;218:313-320.

- doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.086
326. Bierla K, Godin S, Lobinski R, Szpunar J. Advances in electrospray mass spectrometry for the selenium speciation: Focus on Se-rich yeast. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2018;104:87-94. doi:10.1016/j.trac.2017.10.008
327. Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(6):2555-2566. doi:10.1007/s00253-016-7300-7
328. Fernández JG, Sánchez-González C, Bettmer J, et al. Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures. *Anal Chim Acta.* 2018;1039:24-30. doi:10.1016/j.aca.2018.08.003
329. Zhang J, Lu H, Wang X. MS07116 sodium selenosulfate synthesis and demonstration of its in vitro cytotoxic activity against HepG2, Caco2, and three kinds of leukemia cells. *Biol Trace Elem Res.* 2008;125(1):13-21. doi:10.1007/s12011-007-8044-0
330. Loeschner K, Hadrup N, Hansen M, et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics.* 2014;6(2):330-337. doi:10.1039/c3mt00309d
331. Tugarova A V., Vetchinkina EP, Loshchinina EA, Burov AM, Nikitina VE, Kamnev AA. Reduction of Selenite by *Azospirillum brasilense* with the Formation of Selenium Nanoparticles. *Microb Ecol.* 2014;68(3):495-503. doi:10.1007/s00248-014-0429-y
332. Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, Spycher M, Bachofen R. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(11):4734-4740. doi:10.1128/aem.65.11.4734-4740.1999
333. Sötebier CA, Weidner SM, Jakubowski N, Panne U, Bettmer J. Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis. *J Chromatogr A.*

- 2016;1468:102-108. doi:10.1016/j.chroma.2016.09.028
334. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics (Environmental Science and Technology (2008) 42, (4133-4139)). *Environ Sci Technol.* 2008;42(18):7025-7026. doi:10.1021/es801501j
335. Hagendorfer H, Kaegi R, Traber J, et al. Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization - Prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles. *Anal Chim Acta.* 2011;706(2):367-378. doi:10.1016/j.aca.2011.08.014
336. Schmidt B, Loeschner K, Hadrup N, et al. Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 2011;83(7):2461-2468. doi:10.1021/ac102545e
337. López-Sanz S, Fariñas NR, Martín-Doimeadios R del CR, Ríos Á. Analytical strategy based on asymmetric flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS and complementary techniques to study gold nanoparticles transformations in cell culture medium. *Anal Chim Acta.* 2019;1053:178-185. doi:10.1016/j.aca.2018.11.053
338. Helfrich A, Brüchert W, Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques. *J Anal At Spectrom.* 2006;21(4):431-434. doi:10.1039/b511705d
339. Gray EP, Bruton TA, Higgins CP, Halden RU, Westerhoff P, Ranville JF. Analysis of gold nanoparticle mixtures: A comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2012;27(9):1532-1539. doi:10.1039/c2ja30069a
340. Helfrich A, Bettmer J. Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS-based hyphenated and complementary ESI-MS techniques. *Int J Mass Spectrom.* 2011;307(1-3):92-98. doi:10.1016/j.ijms.2011.01.010
341. Franze B, Engelhard C. Fast separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic

- chromatography coupled to ICP-MS. *Anal Chem.* 2014;86(12):5713-5720. doi:10.1021/ac403998e
342. Su CK, Sun YC. Considerations of inductively coupled plasma mass spectrometry techniques for characterizing the dissolution of metal-based nanomaterials in biological tissues. *J Anal At Spectrom.* 2015;30(8):1689-1705. doi:10.1039/c5ja00132c
343. Gray EP, Coleman JG, Bednar AJ, Kennedy AJ, Ranville JF, Higgins CP. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ Sci Technol.* 2013;47(24):14315-14323. doi:10.1021/es403558c
344. Loeschner K, Brabrand MSJ, Sloth JJ, Larsen EH. Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS Characterisation of Nanomaterials in Biological Samples. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(16):3845-3851. doi:10.1007/s00216-013-7431-y
345. Dan Y, Zhang W, Xue R, Ma X, Stephan C, Shi H. Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. *Environ Sci Technol.* 2015;49(5):3007-3014. doi:10.1021/es506179e
346. Jenkins S V., Qu H, Mudalige T, et al. Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood. *Biomaterials.* 2015;51:226-237. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.01.072
347. Yang Y, Luo L, Li HP, et al. Analysis of metallic nanoparticles and their ionic counterparts in complex matrix by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS. *Talanta.* 2018;182(January):156-163. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.077
348. López-Sanz S, Fariñas NR, Vargas RS, Martín-Doimeadios R del CR, Ríos A. Methodology for monitoring gold nanoparticles and dissolved gold species in culture medium and cells used for nanotoxicity tests by liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta.* 2017;164:451-457. doi:10.1016/j.talanta.2016.11.060

349. Malejko J, Świerżewska N, Bajguz A, Godlewska-Żyłkiewicz B. Method development for speciation analysis of nanoparticle and ionic forms of gold in biological samples by high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc.* 2018;142:1-7. doi:10.1016/j.sab.2018.01.014
350. Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol.* 2011;8:1-14. doi:10.1186/1743-8977-8-18
351. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ.* 2012;438:225-232. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.066
352. Gondikas AP, Morris A, Reinsch BC, Marinakos SM, Lowry G V., Hsu-Kim H. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environ Sci Technol.* 2012;46(13):7037-7045. doi:10.1021/es3001757
353. Allen TM, Cullis PR. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science.* 2004;303(5665):1818-1822. doi:10.1126/science.1095833
354. Lee CC, MacKay JA, Fréchet JMJ, Szoka FC. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2005;23(12):1517-1526. doi:10.1038/nbt1171
355. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):145-160. doi:10.1038/nrd1632
356. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):206-212. doi:10.1016/j.addr.2012.09.033
357. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. 84 Nat nanotech 2007 R Langer Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.pdf. *Nat Nanotechnol.* 2007;2:751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
358. Schmid G. Large metal clusters and colloids - Metals in the embryonic state. *Prog*

- Colloid Polym Sci.* 1998;111:52-57. doi:10.1007/bfb0118109
359. Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, Esche H, Schmid G. Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small.* 2005;1(8-9):841-844. doi:10.1002/smll.200500104
360. Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(11):1289-1306. doi:10.1016/j.addr.2008.03.013
361. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 2005;1(3):325-327. doi:10.1002/smll.200400093
362. Park C, Youn H, Kim H, et al. Cyclodextrin-covered gold nanoparticles for targeted delivery of an anti-cancer drug. *J Mater Chem.* 2009;19(16):2310-2315. doi:10.1039/b816209c
363. Han G, You CC, Kim BJ, et al. Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew Chemie - Int Ed.* 2006;45(19):3165-3169. doi:10.1002/anie.200600214
364. Hong R, Han G, Fernández JM, Kim BJ, Forbes NS, Rotello VM. Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J Am Chem Soc.* 2006;128(4):1078-1079. doi:10.1021/ja056726i
365. Lai SK, Hida K, Man ST, et al. Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway. *Biomaterials.* 2007;28(18):2876-2884. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.02.021
366. Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, et al. Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae. *Biomacromolecules.* 2009;10(8):2074-2085. doi:10.1021/bm900128x
367. Chou LYT, Ming K, Chan WCW. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):233-245. doi:10.1039/c0cs00003e
368. Mahmoudi M, Meng J, Xue X, et al. Interaction of stable colloidal nanoparticles with cellular membranes. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):679-692. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.012



369. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-557. doi:10.1038/nmat2442
370. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y. Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *Small*. 2011;7(10):1322-1337. doi:10.1002/smll.201100001
371. Hirota K, Ter H. Endocytosis of Particle Formulations by Macrophages and Its Application to Clinical Treatment. *Mol Regul Endocytosis*. 2012. doi:10.5772/45820
372. Yu Y. Resolving Endosome Rotation in Intracellular Trafficking. *Biophys J*. 2018;114(3):630a. doi:10.1016/j.bpj.2017.11.3403
373. Lu F, Wu SH, Hung Y, Mou CY. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*. 2009;5(12):1408-1413. doi:10.1002/smll.200900005
374. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chem Soc Rev*. 2017;46(14):4218-4244. doi:10.1039/c6cs00636a
375. Ventola CL. Progress in nanomedicine: Approved and investigational nanodrugs. *P T*. 2017;42(12):742-755.
376. Biswas AK, Islam MR, Choudhury ZS, Mostafa A, Kadir MF. Nanotechnology based approaches in cancer therapeutics. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2014;5(4). doi:10.1088/2043-6262/5/4/043001
377. Hauck TS, Ghazani AA, Chan WCW. Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small*. 2008;4(1):153-159. doi:10.1002/smll.200700217
378. Min Y, Akbulut M, Kristiansen K, Golan Y, Israelachvili J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nanosci Technol A Collect Rev from Nat Journals*. 2009:38-49. doi:10.1142/9789814287005\_0005
379. Wei P, Zhang L, Lu Y, Man N, Wen L. C60(Nd) nanoparticles enhance chemotherapeutic susceptibility of cancer cells by modulation of autophagy. *Nanotechnology*. 2010;21(49). doi:10.1088/0957-4484/21/49/495101

380. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*. 2010;6(1):12-21. doi:10.1002/smll.200901158
381. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-3666. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065
382. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol*. 2008;3(3):145-150. doi:10.1038/nnano.2008.30
383. Panariti A, Miserocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl*. 2012;5(1):87-100. doi:10.2147/NSA.S25515
384. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. Nanoparticles: Molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*. 2011;85(7):733-741. doi:10.1007/s00204-010-0546-4
385. Dausend J, Musyanovych A, Dass M, et al. Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in Hela cells. *Macromol Biosci*. 2008;8(12):1135-1143. doi:10.1002/mabi.200800123
386. Chompoosor A, Saha K, Ghosh PS, et al. The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles. *Small*. 2010;6(20):2246-2249. doi:10.1002/smll.201000463
387. Holzapfel V, Lorenz M, Weiss CK, Schrezenmeier H, Landfester K, Mailänder V. Synthesis and biomedical applications of functionalized fluorescent and magnetic dual reporter nanoparticles as obtained in the miniemulsion process. *J Phys Condens Matter*. 2006;18(38). doi:10.1088/0953-8984/18/38/S04
388. Lorenz MR, Holzapfel V, Musyanovych A, et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials*. 2006;27(14):2820-2828. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.022
389. Orr G, Panther DJ, Phillips JL, et al. Submicrometer and nanoscale inorganic particles exploit the actin machinery to be propelled along microvilli-like structures

- into alveolar cells. *ACS Nano*. 2007;1(5):463-475. doi:10.1021/nn700149r
390. Bajak E, Fabbri M, Ponti J, et al. Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2015;233(2):187-199. doi:10.1016/j.toxlet.2014.12.008
391. Glass Expansion. No Title. [https://www.geicp.com/cgi-bin/site/wrapper.pl?c1=Products\\_single\\_cell](https://www.geicp.com/cgi-bin/site/wrapper.pl?c1=Products_single_cell). Accessed July 7, 2020.
392. Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, et al. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol*. 2003;21(10):1215-1221. doi:10.1038/nbt865
393. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998;16(9):373-378. doi:10.1016/S0167-7799(98)01214-1
394. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-1189. doi:10.1080/004982599238047
395. Ryan D, Robards K, Ryan D, Robards K. Metabolomics : The Greatest Omics of Them All ? Metabolomics : The Greatest Omics of Them All ? *Society*. 2016;78(February):7954-7958. doi:10.1021/ac0614341
396. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2005;24(4):285-294. doi:10.1016/j.trac.2004.11.021
397. Dervilly-Pinel G, Weigel S, Lommen A, et al. Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. *Anal Chim Acta*. 2011;700(1-2):144-154. doi:10.1016/j.aca.2011.02.008
398. Madalinski G, Godat E, Alves S, et al. Direct introduction of biological samples into a LTQ-orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *Anal Chem*. 2008;80(9):3291-3303. doi:10.1021/ac7024915

399. Junot C, Madalinski G, Tabet JC, Ezan E. Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. *Analyst*. 2010;135(9):2203-2219. doi:10.1039/c0an00021c
400. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID. LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2008;27(3):251-260. doi:10.1016/j.trac.2008.01.008
401. Idborg H, Zamani L, Edlund P, Schuppe-Koistinen I, Jacobsson S. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2005;828:9-13. doi:10.1016/j.jchromb.2005.07.031
402. Schwaiger M, Schoeny H, El Abiead Y, Hermann G, Rampler E, Koellensperger G. Merging metabolomics and lipidomics into one analytical run. *Analyst*. 2019;144(1):220-229. doi:10.1039/c8an01219a
403. Hermann G, Schwaiger M, Volejnik P, Koellensperger G. <sup>13</sup>C-labelled yeast as internal standard for LC–MS/MS and LC high resolution MS based amino acid quantification in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;155:329-334. doi:10.1016/j.jpba.2018.03.050

---

## ***7. Publicaciones Derivadas***

---



## 7.1. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Se enumeran y se adjuntan a continuación las publicaciones realizadas en revistas científicas que derivan de la presente Tesis Doctoral:

1. M. Corte Rodríguez\*, R. Álvarez-Fernández García\*, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.*, **2017**, 89, 11491-11497.
2. N. González-Quiñónez, M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, B. Rioseras, M. T. López-García, G. Fernández-García, M. Montes-Bayón, A. Manteca, P. Yagüe, Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*, *Sci. Rep.*, **2019**, 9:4214,1-18.
3. R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K. L. LeBlanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: analytical strategies based on ICP-TQ-MS, *Analyst*, **2020**, 145, 1457-1465.
4. R. Álvarez-Fernández García, N. Fernández-Iglesias, C. López-Chaves, C. Sánchez-González, J. Llopis, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Complementary techniques (spICP-MS, TEM, and HPLC-ICP-MS) reveal the degradation of 40 nm citrate-stabilized Au nanoparticles in rat liver after intraperitoneal injection, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2019**, 55, 1-5.
5. M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: current developments and remaining challenges, *Trends Anal. Chem.*, **2020**, 132, 1-16.

## 7.2. Otras publicaciones

El artículo número 6 surge de una colaboración con Javier A. Menendez, del grupo de Metabolismo y Cáncer del Instituto Catalán de Oncología tras la aplicación de un método cromatográfico desarrollado previamente en el grupo de investigación para la determinación de la metilación del ADN, cuyo desarrollo experimental no aparece en la Tesis, ya que no guarda relación con la temática de esta. La publicación número 7 surge de una breve estancia de investigación en la Universidad de Creta en la que se llevó a cabo un experimento de mesocosmos para estudiar el efecto de la adición de nanopartículas de plata y plata iónica en microorganismos marinos.

6. E. Cuyàs, S. Fernández-Arroyo, S. Verdura, R. Álvarez-Fernández García, J. Stursa, L. Werner, E. Blanco-González, M. Montes-Bayón, J. Joven, B. Viollet, J. Neuzil, J. A. Menendez, Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism, *Oncogene*, **2017**, 1-25.
7. M. I. Chronakis, E. Mavrakis, R. Álvarez-Fernández García, S. A. Pergantis, C. Stephan, Monitoring the fate of silver nanoparticles in seawater using single particle ICP-MS, *Application Note PerkinElmer*, **2019**.
8. M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, D. J. Kutscher, Towards Automated Routine Analysis of the Distribution of Trace Elements in Single Cells Using ICP-MS, *Curr. Trends Mass Spectrom.*, **2020**, 18, 6.



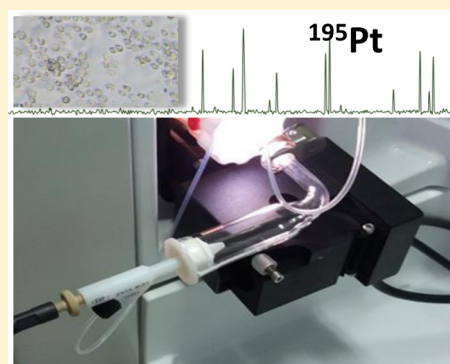
# Quantitative Evaluation of Cisplatin Uptake in Sensitive and Resistant Individual Cells by Single-Cell ICP-MS (SC-ICP-MS)

M. Corte Rodríguez,<sup>†</sup> R. Álvarez-Fernández García,<sup>†</sup> E. Blanco, J. Bettmer,<sup>\*†</sup> and M. Montes-Bayón<sup>\*†</sup>

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

## Supporting Information

**ABSTRACT:** One of the main limitations to the Pt-therapy in cancer is the development of associated drug resistance that can be associated with a significant reduction of the intracellular platinum concentration. Thus, intracellular Pt concentration could be considered as a biomarker of cisplatin resistance. In this work, an alternative method to address intracellular Pt concentration in individual cells is explored to permit the evaluation of different cell models and alternative therapies in a relatively fast way. For this aim, total Pt analysis in single cells has been implemented using a total consumption nebulizer coupled to inductively coupled plasma mass spectrometric detection (ICP-MS). The efficiency of the proposed device has been evaluated in combination with flow cytometry and turned out to be around 25% (cells entering the ICP-MS from the cells in suspension). Quantitative uptake studies of a nontoxic Tb-containing compound by individual cells were conducted and the results compared to those obtained by bulk analysis of the same cells. Both sets of data were statistically comparable. Thus, final application of the developed methodology to the comparative uptake of Pt-species in cisplatin resistant and sensitive cell lines (A2780cis and A2780) was conducted. The results obtained revealed the potential of this analytical strategy to differentiate between different cell lines of different sensitivity to the drug which might be of high medical interest.



Since its approval by the Food and Drug Administration in 1978, cisplatin is one of the most commonly used chemotherapeutics in the treatment of different cancers, such as ovarian, testicular, or lung cancer.<sup>1,2</sup> The main mechanism of action of cisplatin begins with the uptake of cisplatin by the cells, followed by its transport through the cytosol to the cell nucleus. In this process, cisplatin is activated by aquation of its Pt–Cl bonds, followed by its binding to DNA, preferentially to the nitrogen-7 of the guanine residues.<sup>3,4</sup> This ability to cross-link with the purine bases on the DNA generating the so-called Pt-DNA adducts causes DNA damage, which is the ultimate event in its cytotoxic activity that eventually engenders cell death.<sup>5</sup> However, cisplatin acquired resistance is one of the major drawbacks of this drug therapy and the paths that lead to it are unclear and multifactorial.<sup>6</sup> Resistance to cisplatin can occur due to a combination of events such as an altered cellular accumulation of the drug, its cytosolic inactivation and altered DNA repair of the formed cisplatin-DNA adducts.<sup>7</sup> A decreased accumulation of cisplatin in cancer cells seems to be an important source of resistance that has been frequently observed in cisplatin-resistant cells.<sup>7</sup> Such event could be due to either a decreased cellular uptake or an increased cellular export of the drug.<sup>8</sup> Incorporation of cisplatin into cells was thought to occur through passive diffusion although more recent reports reveal the important role of specific membrane transporters, such as the copper transporters CTR1 and CTR2 for the uptake<sup>9</sup> or P-type ATPase or ATP-binding cassette

transporters for the export.<sup>10</sup> In any case, the determination of intracellular Pt concentration seems to be an important parameter to consider for detecting cellular resistance.<sup>11</sup>

In this vein, several attempts have been made to quantify platinum incorporation in cisplatin-treated cellular cultures and animal models. However, most of these experiments are bulk studies, in which Pt concentration obtained after cell lysis is averaged with respect to the number or mass of cells or is made relative to the cell protein concentration.<sup>12,13</sup> This strategy provides the average Pt content in the cells but does not consider the variation between individual cells once exposed to a given cisplatin dose. In this regard, it has been long known that biological populations are heterogeneous and, thus, that it is more interesting to obtain information about individual cells rather than settling for average information.

For detection of metals like Pt in cells, colorimetric methods have been classically applied.<sup>14</sup> They rely on the fact that many inorganic complexes are distinguished by their intense visible absorption spectrum and many histochemical methods are based on such changes. Although these methods are useful for studying metal distribution in tissues in a qualitative manner, they do not show sufficient sensitivity for single-cell studies.

Received: July 14, 2017

Accepted: October 12, 2017

Published: October 12, 2017

Regarding mass spectrometric based methods, metal cellular distribution has been accomplished by using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and secondary ion mass spectrometry (SIMS).<sup>15,16</sup> The latter one with spot sizes around 50 nm permits, in addition, the imaging of subcellular structures.

For the monitoring of elements in single cells it is mandatory to introduce individual cells into the ionization source. This requires an appropriate dilution of the sample accompanied by short integration times. Li et al. introduced the first approach to investigate the behavior of bacteria introduced into an ICP-MS using fast data acquisition for  $U^+$  detection (4 ms).<sup>17</sup> Further work involved the use of mass cytometry, which is a variation of flow cytometry, in which antibodies were labeled with heavy metal ion tags rather than fluorochromes for multiplex detection of different cell biomarkers using a similar cell introduction principle.<sup>18</sup> In this approach, antibodies against specific biomarkers present on the cell surface have been designed and then labeled with different lanthanides. The individual cellular introduction and the (quasi)-simultaneous time-of-flight (TOF) selection of the  $m/z$  of the different lanthanides permits multiplex biomarker determination. Recently, such individual cellular introduction into the ICP-MS has been exploited to conduct initial studies on individual cisplatin uptake into cells.<sup>19</sup> Finally, single cell techniques employing special sample introduction systems involving microfluidic devices like microdroplet generators (MDG)<sup>20–22</sup> or different nebulizers have been successfully applied to the determination of constituting elements or specific metallodrugs in single cells with ICP-MS detection (single cell ICP-MS, SC-ICP-MS).<sup>23,24</sup> Recently, the combination of a concentric micronebulizer (PFA-ST) and a heated single-pass spray chamber was applied to the study on the variation of element masses and distribution patterns in individual cells.<sup>25</sup> A novel coupling of a droplet chip for single cell encapsulation to a microflow nebulizer was applied to the analysis of single cells after incubation with ZnO nanoparticles.<sup>26</sup> Finally, Zheng et al. studied the  $Gd@C_{82}(OH)_{22}$  and cisplatin uptake of HeLa and 16HBE cells and reported Pt contents of up to approximately 2 pg per cell.<sup>27</sup>

Thus, in this work, the evaluation of single-cell analysis with ICP-MS detection using a self-developed liquid introduction system based on a total consumption microflow nebulizer for introduction of cells into the ICP-MS is conducted. The system has been evaluated with three different models: Fe as a constitutive element; a Tb-complex (nonessential and non-toxic) and finally, the cisplatin (nonessential and toxic to cells). The combination of flow cytometry data with ICP-MS measurements is shown to address, accurately, the number of cells in the suspension and thus, the efficiency of the sample introduction system. This setup is explored to address cisplatin uptake in ovarian cancer cell lines that are sensitive (A2780) and resistant (A2780cis) to the drug in order to obtain clinically relevant data in cancer chemotherapy.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

**Materials and Methods. Reagents.** All chemicals were of analytical reagent grade or better. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) and was used throughout this work. HPLC-grade methanol was obtained from Sigma-Aldrich. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) and dissolved daily to obtain a

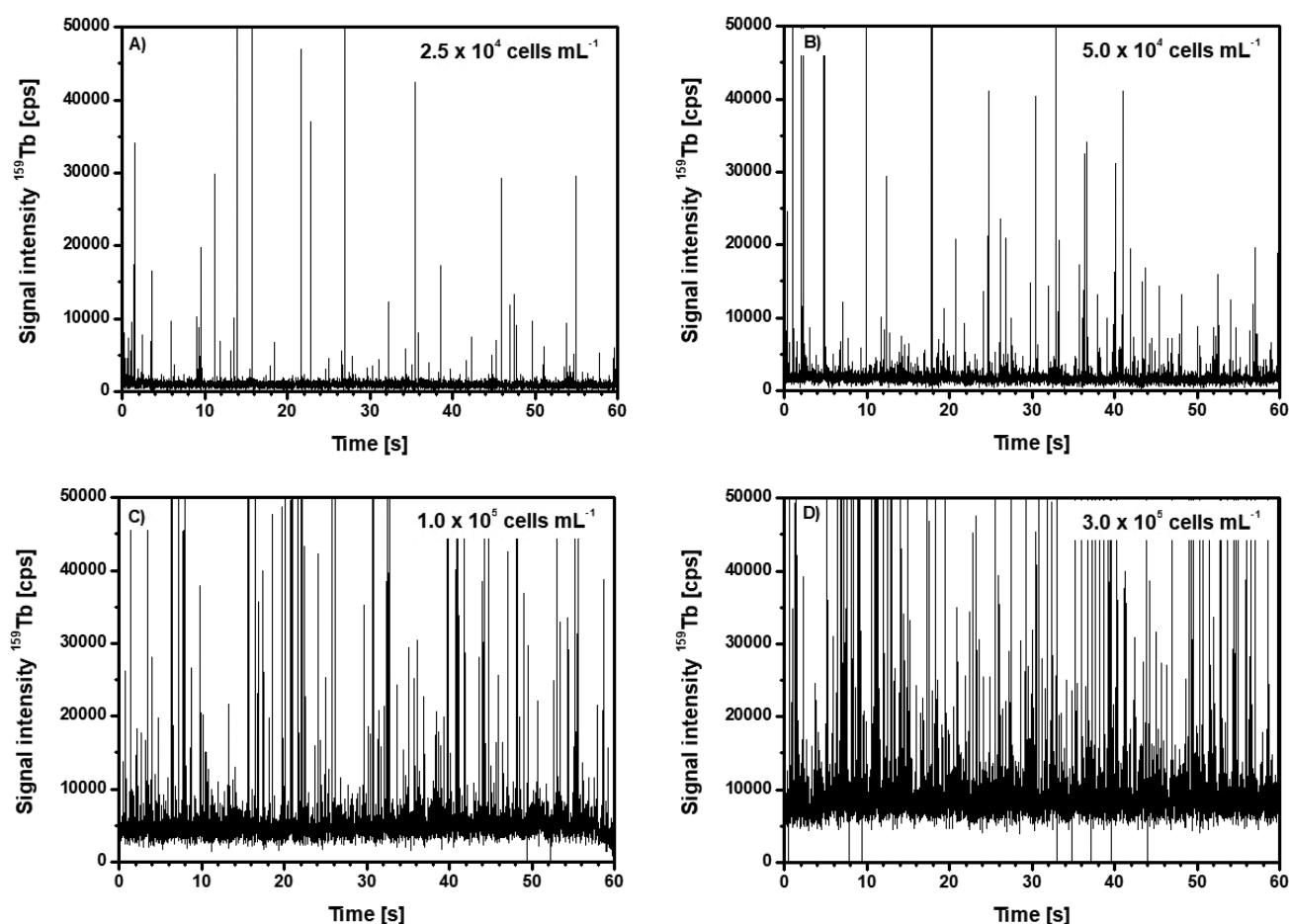
1 mg mL<sup>-1</sup> stock solution in water. For cell culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate-buffered saline (PBS) and trypsin were from LabClinics (Barcelona, Spain), sodium chloride (ACS reagent, ≥99.0%, Sigma-Aldrich), fetal bovine serum was from Invitrogen (Fisher Scientific, Madrid, Spain), and plasmocin was from InvivoGen (San Diego, U.S.A.). Cellstripper was purchased from Thermo Fisher Scientific (Madrid, Spain).

A Tb complex of diethylenetriaminepentaacetic acid (Tb-DTPA) was used to evaluate cell uptake. It was synthesized using DTPA and TbCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, both from Sigma-Aldrich. They were mixed and incubated at 37 °C for 2 h to obtain a solution of the complex in a concentration of 20 mmol L<sup>-1</sup>.

**Instrumentation.** All the experiments were conducted in the ICP-MS Agilent 7700 (Agilent Technologies, Japan) fitted with an EnyaMist nebulizer (Burgener, Ontario, Canada) and a self-developed single pass spray chamber of an internal volume of about 10 mL. A similar system is described elsewhere,<sup>28</sup> however, within this work no additional gas connection was needed. The samples and rinsing solutions were pumped at a flow rate of 10 μL min<sup>-1</sup> into the nebulizer using the syringe pump SP101i (Florida, USA) fitted with a 1 mL Hamilton syringe (Nevada, U.S.A.). The dwell time was set to 10 ms in order to be able to detect single-cell events. The data were recorded in time-resolved analysis mode during 3 min per analysis. Under these conditions, only a single isotope could be measured in one run due to the sequential nature of the measurements in a quadrupole system.

A Flow Cytometer FC 500 series from Beckman Coulter (California, U.S.A.) was used. For accurate cell counting, BD Trucount Tubes (BD Biosciences, New Jersey, U.S.A.) were used. These contain a determined number of beads, which are mixed with a known volume of cells and then vortexed thoroughly (at low speed) to resuspend the beads and reduce cell aggregation before running the mixture in the flow cytometer. The instrument separates the population of beads from the cells and calculates the number of cells that pass through the laser beam related to the known number of beads also counted. The flow cytometry increases the accuracy of cell counting compared to hemocytometers.

**Cell Culture Conditions.** A2780 human ovarian carcinoma cell line was a kind gift of Dr. J.M. Pérez Freije (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo). The in vitro-derived cisplatin-resistant A2780cis cell line was purchased from the European Collection of cell cultures through Sigma-Aldrich. The cells were cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator using DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 5 mg L<sup>-1</sup> of plasmocin. The cell cultures were exposed to cisplatin at 10 and 20 μmol L<sup>-1</sup> and to Tb-DTPA at 5, 10, and 20 μmol L<sup>-1</sup>, respectively, during 24 h at 37 °C. In order to obtain a homogeneous contact between the drug and the cells, solutions containing cisplatin or Tb-DTPA in the cell growing medium were freshly prepared. The initially used cell culture medium was then replaced by metallo-complex containing medium. Nontreated cells (control) were also processed alongside the drug-treated cells. Afterward, the cells were washed three times with PBS and collected by trypsinization. At this point, cells were always counted by means of two different systems: a hemocytometer and a flow cytometer using the BD Trucount Tubes. As alternative to PBS washing, the cells were three times washed with 0.9% solution of NaCl. Finally, Cellstripper was tested as gentle, non-enzymatic reagent to dissociate adherent cells in cell cultures.<sup>29</sup>



**Figure 1.** Time-resolved scans of  $^{159}\text{Tb}$  obtained for different cell concentrations treated with  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  of Tb-DTPA: (A)  $2.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , (B)  $5.0 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ , (C)  $1.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , and (D)  $3.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ .

For single cell analysis, the collected cells were diluted with 10% methanol to the required concentration. As recommended by the manufacturer, the addition of small amounts of an organic modifier is necessary for the undisturbed operation of the EnyaMist nebulizer. For the bulk analysis of Tb in the cell suspension, cells were digested with concentrated  $\text{HNO}_3$  at  $70^\circ\text{C}$  for 1 h and 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 3 h at the same temperature. Then, the digested solution was diluted with ultrapure water and the metal content determined by ICP-MS as previously optimized.<sup>12</sup>

**Data Treatment.** For the data treatment of single cell suspension measurements, an established iterative procedure was followed<sup>30,31</sup> based on averaging the entire data set and collecting all data points that are three standard deviations ( $3\sigma$ ) above the mean. The resulting data set after removing the selected events is rearranged and the procedure is repeated until no new data points are above the  $3\sigma$  threshold. After the selection of the single cell signals, those higher than  $3\sigma$  above their mean were discarded.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Optimization of Liquid Sample Introduction System and Time-Resolved Analysis for Single Cell Analysis.** First experiments were conducted using the A2780 cell line incubated with the complex Tb-DTPA to address the possibility of using the total consumption sample introduction system to detect events corresponding to single cells in the ICP-MS. These cells of ovarian carcinoma represent eukaryotic

cells with an average diameter of  $5.6 \mu\text{m}$  and were introduced into the nebulizer by continuous pumping at  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Most of the tested cells maintained an intact cellular morphology and stay in a monodisperse state during nebulization. Only a low percentage of cells were disrupted during the transport and nebulization process, as can be seen in Figure S1. In such a way, each ICP-MS spike signal corresponds to one individual cell event. However, one of the limitations of such simple introduction system might be the possibility of having more than one cell simultaneously passing through the nebulizer at a time, generating overlapping events that cannot be distinguished from each other. The common strategy to prevent such situation is to prepare highly diluted suspensions of particles (or cells, in this case), in which mostly individual events correspond to single cells. For this aim, the cell number density was optimized in order to obtain a statistically relevant number of cells in a time period of 3 min and minimizing double- and multiple-cell events. The cell number concentration has to be low enough, so that most droplets do not contain any cell and the probability of having two or more cells can be neglected. This optimization was done by measuring different cell densities of Tb-treated cells.

The complex Tb-DTPA penetrates into cells without showing significant toxicity and can be easily detected by ICP-MS (low blank levels from cells).<sup>32</sup> Figure 1 shows the events corresponding to an approximate number of cells per mL of  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , and  $3 \times 10^5$ , respectively. As can be observed, an increase in the number of cells seems to be

directly related with the number of detected events in the ICP-MS, as reported in the case of single particle analysis. In addition, even in the case of low number of cells, the events can be clearly distinguished from the background noise. The mean net signals varied between 4000 and 10000 cps for the lower concentrated cell populations and increased for the higher ones due to the enhanced introduction of more than one cell per integration time. Each individual cell event detected in the ICP-MS using 10 ms integration time provides an ion cloud from an individual cell that is large enough to produce a detectable signal. It has to be taken into account that even when the typical lifetime of a droplet or particle in the ICP has been reported to be about 0.2–0.5 ms, 10 ms is within the range of optimum reading efficiency obtained in previous experiments conducted by other authors with a similar sample introduction system.<sup>23</sup> As mentioned above, with increasing cell concentrations the number of very intense signals (>500000 cps) ascended. This indicated the introduction of two and more cells within the integration time of 10 ms.

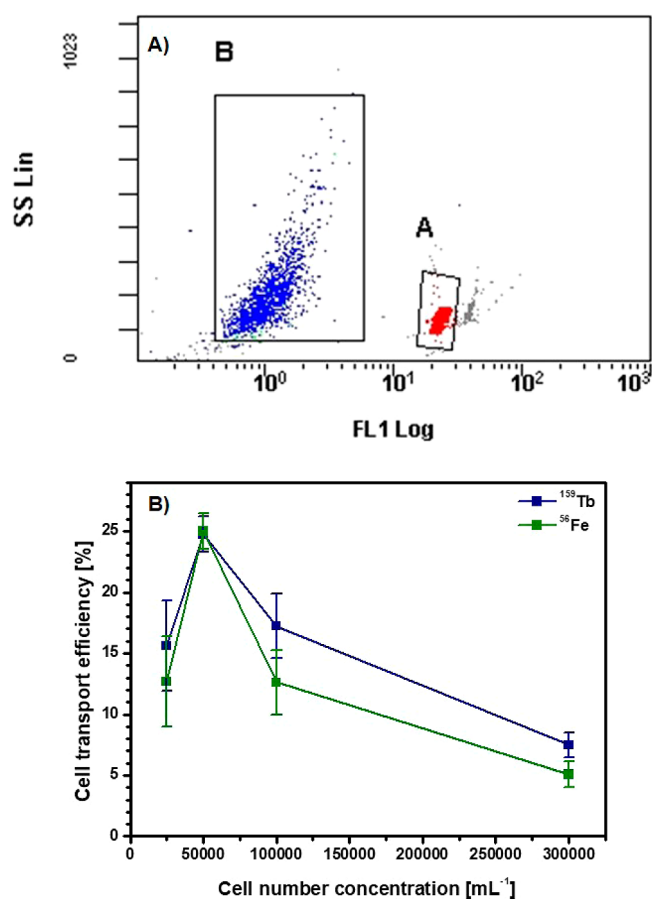
**Efficiency for Single Cell Introduction: The Combination with Flow Cytometry.** According to Degueldre et al.<sup>33</sup> and adapting the terms from single-particle to single-cell analysis, the frequency of the cell events ( $f$ ) (number of pulses per millisecond) can be related to the cell number concentration,  $N_C$ , the sample flow rate,  $q_{\text{liq}}$  ( $\text{mL ms}^{-1}$ ), and the transport efficiency ( $\eta_n$ ) by eq 1:

$$f = N_C \cdot q_{\text{liq}} \cdot \eta_n \quad (1)$$

Thus, transport efficiency,  $\eta_n$ , is proportional to the ratio  $f/N_C$ . While increasing  $N_C$ ,  $f$  increases proportionally while double-cell events are negligible. Above a certain cell concentration, this cannot be assumed anymore and, due to these double-cell events,  $f$  does not increase proportionally to  $N_C$ , thus, decreasing the ratio  $f/N_C$ . The maximum transport efficiency and the maximum cell concentration that can be used with the presented setup will then be obtained just before double-cell events are too frequent, which can be obtained from the maximum obtained when plotting  $\eta_n$  versus  $N_C$ .

In order to obtain this plot, a more accurate evaluation of the number of introduced cells (than the conventional hemocytometer) was conducted by using flow cytometer which permits accurate cell counting (to obtain  $N_C$ ) by using the BD Trucount beads following the manufacturer's instructions. Such beads are premixed with a known volume of cells and then vortexed thoroughly to resuspend beads and reduce cell aggregation before running the mixture on the flow cytometer which counts the sorted populations of either beads or cells. After counting a certain number of beads, the flow cytometer calculates the number of cells of an aliquot considering the number of events detected and the initial and detected number of beads (see Figure 2A). This system permits an accurate determination of the number of cells in suspension.

We compared the number of events obtained for  $^{56}\text{Fe}$  (measured in untreated cells) and  $^{159}\text{Tb}$  in Tb-DTPA-treated cells during 180 s at  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . The cell number density of the suspension was determined by flow cytometry. With these parameters it was possible to calculate the efficiency of the system for cell introduction and the results can be observed in Figure 2B. The total number of detected cell events within 180 s increased with rising cell number concentration from approximately 110 to 680 for Tb and 95 to 456 for Fe. Under optimum conditions, the cell introduction efficiency is



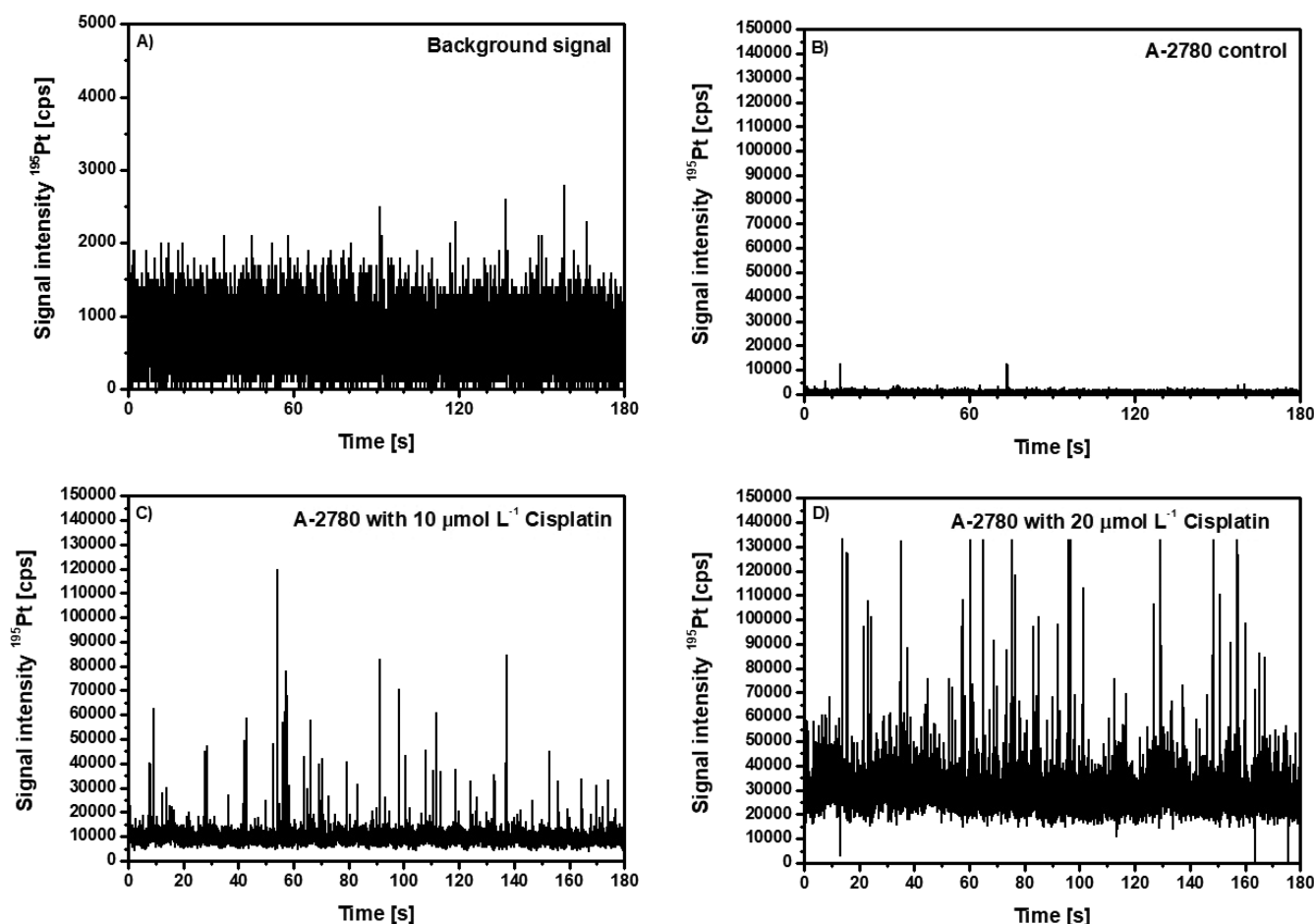
**Figure 2.** (A) Flow cytometric analysis of the beads (A) and cells (B) (FL1 Log represents, in logarithmic scale, the forward scatter signal intensity, which is proportional to cell size and SS Lin means the side scatter signal intensity, which is proportional to cell granularity) and (B) determined transport efficiency vs cell number concentration for  $^{56}\text{Fe}$  and  $^{159}\text{Tb}$  ( $N = 3$ ).

about 25% for the two tested elements using  $5 \times 10^4$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . The corresponding histograms are shown in Figure S2. Higher cell number density can cause overlapping of cell signals, with a final decrease in system efficiency, as observed at  $3 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in Figure 2B. All these results are summarized in Table 1..

Since the aim of the work was to quantitatively address cellular uptake of metallodrugs, additional experiments were conducted in order to address the changes in the height of the

**Table 1.** Comparison of the Cell Transport Data for  $^{56}\text{Fe}$  (Constitutive Element) and  $^{159}\text{Tb}$  (as Cell Marker)

cell number concn ( $\text{mL}^{-1}$ )	$^{56}\text{Fe}$ as constitutive element		
	event frequency (Hz)	No. of events in 180 s	transport efficiency (%)
25000	0.53	95	12.7
50000	2.08	375	25.0
100000	2.10	378	12.6
300000	2.53	456	5.1
	$^{159}\text{Tb}$ -DTPA as cell marker		
25000	0.65	117	15.6
50000	2.06	371	24.7
100000	2.87	517	17.2
300000	3.73	672	7.5



**Figure 3.** Time-resolved scans of  $^{195}\text{Pt}$  obtained for the A2780 cells treated under different conditions. (A) Obtained background signal without introducing any cell suspension, (B) without cisplatin incubation, (C) after treatment with  $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin, and (D) after treatment with  $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin.

events with regard to the Tb-DTPA uptake by the cells. Therefore, the events corresponding to the solutions containing the same number of cells (about  $6 \times 10^5$  cells) of different cell cultures exposed to 5, 10, and  $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$  of Tb-DTPA, respectively, were analyzed. The variation on the height of the events with the Tb-DTPA concentration revealed to be related to the Tb-doses employed for cell exposure. This relation was not linear which is not surprising since different uptake mechanisms can be triggered at specific doses. The next step was to address if we can use the single cell method to calculate the individual Tb content in each cell. For this aim, a calibration curve of Tb was constructed using inorganic Tb standards that were measured under the same conditions. The mass of Tb in each of these standards was represented versus the count rate for each of the calibration standards. Similarly, the mass of Tb in the single cells exposed to  $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$  Tb-DTPA was calculated using eq 2:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \quad (2)$$

where  $m_c$  is the mass of the element in the cell,  $\eta$  is the transport efficiency of the inorganic standard solutions (calculated using NIST certified gold nanoparticles RM 8012 in the single particle mode using the particle number method suggested by Pace et al.<sup>30</sup>);  $F$  is the sample flow into the system,  $t$  is the integration time,  $I$  is the count rate of Tb in the single

cell, and  $b$  is the slope of the Tb calibration curve previously obtained.

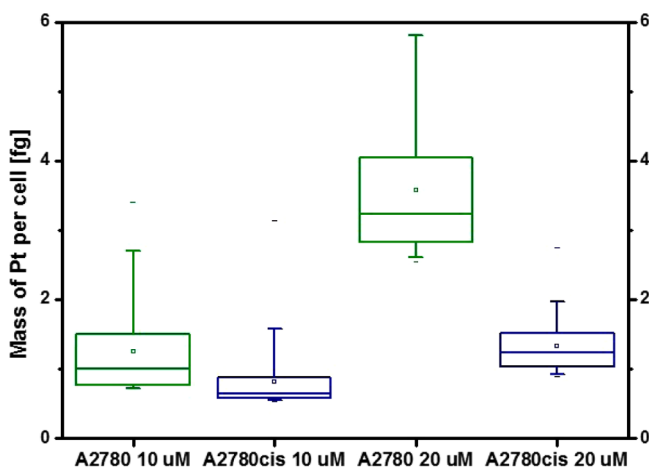
The calculated transport efficiency using the total consumption nebulizer used in this work turned out to be about 48%. The value was much higher than the transport efficiency determined for the cells (approximately between 5 and 25%, Figure 2B). This observation could be explained with the dimensions of cells in the  $\mu\text{m}^3$  range and their surface structure. The surface might have a relatively enhanced affinity to the transport and nebulizer capillaries, so that adsorption could be expected resulting in a certain loss of cells. Furthermore, the cell sizes are in the order of magnitude of the size of droplets produced during nebulization and a part of them might be captured at the walls of the nebulization chamber. In any case, using these calculations the average mass of Tb found in the cells turned out to be  $2.9 \pm 0.8\ \text{fg Tb per cell}$  ( $n = 81$  events). The methodology was validated by conducting the bulk analysis of the pooled cells using a previously established strategy<sup>12</sup> and a calibration curve of Tb using flow injection analysis with ICP-MS detection (FIA-ICP-MS). The results provided an overall Tb mass of  $2.6 \pm 0.1\ \text{fg Tb}$  ( $n = 3$  independent cultures) per cell, which is in good agreement with the results obtained for individual cells and that validates the proposed quantitative strategy.

**Quantitative Cellular Uptake of Cisplatin in Sensitive and Resistant Cell Models.** The next step was to evaluate the suitability of the system to address changes in the uptake of Pt-

drugs from cell cultures. For this aim, different cell cultures of A2780 and A2780cis from ovarian cancer (sensitive and resistant to cisplatin, respectively) were treated with concentrations of 10 and 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin. Initial experiments using PBS as washing medium resulted in increased background level in the exposed cells that ranged from 50000 cps (in the cells exposed to 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin) to almost 100000 cps (in those exposed to 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin). Although several washing steps were included, the Pt background contribution was always observed. This is probably due to a leaching effect of the cell trypsination solutions on the cisplatin that is adsorbed on the surface of the cell growing surface together with the Pt that could be weakly attached to the cell surface. Previous studies<sup>12</sup> have revealed through mass balance experiments the unspecific loss of cisplatin when exposed to cell cultures in plastic culture flasks. As alternative NaCl was tested, but did not improve the high Pt background levels. Moreover, as demonstrated in Figure S1C, a low percentage of cells did not maintain integrity during the transport and nebulization process. This surely contributed to the elevated background signal.

Apart from the latter observation, better results were obtained by using Cellstripper to collect cells from the adhering surface.<sup>29</sup> Figure 3 shows a significantly improved background signal between approximately 10000 and 30000 cps and the change on the events height upon increasing cisplatin concentration for the A2780 (Figure 3C,D) and the absence of events in the case of the control cells or the background (Figure 3A,B). Corresponding measurements of A2780cis cells are represented in Figure S3 (see Supporting Information).

The Pt concentration in the single cell events was calculated, as mentioned for Tb, using the equation given in (eq 2). The obtained results revealed an average Pt concentration in the cells exposed to 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin of  $1.26 \pm 0.63$  fg Pt ( $n = 202$  events) for the A2780 (sensitive) and  $0.82 \pm 0.42$  fg Pt ( $n = 260$  events) for the A2780cis (resistant). The same lines exposed to 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  showed values of  $3.58 \pm 1.05$  fg Pt ( $n = 134$  events) for the A2780 and  $1.33 \pm 0.36$  fg Pt ( $n = 368$  events) for the A2780cis. These results are collected in the box plot of Figure 4. This represents about  $4 \times 10^6$  Pt atoms and  $3 \times 10^6$  Pt atoms per cell, respectively, in the sensitive and resistant lines exposed to 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin which is in the order of previous studies in other cell models.<sup>19</sup> As can be



**Figure 4.** Box plots showing Pt content observed in A2780 and A2780cis cells treated with 10 and 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin, respectively.

observed, the fg of Pt per cell obtained when duplicating the cisplatin exposure concentration is more than double in the sensitive line but not in the resistant one, as observed in the bulk analysis.<sup>12</sup> Thus, the methodology here developed permits to directly discriminate among cell populations (sensitive or resistant to the drug) with no need to digest the sample and with relatively few cells ( $5 \times 10^5$ ). In addition, the data dispersion (rejecting events above mean  $+3\sigma$ ) turns out to be higher in the sensitive cells while the resistant type shows more homogeneous behavior supporting the possibility of a resistance mechanism associated with an inhibition on the drug influx. These observations and the application of the developed methodology might be, for instance, very useful for preclinical studies of novel metallodrugs. Such possibility can be further explored with this type of instrumental setup.

## CONCLUSIONS

The developed system based on the use of the EnyaMist nebulizer and a total consumption spray chamber turned out to be a useful approach for individual cell monitoring with ICP-MS detection. The optimized system yields cell introduction efficiencies of about 25%, which is higher than most of the setups published until now. Such data can be accurately obtained by the combined application of flow cytometry using fluorescent beads for cell counting. In addition, the optimization of the system with the complex of Tb-DTPA allows the quantitative estimation of the Tb-uptake in individual cells that can be directly compared to the results obtained in the bulk experiments. Furthermore, the proposed strategy permits to discriminate between cisplatin-sensitive and resistant cell lines obtaining also information on the differences among individual cells. Thus, this analytical tool seems to be a promising approach for many studies in individual cells.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.7b02746.

Figures S1–S3 (PDF).

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

\*E-mail: montesmaria@uniovi.es.

\*E-mail: bettmerjorg@uniovi.es.

### ORCID

J. Bettmer: 0000-0001-9923-9684

M. Montes-Bayón: 0000-0001-6114-9405

### Author Contributions

†These authors contributed equally to this work.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the grant of M. Corte referenced BP13114 from the regional government of Asturias, the regional funding through the Project GRUPIN14-010 and the funding from the Spanish MICINN (Spanish ministry for science and innovation) through the Project MINECO-16-CTQ2015-69583-R.

## REFERENCES

- (1) Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584.
- (2) Lippert, B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Wiley: New York, 2006.
- (3) Eastman, A. *Pharmacol. Ther.* **1987**, *34*, 155–166.
- (4) Sherman, S. E.; Gibson, D.; Wang, A. H.; Lippard, S. J. *Science* **1985**, *230*, 412–417.
- (5) Chaney, S. G.; Campbell, S. L.; Bassett, E.; Wu, Y. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *53*, 3–11.
- (6) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. *Oncogene* **2012**, *31*, 1869–1883.
- (7) Siddik, Z. H. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
- (8) Amable, L. *Pharmacol. Res.* **2016**, *106*, 27–36.
- (9) Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14298–14302.
- (10) Komatsu, M.; Sumizawa, T.; Mutoh, M.; Chen, Z. S.; Terada, K.; Furukawa, T.; Yang, X. L.; Gao, H.; Miura, N.; Sugiyama, T.; Akiyama, S. I. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1312–1316.
- (11) Zisowsky, J.; Koegel, S.; Leyers, S.; Devarakonda, K.; Kassack, M. U.; Osmak, M.; Jaehde, U. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 298–307.
- (12) Corte-Rodríguez, M.; Espina, M.; Sierra, L. M.; Blanco, E.; Ames, T.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 69–77.
- (13) Ghezzi, A. R.; Aceto, M.; Cassino, C.; Gabano, E.; Osella, D. J. *Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 73–78.
- (14) Meijer, C.; de Vries, E. G.; Dam, W. A.; Wilkinson, M. H.; Hollema, H.; Hoekstra, H. J.; Mudler, N. H. *Br. J. Cancer* **1997**, *76*, 290–298.
- (15) Drescher, D.; Giesen, C.; Traub, H.; Panne, U.; Kneipp, J.; Jakubowski, N. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9684–9688.
- (16) Hong-Hermesdorf, A.; Miethke, M.; Gallaher, S. D.; Kropat, J.; Dodani, S. C.; Chan, J.; Barupala, D.; Domaille, D. W.; Shirasaki, D. L.; Loo, J. A.; Weber, P. K.; Pett-Ridge, J.; Stemmler, T. L.; Chang, T. J.; Merchant, S. S. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1034–1042.
- (17) Li, F.; Amstrong, D. W.; Houk, R. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1407–1413.
- (18) Tanner, S. D.; Bandura, D. R.; Ornatsky, O.; Baranov, V. I.; Nitz, M.; Winnik, M. A. *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 2627–2641.
- (19) Chang, Q.; Ornatsky, O. I.; Koch, C. J.; Chaudary, N.; Marie-Egyptienne, D. T.; Hill, R. P.; Tanner, S. D.; Hedley, D. W. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 1202–1209.
- (20) Shigeta, K.; Koellensperger, G.; Rampler, E.; Traub, H.; Rottmann, L.; Panne, U.; Okino, A.; Jakubowski, N. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 637–645.
- (21) Shigeta, K.; Traub, H.; Panne, U.; Okino, A.; Rottmann, L.; Jakubowski, N. *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 646–656.
- (22) Verboket, P. E.; Borovinskaya, O.; Meyer, N.; Günther, D.; Dittrich, P. S. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6012–6018.
- (23) Wang, H.; Wang, B.; Wang, M.; Zheng, L.; Chen, H.; Chai, Z.; Zhao, Y.; Feng, W. *Analyst* **2015**, *140*, 523–531.
- (24) Tsang, C. N.; Ho, K. S.; Sun, H. Z.; Chan, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7355–7357.
- (25) Wang, H.; Wang, M.; Wang, B.; Zheng, L.; Chen, H.; Chai, Z.; Feng, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 1415–1423.
- (26) Wang, H.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4931–4938.
- (27) Zheng, L.-N.; Wang, M.; Zhao, L.-C.; Sun, B.-Y.; Wang, B.; Chen, H.-Q.; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F.; Feng, W.-Y. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2383–2391.
- (28) Zinn, N.; Krüger, R.; Leonhard, P.; Bettmer, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 537–543.
- (29) Amable, L.; Smith, S.; Stephan, C. *Application Note 013176\_01*; Perkin Elmer, 2017.
- (30) Pace, H. E.; Rogers, N. J.; Jarolimek, C.; Coleman, V. A.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9361–9369.
- (31) Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 1362–1371.
- (32) De Stasio, G.; Casalbore, P.; Pallini, R.; Gilbert, B.; Sanità, F.; Ciotti, M. T.; Rosi, G.; Festinesi, A.; Larocca, L. M.; Rinelli, A.; Perret, D.; Mogk, D. W.; Perfetti, P.; Mehta, M. P.; Mercanti, D. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4272–4277.
- (33) Degueldre, C.; Favarger, P. Y.; Wold, S. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555*, 263–268.





# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*

Nathaly González-Quiñónez<sup>1</sup>, Mario Corte-Rodríguez<sup>2</sup>, Roberto Álvarez-Fernández-García<sup>2</sup>, Beatriz Rioseras<sup>1</sup>, María Teresa López-García<sup>1</sup>, Gemma Fernández-García<sup>1</sup>, María Montes-Bayón<sup>2</sup>, Angel Manteca<sup>1</sup> & Paula Yagüe<sup>1</sup>

**Streptomyces** are important biotechnological bacteria with complex differentiation. Copper is a well-known positive regulator of differentiation and antibiotic production. However, the specific mechanisms buffering cytosolic copper and the biochemical pathways modulated by copper remain poorly understood. Here, we developed a new methodology to quantify cytosolic copper in single spores which allowed us to propose that cytosolic copper modulates asynchrony of germination. We also characterised the SCO2730/2731 copper chaperone/P-type ATPase export system. A *Streptomyces coelicolor* strain mutated in SCO2730/2731 shows an important delay in germination, growth and sporulation. Secondary metabolism is heavily enhanced in the mutant which is activating the production of some specific secondary metabolites during its whole developmental cycle, including germination, the exponential growth phase and the stationary stage. Forty per cent of the *S. coelicolor* secondary metabolite pathways, are activated in the mutant, including several predicted pathways never observed in the lab (cryptic pathways). Cytosolic copper is precisely regulated and has a pleiotropic effect in gene expression. The only way that we know to achieve the optimal concentration for secondary metabolism activation, is the mutagenesis of SCO2730/2731. The SCO2730/2731 genes are highly conserved. Their inactivation in industrial streptomycetes may contribute to enhance bioactive compound discovery and production.

*Streptomyces* are important biotechnological bacteria from which two thirds of the bioactive secondary metabolites used in clinic (mainly antibiotics, but also antitumorals, immunosuppressors, etc.) were discovered<sup>1,2</sup>. They have a complex developmental cycle that makes this bacterium a multicellular prokaryotic model including programmed cell death (PCD) and hyphae differentiation, which leads to aerial mycelium formation and sporulation<sup>3,4</sup>.

One of the less studied stages of *Streptomyces* development is spore germination. There are proteomic and transcriptomic works demonstrating that spore germination is highly regulated (reviewed in Bobek *et al.*<sup>5</sup>). However, the biomolecular mechanisms controlling germination remain poorly characterised<sup>6,7</sup>. There are some proteins known to be involved in *Streptomyces* spore germination: NepA, a structural cell wall protein involved in the maintenance of spore dormancy in *S. coelicolor*<sup>8</sup>; SsgA, a protein marking cell-wall sites where germination takes place<sup>9</sup>; resuscitation-promoting factors (Rpfs), cell wall hydrolases<sup>10</sup> controlling germination; OsdR, a *Streptomyces* orthologue to the *M. tuberculosis* DevR dormancy regulator, which was demonstrated to be functional in *Mycobacterium*<sup>11</sup>; and SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase that controls spore

<sup>1</sup>Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, IUOPA and ISPA, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, Spain. <sup>2</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry and ISPA, Universidad de Oviedo, 33006, Oviedo, Spain. Angel Manteca and Paula Yagüe contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M. (email: [mantecaangel@uniovi.es](mailto:mantecaangel@uniovi.es))

peptidoglycan crosslinking and conditions spore germination<sup>12</sup>. One of the most intriguing and poorly known aspects of spore germination is asynchrony i.e. some spores germinate early, while others take a long time to germinate or even do not germinate<sup>5</sup>. To the best of our knowledge, NepA is the only known protein that contributes to this asynchrony<sup>8</sup>.

Copper has been characterised as a positive regulator of *Streptomyces* differentiation (aerial mycelium, sporulation) and antibiotic production<sup>13,14</sup>. By contrast, vegetative growth was described to be unaffected by copper<sup>14</sup>. At high concentrations (over 750  $\mu\text{M}$ ), the positive effect in aerial mycelium development and sporulation becomes a negative effect (delay)<sup>15</sup>. The mechanisms controlling copper trafficking in *Streptomyces* remains poorly understood. Worrall and Vijgenboom<sup>16</sup> predicted the existence of two copper chaperone/P-type ATPases (CopZ/CopA) modulating copper export (SCO1045/1046, SCO2730/2731). They demonstrated that the expression of the genes encoding these transporters is regulated by CsoR, the master transcriptional repressor modulating copper effects in gene transcription<sup>16</sup>. This research group also demonstrated that the number of genes responding to copper stress is much higher than those regulated by CsoR. Dwarakanath *et al.*<sup>15</sup> proposed a model in *S. lividans* describing the copper effect modulating CsoR activity and expression of the SCO2730/2731 and SCO1045/1046 copper chaperones/transporters: under “normal” cytosolic copper concentration, *csoR* and SCO2730 (*copZ*) are expressed at a low level; when cytosolic copper concentration increases, CsoR and SCO2730 (CopZ) buffer copper at first, but as soon they become saturated, the CsoR repression of SCO2730/2731 and SCO1045/1046 is unblocked, increasing the expression of these copper secretion transporters that maintain copper homeostasis. Interestingly, CopZ-3079 (the *S. lividans* SCO2730 orthologue) was demonstrated *in vitro* to have a 5-fold higher affinity for Cu than CopZ-1317 (the SCO1045 orthologue)<sup>17</sup>, indicating that its physiological relevance in copper trafficking is higher at low copper concentrations, as proposed in the Dwarakanath *et al.* model<sup>15</sup>.

The copper import mechanisms in *Streptomyces* remain basically unknown. The existence of a membrane-bound periplasmic cupric reductase and a P-type ATPase importing Cu(I) has been postulated<sup>18</sup>.

In this work we focus on the characterisation of the SCO2730/SCO2731 copper export system. SCO2730 encodes for a putative copper chaperone<sup>15</sup>, highly conserved in the *Streptomyces* genus. SCO2731 encodes a conserved putative P-type ATPase, which was predicted to transport the copper carried out by the SCO2730 chaperone<sup>15</sup>. Our results contribute to the knowledge of complex pleiotropic effects of copper in *Streptomyces* development, including important effects regulating the asynchrony of germination, vegetative growth and activation of secondary metabolism, which were previously un-described.

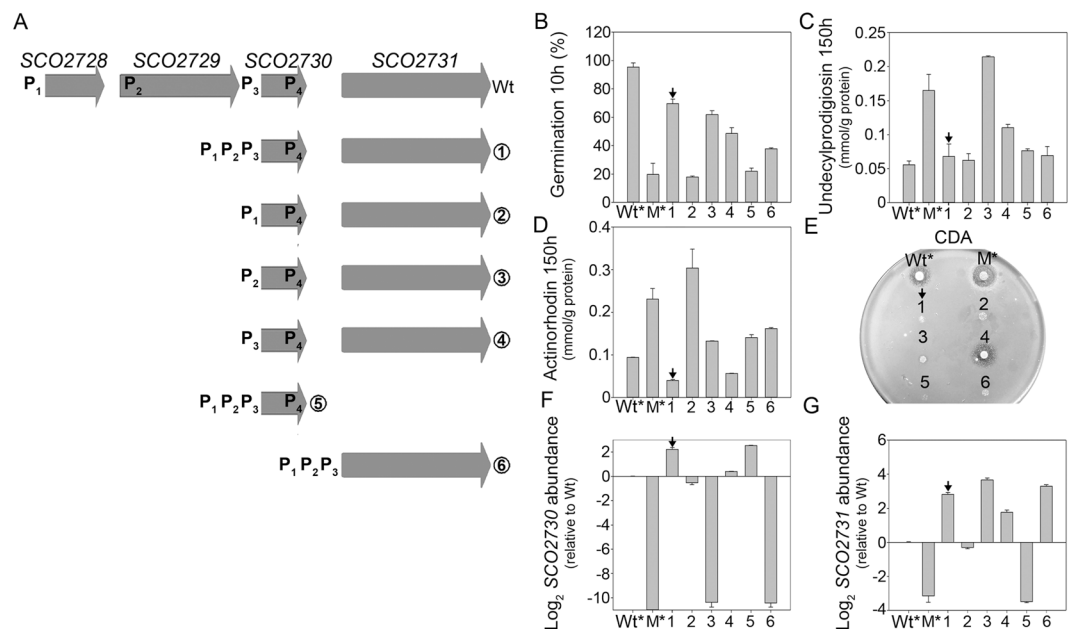
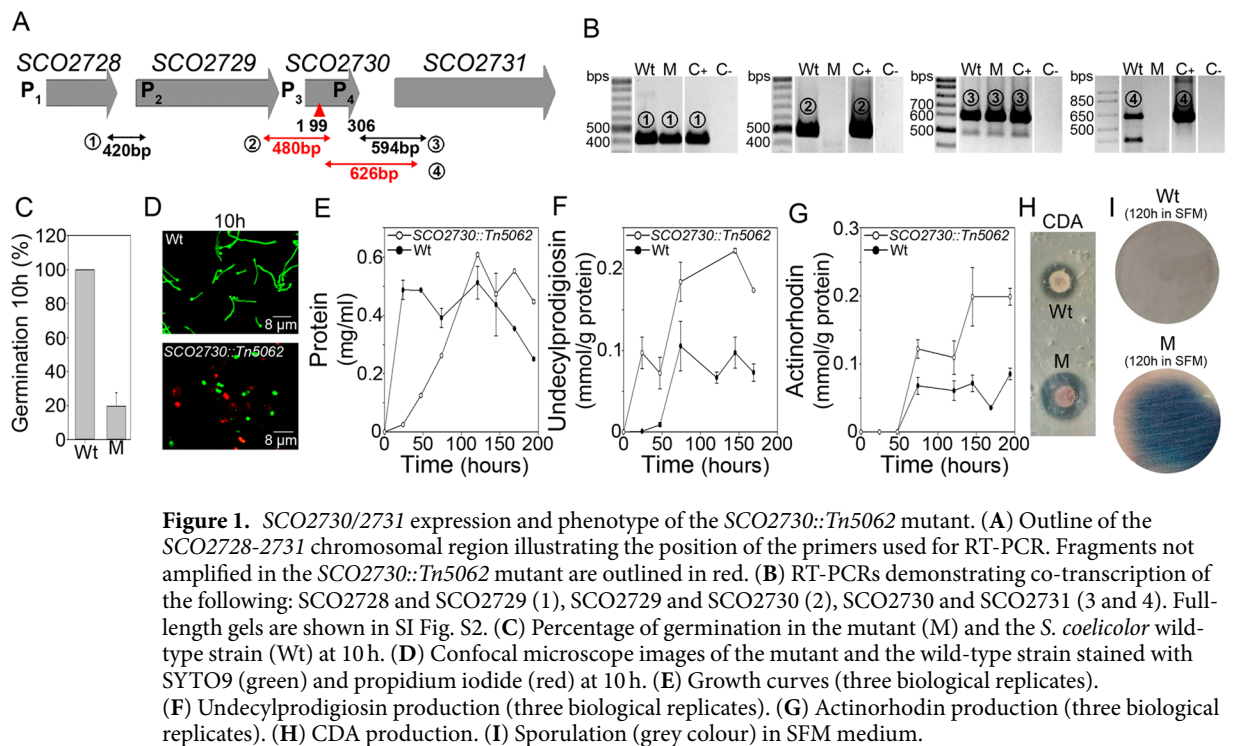
## Results

**SCO2730/2731 are highly conserved in *Streptomyces*.** SCO2730 and SCO2731 show an average amino acid similarity of 88.7% and 81% respectively, among *S. griseus*, *S. avermitillis*, *S. lividans*, *S. clavuligerus* and *S. venezuelae*. A comparison of SCO2730 orthologues reveal that the SCO2730 ORF probably starts at position 66 (ATG, Met) instead of the GTG (Val), annotated in the StrepDb database (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). The *S. clavuligerus* SCO2731 orthologue is not annotated in the StrepDb database, but is present downstream of SCLAV\_1906, the SCO2730 orthologue (data not shown). The SCO2730/2731 orthologues are together in all of the *Streptomyces* chromosomes analysed. However, the SCO2728–SCO2731 synteny (Fig. 1A) is only present in *S. coelicolor* and *S. lividans*.

**The SCO2730 mutation affects spore germination, antibiotic production and sporulation.** Cosmid C46.2.D06 was used to obtain the *S. coelicolor* SCO2730::Tn5062 mutant harbouring SCO2730 interrupted by Tn5062<sup>19</sup>. RT-PCR demonstrated that SCO2730 and SCO2731 are co-transcribed in the *S. coelicolor* wild-type strain (amplicons 3 and 4 in Fig. 1A,B). The SCO2731 expression was affected in the SCO2730::Tn5062 mutant (amplicon 4 in Fig. 1B). Surprisingly, amplicon 3 was present in the mutant (Fig. 1B), indicating the existence of a promoter (promoter 4 in Fig. 1A) between the two forward oligonucleotides used for RT-PCR 3 and 4. RT-PCR also revealed that SCO2730 was co-transcribed with SCO2729 (amplicon 2 in Fig. 1B) and that SCO2728 was co-transcribed with SCO2729, suggesting that all of these genes might be transcribed as a single operon.

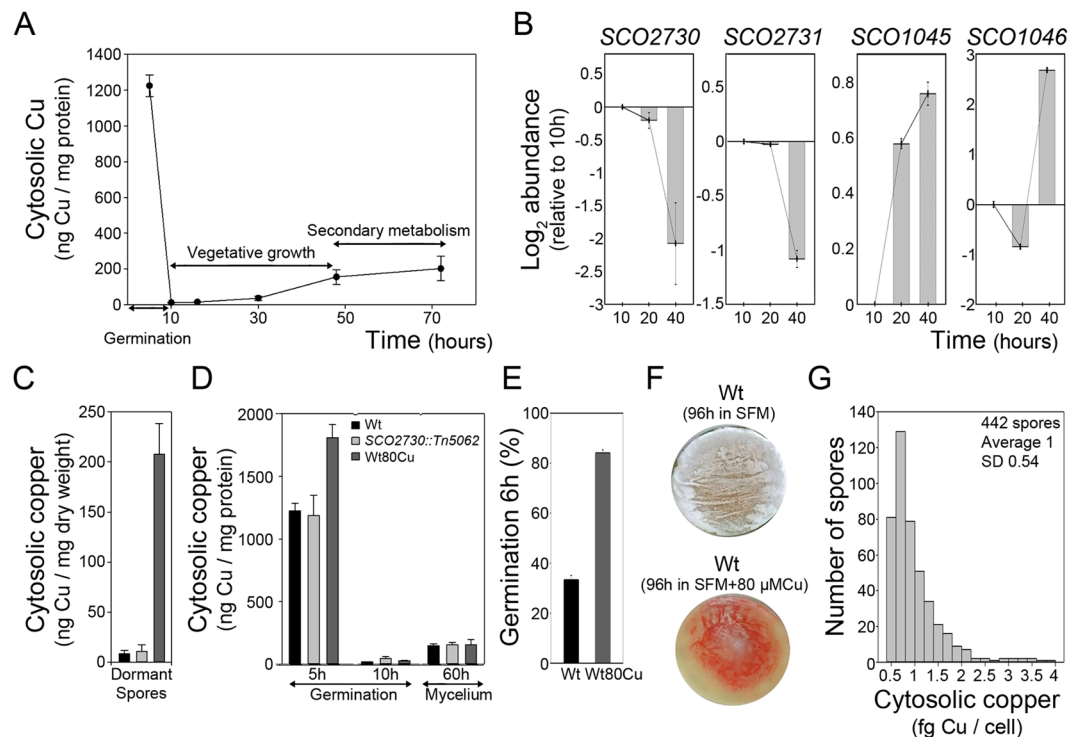
Spore germination was dramatically delayed in the SCO2730::Tn5062 mutant, compared to the wild-type strain (19.5% in the mutant vs. 100% in the wild-type strain at 10 h in sucrose-free R5A medium) (Fig. 1C). In solid sucrose-free R5A, the *S. coelicolor* wild-type strain reaches 100% of the germination at approximately 8 hours. However, as germination is highly delayed in the SCO2730::Tn5062 mutant, in this study we show germination at 10 hours. Moreover, there was a high rate of cell death during germination in the SCO2730::Tn5062 mutant (propidium iodide staining, red colour in Fig. 1D, 10 h). Growth was highly delayed in the mutant (Fig. 1E), while undecylprodigiosin and actinorhodin production was doubled (Fig. 1F,G). Calcium dependent antibiotic (CDA) production was slightly increased in the SCO2730::Tn5062 mutant (Fig. 1H). The SCO2730::Tn5062 mutant produced undecylprodigiosin starting with the first time point analysed (24 hours) and indicated that secondary metabolism is accelerated in this mutant (Fig. 1F). Sporulation was highly delayed and reduced in the SCO2730::Tn5062 mutant (Fig. 1I).

**The SCO2730::Tn5062 mutant phenotype in germination and antibiotic production depend on the alteration of SCO2730 and SCO2731 expression.** Based on the above results, we proceeded to identify the gene/s responsible for the phenotypes detected. We complemented the SCO2730::Tn5062 mutant with different combinations of the three promoters located upstream of SCO2730, combined with the SCO2730 and/or SCO2731 ORFs (strains 1–6 in Fig. 2A). The SCO2730::Tn5062 mutant strains harbouring the different promoters, together with SCO2730 and/or SCO2731, complemented part of the germination (measured at 10 hours) (Fig. 2B) or antibiotic production phenotypes (Fig. 2C–E). Undecylprodigiosin and actinorhodin production was measured at 150 hours, when the maximum production was reached, while CDA was measured in solid plates (see Methods). Only the SCO2730::Tn5062 mutant strain harbouring the three promoters



**Figure 2.** Complementation of the wild-type phenotype in the *SCO2730::Tn5062* mutant. **(A)** Outline of the *SCO2728-2731* chromosomal region and the six complementation constructions created. Promoter localisations are indicated. **(B)** Percentage of germination at 10 hours. **(C)** Undecylprodigiosin production at 150 hours. **(D)** Actinorhodin production at 150 hours. **(E)** CDA production. **(F)** *SCO2730* expression (qRT-PCR, two biological replicates). **(G)** *SCO2731* expression (qRT-PCR, two biological replicates). Wt: *S. coelicolor* wild-type strain. Wt\*: *S. coelicolor* harbouring pNG3. Arrows indicate complementation of the phenotype in the *SCO2730::Tn5062* mutant harbouring *SCO2730/2731* under the control of promoters P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>3</sub>. M\*: *SCO2730::Tn5062* mutant harbouring pNG3.

and the *SCO2730/2731* ORFs (strain 1) complemented the *SCO2730::Tn5062* mutant phenotype in germination (Fig. 2B) and antibiotic production (Fig. 2C–E). Undecylprodigiosin production was restored to the wild-type level. However, the wild-type phenotype was not fully restored. Germination was accelerated in complemented



**Figure 3.** Cytosolic copper and *SCO2730/2731* expression during *S. coelicolor* development. (A) Cytosolic copper during development in sucrose free R5A liquid cultures. Vegetative growth and secondary metabolism time windows are indicated. (B) *SCO2730/2731* and *SCO1045/1046* expression during development (qRT-PCRs, two biological replicates). (C) Cytosolic copper in dormant spores (three biological replicates). (D) Cytosolic copper in germinating spores (5- and 10 h) and mycelium (60 h) (three biological replicates). (E) Percentage of germination (three biological replicates) in Wt and Wt80Cu. (F) Macroscopic view of sporulation (grey colour) of the wild-type strain in SFM and SFM amended with 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$ . (G) Histogram showing the cytosolic copper in single spores of the wild type strains obtained in 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  copper amended SFM cultures. Wt, wild-type strain. Wt80Cu, spores of the wild-type strain obtained in 80  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  amended SFM cultures.

strain 1 compared to the *SCO2730::Tn5062* mutant (notice that germination values in Fig. 2B are out of the average  $\pm$  SD confidence intervals), but strain 1 germination did not reach the wild-type level (Fig. 2B); actinorhodin and CDA production was reduced in strain 1 compared to the mutant (actinorhodin production was out of the average  $\pm$  SD confidence intervals in Fig. 2D; CDA production was not detectable in strain 1 in Fig. 2E), but the production of both antibiotics was less than that of the wild-type strain.

The expression of the *SCO2730* and *SCO2731* genes was not restored in any of the complemented strains (Fig. 2E,G), indicating the existence of further unknown regulation beyond the three promoters considered in this work and explaining why the wild type phenotype was not restored in the complementation strains. The *SCO2730/2731* genes were overexpressed in the mutant strain harbouring the three promoters and the *SCO2730/2731* ORFs (strain 1 in Fig. 2F,G). Interestingly, all of the *SCO2730::Tn5062* complemented strains that overexpressed *SCO2731* (strains 1, 3, 4 and 6) (Fig. 2G) showed an increase in germination (Fig. 2B) compared to the *SCO2730::Tn5062* mutant.

***SCO2730* and *SCO2731* expression correlates with copper secretion during germination.** We analysed the cytosolic copper concentration and the expression of the genes encoding the two copper secretion systems described in *S. coelicolor* (*SCO2730/2731* and *SCO1045/1046*) during development<sup>15</sup> (germinated spores, 5–10 h; mycelium, 20–70 h) (Fig. 3A,B). Cytosolic copper (normalised against cytosolic protein) decreases quickly during germination (Fig. 3A). The maximum levels of *SCO2730/2731* expression were reached at 10 hours, coinciding with the lowest cytosolic copper concentration and the lowest expression of *SCO1045/1046* (Fig. 3B). This result suggests that *SCO2730/2731* chaperone/transport system is the main effector in copper secretion during germination.

Next, we analysed cytosolic copper in dormant spores, germinated spores (5 and 10 hours) (Fig. 3C) and mycelium (60 h) of the *SCO2730::Tn5062* mutant and the *S. coelicolor* wild-type strains (Fig. 3D). Dormant spores accumulate high amounts of trehalose and glycogen<sup>20</sup> that are not present in germinated spores or mycelia. This makes normalisation and comparison of cytosolic copper concentrations between dormant and germinated spores/mycelia, a challenge. Cytosolic copper was normalised in dormant spores against dry weight, while in germinated spores and mycelium, it was normalised against cytosolic protein (see Methods). Consequently, copper abundances can be compared between dormant spores (Fig. 3C) or between germinated spores and the mycelium (Fig. 3D), but not between dormant spores and germinated spores/mycelium. In the case of the wild-type strain

we analysed spores obtained in SFM solid cultures (Wt) and spores obtained in SFM solid cultures amended with 80  $\mu\text{M}$  Cu (Wt80Cu). Cytosolic copper concentration was similar in the *SCO2730::Tn5062* mutant and in the Wt dormant spores ( $11 \pm 6$  and  $8.5 \pm 3$  ng Cu/mg dry weight respectively) but it was much higher in the Wt80Cu spores ( $208 \pm 30$ , 24-fold higher than in the wild-type strain) (Fig. 3C). Cytosolic copper dropped dramatically during germination in copper unmodified sucrose-free R5A cultures of the wild-type strain inoculated with Wt or Wt80Cu spores (66-fold and 70-fold drop respectively from 5 to 10 hours) (Fig. 3D), but the reduction in cytosolic copper was lesser in the cultures inoculated with *SCO2730::Tn5062* mutant spores (26-fold drop from 5 to 10 hours) (Fig. 3D). Cytosolic copper was higher at 10 hours in the *SCO2730::Tn5062* mutant ( $45.7 \pm 5.4$  ng Cu/mg protein) compared to the wild-type strain (cultures using Wt or Wt80Cu spores) ( $18.6 \pm 1.6$  and  $24.2 \pm 2.4$  ng Cu/mg protein respectively) (Fig. 3D). By contrast, cytosolic copper in the mycelium of the *SCO2730::Tn5062* mutant ( $153 \pm 20$  ng Cu/mg protein) and the wild-type strains ( $145.7 \pm 18$  and  $155.4 \pm 41$  ng Cu/mg protein in Wt and Wt80Cu spores respectively) are comparable (Fig. 3D).

Interestingly, germination was highly accelerated in the Wt80Cu spores compared to the Wt spores (both growing in copper unmodified cultures) (Fig. 3E, 6 hours culture), while growth and antibiotic production were similar (data not shown). Germination starts at comparable time points in the Wt and the Wt80Cu spores (data not shown), but it is much more synchronous in the Wt80Cu than in the Wt, which lead to an acceleration in the time point at which 100% germination is reached (Fig. 3E). Sporulation in the SFM cultures adjusted with 80  $\mu\text{M}$  Cu was delayed compared to the SFM unmodified cultures (Fig. 3F), confirming the effect of copper modulation of sporulation reported before<sup>15</sup>.

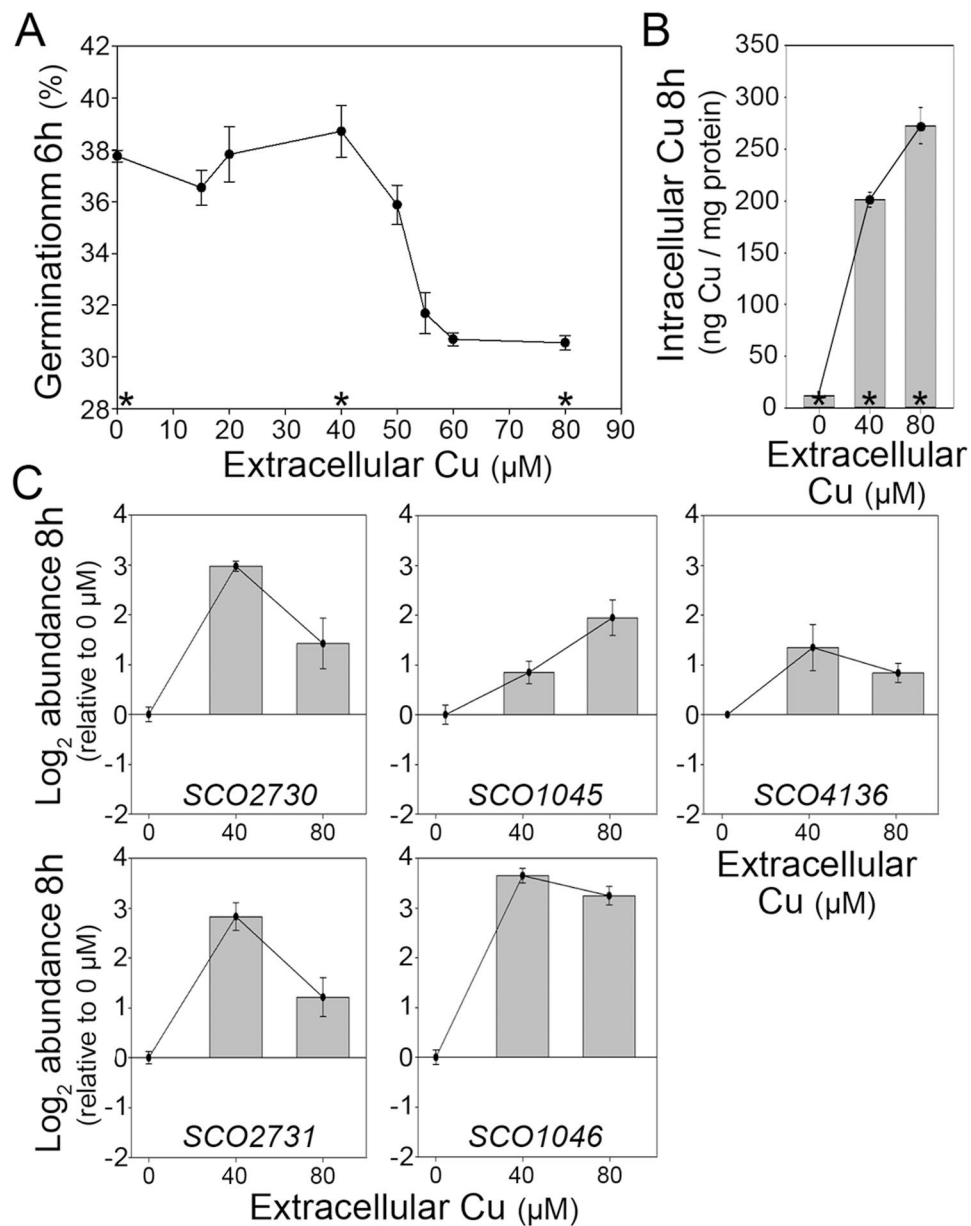
**Cytosolic copper quantification in single spores.** To analyse cytosolic copper in individual spores, we adapted the method that we developed for the analysis of single eukaryotic cells<sup>21</sup> to the study of *Streptomyces* single spores. Cytosolic copper in the Wt and in the *SCO2730::Tn5062* mutant single spores was below the sensitivity of the analysis (see Methods). However, we were able to quantify cytosolic copper in the Wt80Cu spores (Fig. 3G). There was a high variability in the cytosolic copper with a minimum of 0.51 fg Cu per spore and a maximum of 3.83 fg Cu per spore.

**Cytosolic copper modulates spore germination and *SCO2730/2731*–*SCO1045/1046* gene expression.** The above results suggest an effect of *SCO2730* and *SCO2731* in the modulation of cytosolic copper concentration and germination (Figs 1 and 3). We next analysed the effect of copper on germination. Germination was delayed in sucrose-free R5A liquid cultures treated with copper concentrations over 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 4A). Interestingly, cytosolic copper was not proportional to the copper added to the medium. An increase of 2-fold in the extracellular copper (from 40 to 80  $\mu\text{M}$ ) correlated with a 1.3-fold increase of cytosolic copper (from  $201.3 \pm 7.4$  to  $272.5 \pm 38.8$  ng/mg protein) (Fig. 4B).

In order to further study the biomolecular mechanism buffering cytosolic copper during germination, we analysed the expression of the two copper secretion systems reported in *Streptomyces* (*SCO2730/2731*, *SCO1045/1046*)<sup>15</sup> during germination in copper modified (by adding 0-, 40- or 80  $\mu\text{M}$  extracellular copper) sucrose-free R5A cultures. The *SCO2730/2731* maximum expression (compared to the Wt germinating spores at the 0  $\mu\text{M}$  copper modified medium) was reached at 40  $\mu\text{M}$  extracellular copper, while the maximum expression of the *SCO1045/1046* genes was reached at 80  $\mu\text{M}$  copper (Fig. 4C). We further analysed the expression of *csor* (*SCO4136*), the master transcriptional repressor modulating copper effects in gene transcription<sup>15</sup>. *CsoR* expression was equally activated during germination at high cytosolic copper concentration, which was reached in the 40 and 80  $\mu\text{M}$  copper modified sucrose-free R5A cultures (Fig. 4C). As reported before<sup>15</sup>, copper binds to *CsoR* blocking its interaction with DNA and activating the expression of genes repressed by *CsoR*, including the *csor* gene.

**Comparison of the transcriptomes of *SCO2730::Tn5062* and *S. coelicolor* wild-type Cu-amended/non-amended spores, during germination.** In order to investigate the molecular mechanisms controlling the phenotypes observed during germination of the *SCO2730::Tn5062* mutant and the Wt80Cu spores, we compared their transcriptomes during germination (10 hours) in sucrose-free R5A liquid medium. Data were normalised against the Wt spores ( $\log_2$  *SCO2730::Tn5062* or Wt80Cu/Wt) (SI Table S1). 1790 transcripts showed significant variations (q-value of less than 0.05) in the *SCO2730::Tn5062* mutant, 738 in the Wt80Cu and 754 in both, *SCO2730::Tn5062* and Wt80Cu (Fig. 5) (SI Table S1).

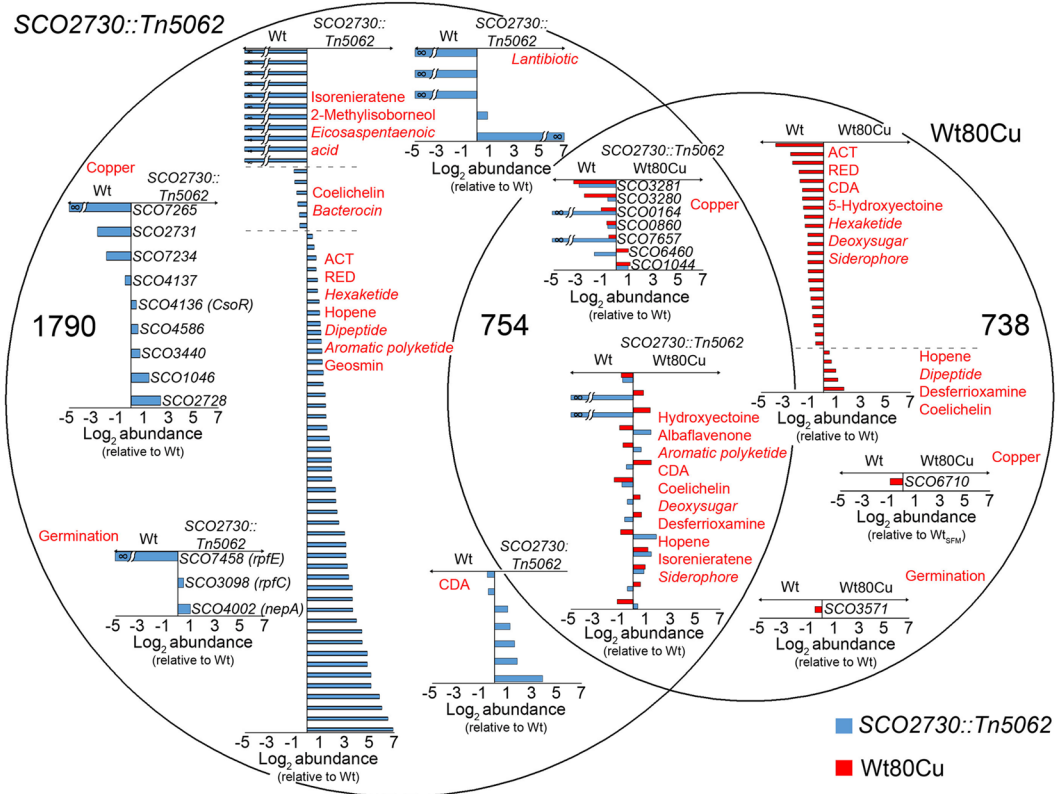
The 1790 genes differentially expressed in the *SCO2730::Tn5062* mutant compared to the Wt strain, included key secondary metabolism genes, spore germination genes and genes encoding for copper related proteins (copper transporters, proteins using copper as cofactor, proteins whose genes are known to be regulated by copper) (Fig. 5) (Table 1). Most of the genes involved in secondary metabolism were up-regulated in the *SCO2730::Tn5062* mutant during germination (see details in the next paragraph). The expression of *SCO1046* (*CopA*)<sup>15</sup>, *SCO4136* (*CsoR*)<sup>15</sup>, *SCO4586* (ABC transporter involved in multi-copper enzyme maturation, conserved domain database accession COG1277) and *SCO3440* (oxidase predicted to bind to copper)<sup>16</sup> were up-regulated in the mutant. The expression of *SCO4137* and *SCO7265* (two genes predicted to be under the control of *CsoR*)<sup>15</sup>, *SCO7234* (cytochrome c oxidase predicted to use copper as cofactor, PROSITE accession PS00077) and *SCO2731* (cation transporter)<sup>15</sup>, was down-regulated in the mutant. As mentioned above, *SCO2731* was expressed in the *SCO2730::Tn5062* mutant (amplicon 3 in Fig. 1), from a promoter located inside the *SCO2730* ORF, but downstream of the *Tn5062* insertion. However, the expression from this promoter is 6.5-fold less than the wild-type strain (Table 1). Interestingly, genes *SCO2728* (putative zinc-responsive transcriptional regulator, conserved domain database accession PRK09514) and *SCO2729* (putative acetyltransferase), both transcribed together with *SCO2730/3731* (Fig. 1A), are 5-fold overexpressed in the mutant (Table 1). Three genes related to spore germination are differentially expressed in the mutant and the wild-type strain: *nepA* (*SCO4002*)<sup>8</sup>, 2-fold up-regulated;



**Figure 4.** Extracellular copper effect in germination, cytosolic copper levels and the expression of copper related genes. **(A)** Variation of the percentage of germination with the extracellular copper concentration in sucrose free R5A solid cultures (three biological replicates). **(B)** Variation of intracellular copper during germination (6 h) depending on the extracellular copper concentration in sucrose free R5A liquid cultures (three biological replicates). **(C)** *SCO2730/2731*, *SCO1045/1046* and *SCO4136* expression during germination (8 h) in 40 and 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  amended cultures (qRT-PCRs, two biological replicates, sucrose free R5A liquid medium).

*rpfc* (*SCO3098*)<sup>10</sup>, 1.4-fold up-regulated; and *rpfe* (*SCO7458*), encoding one of the key peptidoglycan lytic enzymes activated during germination<sup>10</sup>, whose transcript was absent in the mutant, and perhaps contributing to the delay in germination observed in the mutant (Table 1).

The 738 genes differentially expressed during the germination of the Wt80Cu spores compared to Wt, include key genes involved in secondary metabolism, germination and genes encoding for copper related proteins (Fig. 5) (Table 2). The expression of most of the genes involved in secondary metabolite biosynthesis was down-regulated in the cultures inoculated with Wt80Cu spores (genes involved in actinorhodin, undecylprodigiosin, CDA, 5-hydroxyectoine, hexaketide, deoxysugar and siderophore biosynthesis). Other genes down-regulated in the Wt80Cu cultures were: *SCO6710*, a putative glycosyl hydrolase supposedly repressed by CsoR<sup>15</sup>; and *SCO3571*, a cyclic AMP receptor protein homologue whose mutation was reported to diminish germination<sup>22</sup>. There were no significant differences in *csoR* between Wt80Cu and the Wt, indicating that inactivation of the CsoR repressor activity triggered by copper binding previously described<sup>15</sup> did not occur at the high cytosolic copper levels



**Figure 5.** Transcriptomic analysis of the *SCO2730::Tn5062* mutant spores, the *S. coelicolor* wild-type strain spores obtained in 80  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  amended SFM cultures (Wt80Cu) and in SFM cultures (Wt) during germination (10h) in sucrose free R5A medium. The Venn diagram shows transcripts related to copper homeostasis/metabolism/regulation, germination and secondary metabolism with significant variations ( $q$ -value of less than 0.05) in the *SCO2730::Tn5062* mutant (1790 transcripts), the Wt80Cu strain (738 transcripts), or both (754 transcripts), compared to the Wt. Abundance values (average from two biological replicates) are shown as  $\log_2$  (*SCO2730::Tn5062* or Wt80Cu/Wt). Blue bars: transcripts with significant variations in the *SCO2730::Tn5062* mutant compared to Wt. Red bars, transcripts with significant variations in the Wt80Cu compared to Wt. Broken bars indicate transcripts not detected in the *SCO2730::Tn5062* mutant or the Wt strain. ACT, actinorhodin; RED undecylprodigiosin; CDA, calcium dependent antibiotic. Secondary metabolism cryptic pathways are indicated in italic letters.

present in the Wt80Cu dormant spores (Fig. 3C). Consequently, there remains an unknown CsoR independent mechanism controlling the fast spore germination observed in this strain (Fig. 3E). Interestingly, neither of the two copper chaperones/transporters described in *Streptomyces* (*SCO1045/1046* and *SCO2730/2731*)<sup>15</sup> showed significant variations in the Wt80Cu cultures compared to the Wt cultures (Table 2), indicating that the Wt expression levels present in the Wt80Cu spores are high enough to reduce cytosolic copper during germination to a concentration comparable to that reached in the Wt spores ( $26 \pm 2.4$  ng Cu/mg protein, only 1.4-fold higher than the Wt spores at 10-hours) (Fig. 3D). The expression of genes involved in hopene, desferrioxamine, coelicheilin and dipeptide biosynthesis, was slightly up-regulated in the Wt80Cu cultures.

The 754 genes differentially expressed during germination in both the *SCO2730::Tn5062* mutant and the cultures inoculated with the Wt80Cu spores, compared with the wild-type strain, include secondary metabolism genes, and genes encoding for copper related proteins (Fig. 5) (Table 3). Most of these genes were down-regulated in the cultures inoculated with Wt80Cu spores. Variation in the expression of secondary metabolism genes was discrete (all the abundances were below the 2-fold change,  $\log_2$  abundance within the  $\pm 1$  interval). The most important variation, was found in the genes encoding proteins related to copper: genes predicted to be modulated by CsoR (*SCO1044*, *SCO3280*)<sup>15</sup>; putative cation-transporting ATPases (*SCO0164*, *SCO0860*, *SCO6460*)<sup>15</sup>; *SCO3281*, a cytosolic copper storage protein<sup>23</sup>; and *SCO7657*, a putative secreted protein predicted to bind copper<sup>16</sup>. Interestingly, *SCO0164* and *SCO7657* were not expressed in the *SCO2730::Tn5062* mutant.

**Secondary metabolite transcripts with significant variations ( $q$ -value < 0.05) in the *SCO2730::Tn5062* mutant compared to wild-type strain (Wt).** We next focus on the analysis of the secondary metabolite genes up-regulated in the *SCO2730::Tn5062* mutant during germination (10 hours in sucrose-free R5A liquid cultures). The *S. coelicolor* genome encodes at least 30 predicted secondary metabolite clusters<sup>24</sup>. The expression of 60 genes belonging to 12 secondary metabolite clusters (40% of the total predicted)<sup>24</sup> is up-regulated in the *SCO2730::Tn5062* mutant compared to the wild-type strain (Fig. 6) (Tables 1–3,

Function	Sco No.	Description	Abundance	
			Log <sub>2</sub> (SCO2730::Tn5062 / Wt)	SCO2730::Tn5062/ Wt
Copper related genes	SCO1046	Copper transporter	1.4	2.7
	SCO2731	CopA cation transporter	-2.7	0.1
	SCO3440	Oxidase predicted to bind to copper	0.7	1.6
	SCO4137	Putatively repressed by CsoR	-0.5	0.7
	SCO4136	CsoR	0.4	1.3
	SCO4586	ABC transporter involved in multi-copper enzyme maturation	0.5	1.4
	SCO7234	Cytochrome c oxidase	-2	0.2
	SCO7265	Putatively repressed by CsoR	<sup>a</sup>	0
Genes upstream SCO2730	SCO2728	Putative zinc-responsive transcriptional regulator	2.4	5.1
	SCO2729	Putative acetyltransferase	2.2	4.7
Germination	SCO4002	<i>NepA</i>	1	2
	SCO3098	<i>RpfC</i>	0.4	1.4
	SCO7458	<i>RpfE</i>	<sup>a</sup>	0
Secondary metabolism	SCO0124	Eicosapentaenoic acid biosynthesis	<sup>a</sup>	0
	SCO0126		<sup>a</sup>	0
	SCO0127		<sup>a</sup>	0
	SCO0129		<sup>a</sup>	0
	SCO0186	Isorenieratene biosynthesis	<sup>a</sup>	0
	SCO0187		<sup>a</sup>	0
	SCO0188		<sup>a</sup>	0
	SCO0189		<sup>a</sup>	0
	SCO0190		<sup>a</sup>	0
	SCO0267	Lantibiotic biosynthesis	<sup>a</sup>	0
	SCO0269		<sup>a</sup>	0
	SCO0270		<sup>a</sup>	0
	SCO0490	Coelichelin biosynthesis	-0.6	0.7
	SCO0491		-0.6	0.7
	SCO0496		-1	0.5
	SCO0497		-1	0.5
	SCO0499		-0.8	0.6
	SCO0756	Bacteriocin biosynthesis	-0.8	0.6
	SCO1271	Aromatic polyketide biosynthesis	0.8	1.7
	SCO1909	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	1.1	2.2
	SCO3216	CDA biosynthesis	-0.6	0.6
	SCO3217		1	2
	SCO3220		-0.5	0.7
	SCO3222		1.8	3.5
	SCO3236		3.8	14.4
	SCO3247		1.2	2.4
	SCO3248		1.6	3
	SCO3800	Acyl-CoA dehydrogenase	2	3.8
	SCO5071	ACT biosynthesis	3.7	12.6
	SCO5072		3	8
	SCO5073		1.9	3.9
	SCO5074		2.6	5.9
SCO5075	1.3		2.5	
SCO5076	0.4		1.4	
SCO5078	1.5		2.8	
SCO5080	2.3		4.9	
SCO5082	1.5		2.8	

Continued



Function	Sco No.	Description	Abundance		
			Log <sub>2</sub> (SCO2730::Tn5062 / Wt)	SCO2730::Tn5062/ Wt	
	SCO5083	ACT biosynthesis	4.4	21.5	
	SCO5084		3.9	15.7	
	SCO5085		3.6	12.5	
	SCO5086		3.2	9.4	
	SCO5087		2	4	
	SCO5088		1.8	3.5	
	SCO5090		2.3	4.9	
	SCO5091		1.1	2.2	
	SCO5092		1.2	2.3	
	SCO5877		Prodigiosin biosynthesis	0.9	1.8
	SCO5879	1.3		2.5	
	SCO5890	0.6		1.5	
	SCO5895	1.5		2.9	
	SCO6073	Geosmin biosynthesis	1.9	3.7	
	SCO6273	Hexaketide biosynthesis	3.7	12.5	
	SCO6274		3.1	8.7	
	SCO6275		4.8	28.6	
	SCO6276		6	64.1	
	SCO6277		1.6	3	
	SCO6278		5.1	35.3	
	SCO6279		5.8	55.8	
	SCO6280		2.4	5.4	
	SCO6281		4.8	28.7	
	SCO6282		6.9	118.9	
	SCO6283		6.5	90.4	
	SCO6284		5.1	34.9	
	SCO6286		3.4	10.2	
	SCO6287		4.4	21.1	
	SCO6288		3.1	8.7	
	SCO6430		Dipeptide biosynthesis	1.2	2.3
	SCO6431			1	2
	SCO6432	0.9		1.8	
	SCO6436	0.8		1.7	
	SCO6767	Hopene biosynthesis	1	2	
	SCO6927	Lantibiotic biosynthesis	0.8	1.8	
	SCO6932		<sup>b</sup>	∞	
	SCO7700	2-Methylisoborneol biosynthesis	<sup>b</sup>	∞	
	SCO7701		<sup>b</sup>	∞	

**Table 1.** Abundance values of transcripts showing significant variations (q-value of less than 0.05) between the SCO2730::Tn5062 mutant and the *S. coelicolor* M145 wild-type strain during germination (10 hours) in sucrose free R5A cultures. The abundance of the transcripts described in results is indicated; see SI Table S1 for the full transcriptome results. <sup>a</sup>Transcripts not detected in the SCO2730::Tn5062 mutant. <sup>b</sup>Transcripts not detected in the Wt strain.

SI Table S1): six well-known secondary metabolite clusters (undecylprodigiosin, hopene, geosmin, actinorhodin, 5-hydroxyectoine, CDA); four predicted cryptic pathways (lantibiotic, hexaketide, dipeptide, aromatic polyketide)<sup>24</sup>. SCO3800 a gene putatively involved in secondary metabolism biosynthesis (*S. coelicolor* KEGG pathway map 01110) and SCO1909, a gene putatively involved in antibiotic biosynthesis (pfam03992), also were overexpressed in the mutant.

## Discussion

As introduced above, copper has pleiotropic effects in *Streptomyces* development and regulates differentiation (aerial mycelium and sporulation) and antibiotic production<sup>13,14</sup>. In this work we discovered additional copper effects during the vegetative stage, in germination (Fig. 1C) and growth (Fig. 1E).

Based on our results, we propose the model outlined in Fig. 7, which correlates spore germination, vegetative growth, secondary metabolism and sporulation with cytosolic copper and the expression of key genes regulating these processes. In the wild-type strain (outlined in Fig. 7A), germination triggers cytosolic copper secretion

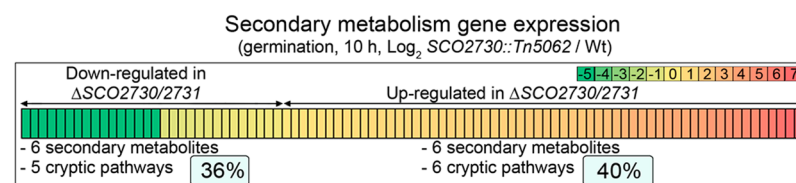
Function	Sco No.	Description	Abundance	
			Log <sub>2</sub> (Wt80Cu / Wt)	Wt80Cu/Wt
Copper related genes	SCO2730	CopZ copper chaperone	n.s.	n.s.
	SCO2731	CopA cation transporter	n.s.	n.s.
	SCO1045	CopZ copper chaperone	n.s.	n.s.
	SCO1046	CopA cation transporter	n.s.	n.s.
	SCO6710	Glycosyl hydrolase putatively repressed by CsoR	-1	0.5
	SCO4136	CsoR	n.s.	n.s.
Germination	SCO3571	Cyclic AMP receptor protein homologue	-0.6	0.7
Secondary metabolism	SCO0381	Deoxysugar synthase	-1.5	0.3
	SCO0382		-1.3	0.1
	SCO0384		-1.9	0.2
	SCO0385		-1.3	0.4
	SCO0386		-0.9	0.5
	SCO0387		-1.7	0.3
	SCO0388		-1	0.5
	SCO0389		-1.1	0.5
	SCO0395		-2.5	0.2
	SCO0397		-1.6	0.3
	SCO0399		-1.5	0.4
	SCO0493	Coelichelin biosynthesis	0.5	1.4
	SCO1864	5-Hydroxyectoine biosynthesis	-0.8	0.6
	SCO1865		-1.2	0.4
	SCO1866		-1.2	0.4
	SCO2783	Desferrioxamine biosynthesis	1	2
	SCO2785		0.6	1.6
	SCO3235	CDA biosynthesis	-0.6	0.6
	SCO3774	Beta-lactamase related protein	-0.8	0.6
	SCO5800	Siderophore biosynthesis	-1.3	0.4
	SCO5881	Prodigiosin biosynthesis	-0.7	0.6
	SCO6275	Hexaketide biosynthesis	-0.9	0.5
	SCO6277		-1.3	0.4
	SCO6279		-1.7	0.3
	SCO6280		-2	0.2
	SCO6282		-3.8	0.07
SCO6283	-2.6		0.2	
SCO6437	Dipeptide biosynthesis	1.1	2.2	
SCO6770	Hopene biosynthesis	1.6	3.1	

**Table 2.** Abundance values of transcripts in the Wt80Cu and the *S. coelicolor* M145 wild-type strains during germination (10 hours) in sucrose free R5A cultures. The abundance of the transcripts described in results is indicated; see SI Table S1 for the full transcriptome results. N.s. Non-significant variation.

thanks to the activation of the SCO2730/2731 copper chaperone/P-type ATPase (Fig. 3A,B). Cytosolic copper reaches its minimum concentration during germination ( $11.8 \pm 0.3$  ng Cu/mg protein) which suggests that the SCO2730/2731 secretion system has a higher affinity for copper than does the SCO1045/1046 chaperone/transporter that is activated at the higher cytosolic copper levels reached in the mycelium (Fig. 3A,B). This result agrees with the results of Chaplin *et al.*<sup>17</sup>, who demonstrated, *in vitro*, the higher copper affinity of SCO2730/2731 compared to SCO1045/1046. We postulate that the SCO1045/1046 system is also active during the first stages of copper secretion accompanying germination and until the cytosolic copper concentration reaches the low levels at which the SCO2730/2731 transporter system is activated (Fig. 3B). The low levels of cytosolic copper trigger the expression of *rpfE*, which is a key peptidoglycan lytic enzyme activated during germination<sup>10</sup> (Fig. 5) (Table 1). We postulate that the asynchrony of spore germination is a consequence, at least in part, of the differences in cytosolic copper concentration in single dormant spores (Fig. 3G). The spores with the highest levels of cytosolic copper germinate more slowly than the spores with lower cytosolic copper. Cytosolic copper in wild-type single spores was below the sensitivity of the assay used in this work. However, if we assume that the variability we observed in the Wt80Cu spores (Fig. 3G) is similar to that of the Wt spores and consider an average of cytosolic copper of 1225 ng Cu/mg protein (Fig. 3D), we can expect a range of cytosolic copper in the Wt spores between 625 and 4691 ng Cu/mg of protein (Fig. 7A). During the vegetative stage of the wild-type strain, the expression of SCO2730/2731 genes decreases, while the expression of the SCO1045/1046 genes increases (Fig. 3B) and cytosolic copper increases (Fig. 3A). Secondary metabolism is activated (Fig. 1F,G) at cytosolic

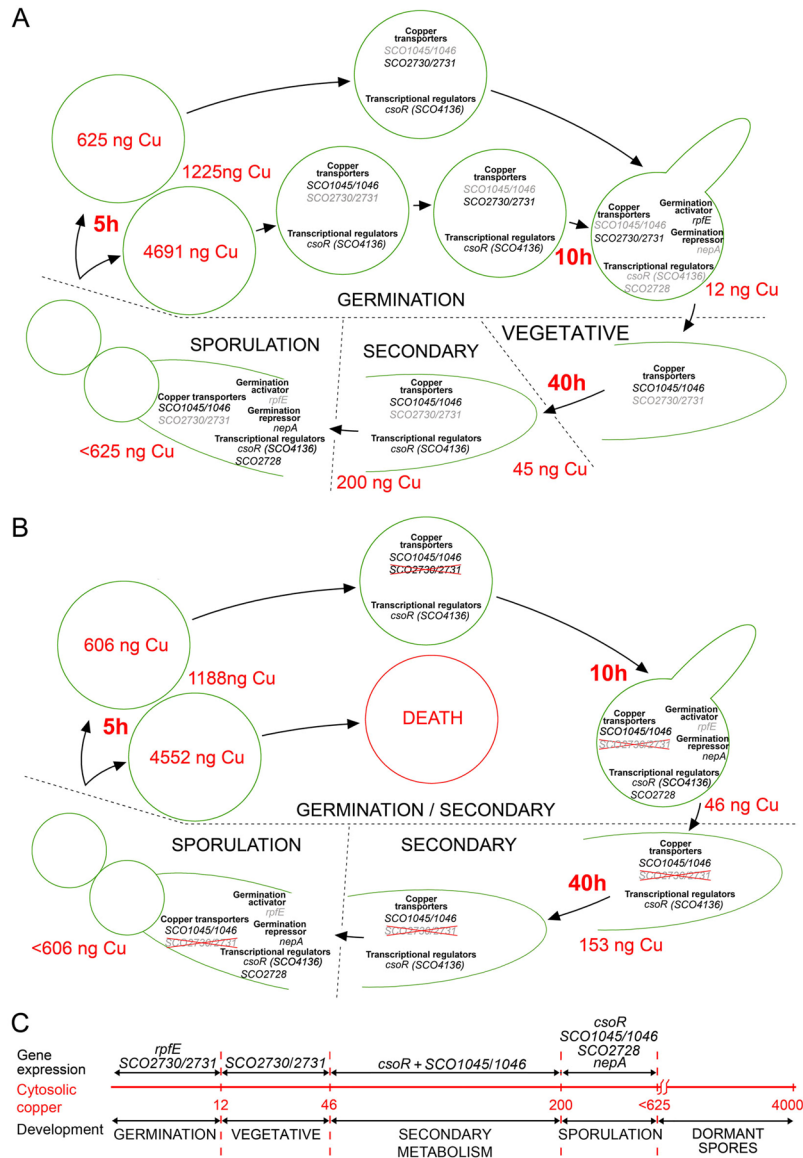
Function	Sco No.	Description	Abundance			
			Log <sub>2</sub> (SCO2730::Tn5062 /Wt)	Log <sub>2</sub> (Wt80Cu /Wt)	SCO2730::Tn5062 /Wt	Wt80Cu /Wt
Copper related genes	SCO0164	Putative cation-transporting ATPase	<sup>a</sup>	-1.2	0	0.4
	SCO0860	Putative cation-transporting ATPase	-0.7	-0.7	0.6	0.6
	SCO1044	Putatively repressed by CsoR	1	1.1	2	2.2
	SCO3280	Putatively repressed by CsoR	-0.7	-2.5	0.6	0.2
	SCO3281	Cytosolic copper storage protein	-2.9	-3.3	0.1	0.09
	SCO6460	Putative cation-transporting ATPase	-1.7	1	0.3	2
	SCO7657	Putative secreted protein predicted to bind copper	<sup>a</sup>	-0.6	0	0.7
Secondary metabolism	SCO0185	Isorenieratene biosynthesis	<sup>a</sup>	1.4	0	2.6
	SCO0191		<sup>a</sup>	0.8	0	1.8
	SCO0396	Deoxysugar synthase	-0.9	-1.5	0.5	0.3
	SCO0494	Coelichelin biosynthesis	-0.5	0.5	0.7	1.4
	SCO0495	Coelichelin biosynthesis	-0.7	0.6	0.6	1.6
	SCO1265	Aromatic polyketide biosynthesis	0.8	0.9	1.8	1.9
	SCO1867	5-Hydroxyectoine biosynthesis	0.4	-1.3	1.3	0.4
	SCO2782	Desferrioxamine biosynthesis	-0.6	1.4	0.7	2.7
	SCO3218	CDA biosynthesis	1.8	-1	3.6	0.5
	SCO3221	CDA biosynthesis	1.4	1.2	2.7	2.3
	SCO5223	Albaflavone biosynthesis	-0.5	0.6	0.7	1.5
	SCO5799	Siderophore biosynthesis	-0.9	-1	0.6	0.5
	SCO6766	Hopene biosynthesis	0.6	-0.8	1.5	0.6
	SCO6768		1.4	-1.1	2.6	0.5

**Table 3.** Abundance values of transcripts showing significant variation (q-value of less than 0.05) in the SCO2730::Tn5062 mutant and the Wt80Cu strain compared to the *S. coelicolor* M145 wild-type strain during germination (10 hours) in sucrose free R5A cultures. The abundance of the transcripts described in results is indicated; see SI Table S1 for the full transcriptome results. <sup>a</sup>Transcripts not detected in the SCO2730::Tn5062 mutant.



**Figure 6.** Heat map illustrating the secondary metabolism transcript abundances. Abundances correspond to log<sub>2</sub> SCO2730::Tn5062 / Wt. Only transcripts showing significant variations (q-value < 0.05) in the SCO2730::Tn5062 mutant compared to the wild-type strain (Wt) are shown. *S. coelicolor* encodes 30 secondary metabolite clusters<sup>24</sup>: 40% up-regulated in the mutant (red colours), 36% down-regulated (green colours), 24% without variation (not shown in the figure).

copper concentrations between 45 and 200 ng Cu/mg protein (Fig. 3A). During the sporulation stage of wild-type sporulating hyphae, we postulate the activation of a cytosolic copper accumulation mechanism that ends in high cytosolic copper levels in dormant spores (Fig. 3C). The putative zinc-responsive SCO2728 transcriptional regulator (conserved domain database accession PRK09514) might modulate the effect of cytosolic copper in sporulating hyphae. Metal sensitive transcriptional repressors can bind zinc, and also copper, which has been demonstrated, for instance, in the case of CsoR from *Bacillus subtilis*<sup>25</sup>. Interestingly, SCO2728 is up-regulated 5.1-fold in the SCO2730::Tn5062 mutant (Table 1), which perhaps indicates autoregulation of its own expression at the high copper concentrations reached in the mutant. As stated above, we postulate that sporulating hyphae accumulate copper, and the high levels of cytosolic copper activate the expression of SCO2728. This autoregulation is comparable to that described for the *csoR* transcriptional regulator<sup>15</sup>, but is at a higher copper concentration than *csoR*, because *csoR* expression is only slightly increased (1.3-fold) at the copper concentration reached in the SCO2730::Tn5062 mutant (Table 1). Sporulating hyphae activate the expression of *nepA* (a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy)<sup>8</sup>, which is analogous to what happens during the germination of SCO2730::Tn5062 mutant spores (Table 1), which maintain higher cytosolic levels than does the wild-type strain (Fig. 3D). Interestingly, *nepA* expression is not regulated by CsoR because *nepA* lacks the consensus binding sequence for CsoR<sup>15</sup>. The importance of copper in sporulation has already been reported<sup>16</sup> and is also supported by the fact that the BCDA copper chelator represses sporulation in our SFM cultures (data not



**Figure 7.** Model outlining of the effect of cytosolic copper in germination, vegetative growth, secondary metabolism and gene expression in *S. coelicolor*. (A) Wild-type Strain. (B) *SCO2730::Th5062* mutant. (C) Relationship between cytosolic copper, gene expression and differentiation. Genes down-regulated are highlighted in grey.m

shown). The positive effect in aerial mycelium development and sporulation becomes a negative effect (delay) at high copper concentrations (over  $750\text{ }\mu\text{M}$ )<sup>15</sup>, which was also observed in this work (Fig. 3F). We postulate that high cytosolic copper concentrations in dormant spores contribute to the inactivation of gene expression.

The acceleration in germination observed in the Wt80Cu spores (Fig. 3E) fits with the model outlined in Fig. 7A. In SFM cultures supplemented with  $80\text{ }\mu\text{M}$  copper, sporulating hyphae reach the high copper levels of the dormant spores very quickly, which stops gene expression, including that of *NepA*. Consequently, the Wt80Cu spores harbour less *NepA* than do the Wt spores obtained in SFM non-modified cultures. The germination of the Wt80Cu spores mimics the phenotype (acceleration in germination) of the *NepA* mutant<sup>8</sup>. To further test this hypothesis, we analysed the germination of *NepA* mutant spores obtained in SFM cultures modified with  $80\text{ }\mu\text{M}$  Cu. The copper effect in the germination of *NepA* mutant spores was much lower than that in the germination of the Wt80Cu spores; there was a 12% increase in germination (SI Fig. S1), compared to a 64% increase observed in Wt80Cu spores (Fig. 3E). This result corroborates that *NepA* has a major effect on the acceleration of spore germination mediated by copper. However, *NepA* is not the only effector in this phenotype, as copper still accelerates germination in the *NepA* mutant (Fig. 3E).

The above model also explains the phenotype of the *SCO2730::Th5062* mutant (Fig. 7B). The absence of *SCO2730/2731* led to a higher copper concentration during germination (Fig. 3D). The expression of *rp1E* was not initiated (Table 1) and secondary metabolism was permanently activated (Figs 1E,G and 5). The overexpression of *SCO1046* during the germination of the *SCO2730::Th5062* mutant spores (2.7-fold, Table 1) was unable

to reduce cytosolic copper to the low levels reached in the wild-type spores ( $45.7 \pm 8$  ng Cu/mg protein in the mutant vs.  $11.8 \pm 0.3$  ng Cu/mg protein in the wild-type strain). *SCO1045* is probably also overexpressed in the *SCO2730::Tn5062* mutant, but it has a 0.06 q-value that is over the 0.05 threshold used in this work; the abundance of this gene was not included in Table 1 (see SI Table S1). We postulate that the ungerminated dead spores that we observed (Fig. 1D), were those with the highest copper levels (4,552 ng Cu/mg protein and considering a variation in single spores comparable to the Wt80Cu spores). The absence of the *SCO2730/2731* copper transporter system in sporulating hyphae did not have a significant effect on the accumulation of cytosolic copper in dormant spores (Fig. 3C), which is not unexpected, considering that the main role of the *SCO2730/2731* copper chaperone/transporter is exerted during germination instead of sporulation (Fig. 3B).

The proposed relationship between cytosolic copper, gene expression and differentiation is summarised in Fig. 7C. Cytosolic copper concentrations under 12 ng Cu/mg protein activate the expression of *rpfE* and germination. Cytosolic copper concentrations under 45 ng Cu/mg of protein are a consequence of *SCO2730/2731* copper transporter activity and correspond to vegetative growth. Cytosolic copper concentrations between 45 and 200 ng Cu/mg of protein activate the expression of *CsoR* and secondary metabolism and are buffered by *SCO1045/1046* chaperone/transporter activity. Copper concentrations between 200 and 625 ng Cu/mg of protein modulate sporulation and activate the expression of *nepA*, *csoR* and the putative cation-responsive transcriptional regulator *SCO2728*. Copper concentrations higher than 625 ng Cu/mg protein, contribute to block gene expression in dormant spores.

The expression of *SCO2728-SCO2731* genes is complex and controlled by at least four promoters. Promoters 1–4 were recently identified<sup>26</sup>; promoter 3 was identified as being controlled by the copper dependent *CsoR* repressor<sup>15</sup> (Fig. 1A). The four promoters affect the expression of *SCO2730/2731*, and complement the *SCO2730::Tn5062* mutant phenotypes (Fig. 2B–E), but they do not fully restore the wild-type phenotype (Fig. 2B–E) or the expression of the *SCO2729/2730* genes to wild-type levels (Fig. 2F,G). This result suggests the existence of further regulation of the expression of these genes, and perhaps additional uncharacterised promoters or regulatory regions in the DNA regions separating these promoters (Fig. 1A).

*SCO2731* is expressed from promoter 4 in the *SCO2730::Tn5062* mutant at a much lower amount than in the wild-type strain (Fig. 2G). Interestingly, the *SCO2730::Tn5062* complemented strain that overexpressed *SCO2731* but lacked *SCO2730* (strain 6 in Fig. 2G) showed a moderate increase in germination compared to the *SCO2730::Tn5062* mutant (Fig. 2B). This result suggests that the *SCO2731* copper transporter ATPase has some transporter activity in the absence of the *SCO2730* chaperone. In fact, all of the *SCO2730::Tn5062* complemented strains overexpressing *SCO2731* (strains 1, 2, 4 and 6) showed an increase in germination (Fig. 2B,G), which is probably due to the *SCO2731* copper secretion activity.

Secondary metabolites are usually defined as non-essential compounds produced at the stationary growth phase. However, this is not always the case. There are secondary metabolites that are produced during spore germination, for instance germicidin A or chalcone<sup>27</sup>, which both show an inhibitory effect in germination<sup>27</sup>. To the best of our knowledge, the *SCO2730::Tn5062* mutant is the first *Streptomyces* strain reported to enhance the expression of genes encoding some secondary metabolite pathways typical of the stationary growth phase, such as actinorhodin, undecylprodigiosin or CDA<sup>27</sup>, during the germination stage (10 hours, see above). Forty percent of the *S. coelicolor* predicted secondary metabolite pathways are overexpressed in the mutant, including several cryptic pathways (Fig. 6). At early time points (10 hours), most of the spores still not germinated in the *SCO2730::Tn5062* mutant (Fig. 1C), which makes the secondary metabolite enhancement observed in the mutant even more impressive, since the ungerminated inactive spores reduce the gene expression abundances (Fig. 6) and the secondary metabolite production quantified in the cultures (Fig. 1E,F).

Cations, specially  $\text{Ca}^{2+}$ , but also  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ , were reported to be concentrated in dormant spores<sup>28</sup>. However, the variability of the concentration of these metals in single spores remains unknown. Our methodology to quantify cytosolic copper in single spores, based on a single-cell sample introduction system for triple-quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry (see Methods), can be adapted to quantify the concentration of these and other metals in individual spores.

Overall, in this work we discovered an unexpected pleiotropic effect of cytosolic copper that modulated germination, differentiation and secondary metabolism in *S. coelicolor*, and we propose a model correlating the copper modulated phenotypes with the expression of key copper homeostasis, and regulatory, genes. The *SCO2730/2731* genes are highly conserved in *Streptomyces*. If, as happens in *S. coelicolor*, the inactivation of these genes in other *Streptomyces* can activate or enhance 40% of the secondary metabolite pathways, this knowledge can expand the screening of new secondary metabolites from streptomycetes. It can also contribute to improving the production of already known bioactive compounds.

## Methods

**Bacterial strains and culture conditions.** All *Streptomyces* and *Escherichia coli* strains used in this work are listed in Table 4. Spores were harvested from SFM solid plates<sup>29</sup> after growth at 30 °C for 12 days. The differentiation analyses were carried out on sucrose-free R5A<sup>30</sup> plates covered with cellophane inoculated with  $10^7$  spores from a fresh water suspension and cultured at 30 °C. The samples for quantification of germination and actinorhodin and undecylprodigiosin production were obtained from 100 ml sucrose-free R5A<sup>30</sup> cultures grown at 30 °C and 200 rpm in 500 ml flasks. Calcium-dependent antibiotic (CDA) production was measured on nutritive agar from Oxoid (Thermo Scientific, UK). *Escherichia coli* strains were cultured in LB and 2xTY media at 37 °C. The following antibiotics were added to select plasmid-bearing and mutant strains: ampicillin (100 µg/ml), apramycin (100 µg/ml for *E. coli*, 25 µg/ml for *S. coelicolor*), chloramphenicol (25 µg/ml), hygromycin (100 µg/ml for *E. coli*, 200 µg/ml for *S. coelicolor*), kanamycin (50 µg/ml) and nalidixic acid (25 µg/ml).

Strain	Description	Reference
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> , reference strain.	29
SCO2730::Tn5062	SCO2730::Tn5062, Apra <sup>R</sup> .	This study
<i>E. coli</i> TOP10	F <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> .	Invitrogen
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM, hsdR</i> .	40
<i>E. coli</i>		
ET12567/pUZ8002	<i>E. coli</i> ET12567 harbouring pUZ8002, a not self-transmissible plasmid which can mobilize <i>oriT</i> -containing plasmids by conjugation.	41
<i>Bacillus subtilis</i>	Indicator microorganism for CDA bioassay	
<b>Plasmids</b>		
pNG3	Integrative and conjugative vector, Apra <sup>R</sup> .	34
PCR <sup>TM</sup> -Blunt II-TOPO <sup>®</sup>	Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit, Kan <sup>R</sup> .	Invitrogen
pUC57		GeneCust
<b>Primers</b>		
RT2930F	CGAGGCGACGGGCTCATC	This study
RT2930R	ACGGCCTGTACGGAGGCGA	This study
RT3031F	GCCCGGCGCACCCATCC	This study
RT3031R	TGCCGAGCGAGACCAGCGTG	This study
RT3031F1	TCCGTCAACCACCGTCTAC	This study
RT3031R1	GAGGACGGAGACCAGCAG	This study
q4758F	ATCACCGACCGGATGCCCTT	31
q4758R	GCCGAGCCCGCTTCTTC	31
q1045F	GCATGAGCTGCGGTCAC	This study
q1045R	CCGGTGTCTGTTGGACG	This study
q1046F	ATGACCACAGTACGACCAG	This study
q1046R	CTTCTCCGTCGCGTAGTTGA	This study
q2730F	CACACCCGACGAGGAGTAAC	This study
q2730R	TGGAGGCGACGGCCTGTA	This study
q2731F	CGAAGTCGAGCTGCTCATC	This study
q2731R	TCTCGGTCGCGTAGTTCAC	This study
q4136F	GGATACCACAAGCAGAAGGC	This study
q4136R	AGCGCGAAGGACTGGAGG	This study
P1F	AAGATATCCTCGCTCCTGCCAGGGCG	This study
P1R	AGGCGTACGCCGTCGTCA	This study
2730F	GTGAGTGGTCCAGGACCGGA	This study
2730R	GGCTCGAGCAGACCCGGCCGACGAGC	This study
P3.2731F	GGGATATCAGGTCGCTGTACGAGTG	This study
P3.2731R	AACTAGTCTCGTGCTGTACCTGGTCG	This study
P123F	GGGATATCCATTAGGCACCCAGGCTTT	This study
P123R	AACTCGAGTCTGGGCGGTCATGTCGTTA	This study

**Table 4.** Bacterial strains, plasmids and primers used in this study.

**DNA and RNA extraction.** Genomic DNA isolation was performed following standard methods<sup>29</sup>. Total RNA samples were isolated as previously described<sup>12</sup> using RNeasy Mini spin columns and treated with DNase I (Qiagen). The quantity and integrity of the RNA samples were measured with Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) and 2100 Bioanalyzer (Agilent).

**Reverse transcription PCR (RT-PCR).** Co-transcription was analysed by RT-PCR. RNA obtained at 48 h sucrose-free R5A liquid cultures. Reverse transcription was performed using the SuperScript one-step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), using 200 ng of total RNA as template. Chromosomal DNA was used as template in the positive controls. RNA and the DNA polymerase included in the Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) kit were used in the negative controls. RT-PCR was performed using the primers indicated in Table 4 (outlined in Fig. 1A) as follows. The first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis was performed at 55 °C for 30 min followed by an initial denaturation at 94 °C for 2 min. Then, a touchdown was performed in 8 cycles during which the annealing temperature was reduced by 1 °C in each cycle: 94 °C for 15 s, 65 °C (Δ−1 °C) for 30 s and 68 °C for 38 s. For the next 35 cycles (94 °C for 15 s, 55 or 58 °C for 30 s and 68 °C for 38 s), the annealing temperature was set at 55 °C (for primers RT2829F/R) and 58 °C (for primers RT2930F/R, RT3031F/R and RT3031F1/R1). A final extension step was performed at 68 °C for 5 min.

**Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR).** A High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) was used to synthesize cDNA from 0.5 µg of RNA from two biological replicates. Real-Time PCRs were carried out on an ABI PRISM 7900 HT thermocycler (Applied Biosystems). The reactions were performed in triplicate, containing 2 µl of twofold diluted cDNA, 10 µl of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 300 nM of specific primers (listed in Table 4) in a final volume of 20 µl. *SCO4758* (amplified using primers q4758F/R)<sup>31</sup> was used as a reference since its expression showed no variation between strains in our RNA-seq results (SI Table S1). The DNA contamination and primer dimer amplification were tested in negative controls replacing cDNA by RNA or water. Amplification conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 90 °C, 40 repetitions of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Primer efficiencies were measured using serial dilutions of genomic DNA as template and the relative quantification of gene expression was performed by the  $\Delta\Delta C_t$  method<sup>32</sup>.

The average transcript fold changes and standard deviations were calculated from the two analysed biological replicates. All of the qRT-PCR quantitative data discussed in this work show large differences in the averages, which are out of the average  $\pm$  SD confidence interval (i.e. error bars are not overlapping).

**SCO2730 mutagenesis.** The transposon insertion single-gene knockout library created by Professor P. Dyson's research group<sup>19</sup> was used for mutagenesis of *SCO2730*. Cosmid C46.2.D06<sup>19</sup> was used to construct the *SCO2730::Tn5062* mutant strain. Gene disruption was carried out by obtaining double cross-overs via conjugation using *E. coli* ET12567/pUZ8002 as a donor strain and following the protocol described in Kieser *et al.*<sup>29</sup>. Mutant strains were confirmed using Southern blotting with chromosomal DNA digested with *Sall*. Southern hybridization was carried out using established procedures with the digoxigenin-labeled 3442-bp *Tn5062 PvuII* fragment from plasmid pQM5062<sup>33</sup> as a probe.

**Complementation of *SCO2730::Tn5062* mutation.** The integrative plasmid pNG3<sup>34</sup> was used to introduce *SCO2730* and/or *SCO2731* with different combinations of the three promoters located up-stream of the *SCO2730* ORF (promoters P1-3 in Fig. 1A) into the *SCO2730::Tn5062* mutant. The specific complementation constructions cloned in pNG3 were: P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731*, P<sub>1</sub>*SCO2730/2731*, P<sub>2</sub>*SCO2730/2731*, P<sub>3</sub>*SCO2730/2731*, P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730*, P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2731*.

The synthesis of the next genes was ordered from GeneCust Europe: *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI-SpeI* (782 bp), *XhoI-SCO2731-SpeI* (2330 bp), *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI* (466 bp), *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI* (919 bp), *EcoRV*-P<sub>2</sub>*SCO2730-XhoI* (485 bp) (SI Table S2). These synthetic genes were provided by GeneCust cloned into pUC57 and were used to create the complementation constructs, including some intermediate forms not shown in Fig. 2.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730* was created as follows; pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI-SpeI* was digested with *EcoRV/SpeI*. The *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI-SpeI* fragment was cloned into pNG3 digested with *EcoRV/SpeI*.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* was constructed digesting pUC57-*XhoI-SCO2731-SpeI* with *XhoI/SpeI* and cloning the *XhoI-SCO2731-SpeI* fragment into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730* digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2731* was created digesting pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI* with *EcoRV/XhoI* and cloning the *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>-*XhoI* fragment into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* was created digesting pUC57-*EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI* with *EcoRV/XhoI* and cloning the *EcoRV*-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730-XhoI* fragment into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>1</sub>*SCO2730/2731* was created as follows; P<sub>1</sub> and *SCO2730* were amplified by PCR from pUC57-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>P<sub>2</sub>*SCO2730* using primers P1F/R and 2730F/R (Table 4). Fragments were amplified via PCR using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo), and were cloned into pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup>. The couple of DNA fragments were combined by overlap extension PCR<sup>35</sup> with the primers P1F y 2730 R (Table 4). The PCR product was cloned and sequenced in pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> using the M13 universal primers. The insert was released with *EcoRV/XhoI* and cloned into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>2</sub>*SCO2730/2731* was created digesting pUC57-*EcoRV*-P<sub>2</sub>*SCO2730-XhoI* with *EcoRV/XhoI* and cloning the *EcoRV*-P<sub>2</sub>*SCO2730-XhoI* fragment into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* was created as follows; P<sub>3</sub>-*SCO2731* was amplified by PCR from *S. coelicolor* DNA using primers P3.2731F/R. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo) was used; the amplicon was cloned into pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> and sequenced using the M13 universal primers. The insert was released with *EcoRV/SpeI* and cloned into pNG3 digested with the same enzymes.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730* was created digesting pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730* with *XhoI/SpeI*. The *XhoI/SpeI*-ends were digested with the *S1 Nuclease* (Thermo Scientific<sup>®</sup>) and the plasmid was religated.

pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2731* was constructed as follows. P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub> was amplified by PCR from pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>2</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730*. *SCO2731* using primers P123F/R (Table 4). The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo) was used; the amplicon was cloned into pCR<sup>TM</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> and sequenced using the M13 universal primers. The insert was released with *EcoRV/XhoI* and cloned into pNG3-P<sub>1</sub>P<sub>3</sub>*SCO2730/2731* digested with the same enzymes.

**Viability staining.** Culture samples were obtained and processed for microscopy at various incubation durations, as previously described<sup>36</sup>. The cells were stained with propidium iodide and SYTO 9 (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, L-13152). The samples were observed under a Leica TCS-SP8 confocal laser-scanning microscope at wavelengths of 488 nm and 568 nm excitation and 530 nm (green) or 640 nm (red) emissions<sup>36</sup>.

**Antibiotic production and protein quantification.** Undecylprodigiosin and actinorhodin were quantified spectrophotometrically, according to Tsao *et al.*<sup>37</sup> and Bystrykh *et al.*<sup>38</sup>. For actinorhodin quantification,

KOH was added to the culture samples at a final concentration of 1 N. Cellular pellets were discarded by centrifugation and actinorhodin concentration was spectrophotometrically determined at 640 nm, applying the linear Beer–Lambert relationship ( $\varepsilon_{640} = 25,320$ ). The culture samples for undecylprodigiosin quantification were vacuum-dried, resuspended in methanol, acidified with 0.5 N HCl and spectrophotometrically assayed at 530 nm, using the Beer–Lambert relationship to estimate concentration ( $\varepsilon_{530} = 100,500$ ).

Calcium-dependent antibiotic (CDA) production was determined via a bioassay against *Bacillus subtilis*. Oxoid nutritive agar (ONA) plates (90 mm in diameter) were inoculated with 5  $\mu$ l of a *Streptomyces* spore suspension at  $1 \times 10^5$  spores/ml and incubated at 30 °C. After 2 days, the plates were overlaid with 5 ml of soft ONA (0.75% agar), inoculated with *B. subtilis* (OD = 0.25) and supplemented with Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (60 mM). Negative controls were performed in parallel without adding calcium. Inhibitory halos were measured after 15 h at 30 °C.

**Protein quantification.** Growth was determined by measuring the protein concentration with the Bradford assay (Biorad) and a bovine serum albumin standard (Sigma). Total protein extracts were obtained mixing a volume of culture with a volume of 1 M NaOH, boiling for 5 min and removing cell debris by centrifugation at 7740 g.

**Spore germination.** Germination was quantified as previously reported<sup>8</sup>. Briefly, germination was quantified in solid media with cellophane discs. At different developmental time points, pieces of cellophane discs were cut and processed for confocal microscopy, as described in the previous paragraph. Three biological replicates of the cultures were analysed at different developmental time points. The percentage of germination was assessed from at least 100 spores at each time point. Spores were considered to be germinating when the germ tubes were visible under the confocal microscope.

**RNA-seq and bioinformatics analysis.** Next-generation sequencing (NGS) was performed by Stab Vida (Caparica, Portugal) from two biological replicates using RNA from SCO2730::*Tn5062* and *S. coelicolor* wild-type Cu-amended/non-amended spores during germination (10 h in sucrose free R5A cultures). Ribosomal RNA was depleted with the Ribo-Zero Bacteria Kit (Illumina), and the cDNA library construction was carried out using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina). The DNA was sequenced in the Illumina HiSeq 2500 platform using 100-bp paired-end sequencing reads (at least 20 M reads per sample). Raw data are available via the Gene Expression Omnibus database (accession GSE111126).

Bioinformatics analysis of the sequenced data was performed under the Linux operative system using the following software: FastQC to check the quality of the sequences, Cutadapt for trimming sequences, Bowtie2 for mapping with the *Streptomyces coelicolor* genome and Cuffdiff for differential expression test analysis<sup>39</sup>. Variation in transcript abundances was considered significant if the q-value was less than 0.05 (SI Table S1).

The SCO2730/2731 orthologues were obtained from the StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>). SCO2730 orthologues: SLI\_3079 (*S. lividans*), SAV\_5332 (*S. avermitilis*), SVEN\_2533 (*S. venezuelae*), SGR\_4828 (*S. griseus*) and SCLAV\_1906 (*S. clavuligerus*). SCO2731 orthologues: SLI\_3080 (*S. lividans*), SAV\_5331 (*S. avermitilis*), SVEN\_2534 (*S. venezuelae*) and SGR\_4827 (*S. griseus*). The *S. clavuligerus* SCO2731 orthologue is not annotated in the StrepDB database, but it is located downstream of SCLAV\_1906. Amino acid similarities were estimated using the software package Lalign ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)).

**Cytosolic copper quantification in dormant spores, germinated spores and mycelium.** The spores or the mycelium were washed 4 times by centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4 °C and resuspended in washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA). The samples were washed in washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5). For the bulk analysis of Cu in dormant spores, an acid digestion was conducted by resuspending the spores in 65% sub-boiling purified HNO<sub>3</sub> at 70 °C for 1 h and then 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 h at the same temperature. For the bulk analysis of Cu in germinated spores and mycelium, the samples were resuspended in rupture buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, which is the same as the washing buffer described above). The lysis step was made using Fast-Prep (MP™ Biomedicals) with six 20-s force 6.5 cycles and with 1 minute on ice between each run (this method failed to lyse dormant spores; data not shown). Cell debris were eliminated centrifuging samples at 12,000 g for 10 min at 4 °C and discarding pellets. The resulting solutions were finally diluted with water and the total Cu content determined by ICP-MS and referred to the dry mass of the spores (1 mL spores were washed with water, dried at 100 °C to a constant weight on pre-weighed tubes) or protein (measured with the Bradford assay). Cytosolic copper in dormant spores could not be normalised against cytosolic protein, because the nitric acid treatment hydrolysed the proteins.

All the measurements were conducted in the triple quadrupole based ICP-MS Thermo iCAP-TQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) using the single quad mode and helium as collision gas. For bulk analysis, the ICP was equipped with a Micro Mist nebulizer, a cyclonic spray chamber (both from ESI Elemental Service & Instruments GmbH, Mainz, Germany) and an auto-sampler ASX-560 (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, NE, USA).

All solutions were prepared using ultrapure water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). HPLC-grade methanol and hydrogen peroxide for the acid digestions were both obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Nitric acid (65%, Suprapur quality) was purchased by Merck Millipore (Darmstadt, Germany) and further purified by sub-boiling distillation. External calibrations were carried out with a Cu ICP standard CertiPur® (1000 mg.L<sup>-1</sup>), purchased from Merck.

**Cytosolic copper quantification in single spores.** Copper was quantified in individual spores by single-cell-ICP-MS analysis. This methodology allows metal analysis in single cells by introducing diluted suspensions of spores that can be transported intact into the plasma and measured using low integration times. The arrival of several cells within the same integration time needs to be avoided by introducing highly diluted



suspensions. For this aim, fresh spore suspensions ( $10^8$  spores  $\text{mL}^{-1}$ ) were diluted to a final concentration of  $10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$  in 10% methanol to ensure the optimal nebulizer performance, according to the manufacturer and previous studies performed by our group<sup>21</sup>. The samples were pumped at a low flow rate of  $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  using the syringe pump SP101i (Florida, USA) fitted with a 1 mL Hamilton syringe (Nevada, USA). Samples were pumped in the triple quadrupole based ICP-MS Thermo iCAP-TQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) using the same parameters described above for the bulk Cu measurements. In this case, we used the microflow nebulizer EnyaMist (Burgener, Ontario, Canada) and a self-developed spray chamber, which allows a high transport efficiency of the intact spores to the plasma. Details on this experimental setup and conditions can be found in our previous work<sup>21</sup>. The data were recorded in the time-resolved analysis mode setting the dwell time to 1 ms and the acquisition time of each run was typically 3 min.

## Data Availability

RNA-seq raw data are available via the Gene Expression Omnibus database (accession GSE111126). The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on request.

## References

- Berdy, J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58**, 1–26, <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1> (2005).
- Hopwood, D. A. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. (Oxford University Press, 2007).
- Flardh, K. & Buttner, M. J. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol* **7**, 36–49, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1968> (2009).
- Yague, P., Lopez-Garcia, M. T., Rioseras, B., Sanchez, J. & Manteca, A. Pre-sporulation stages of Streptomyces differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett* **342**, 79–88, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12128> (2013).
- Bobek, J., Smidova, K. & Cihak, M. A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in Streptomyces. *Front Microbiol* **8**, 2205, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02205> (2017).
- Bobek, J., Strakova, E., Zikova, A. & Vohradsky, J. Changes in activity of metabolic and regulatory pathways during germination of *S. coelicolor*. *BMC Genomics* **15**, 1173, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1173> (2014).
- Strakova, E. *et al.* Systems insight into the spore germination of Streptomyces coelicolor. *J Proteome Res* **12**, 525–536, <https://doi.org/10.1021/pr300980v> (2013).
- de Jong, W. *et al.* NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **71**, 1591–1603, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06633.x> (2009).
- Noens, E. E. *et al.* Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of Streptomyces coelicolor. *Mol Microbiol* **64**, 1244–1259, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05732.x> (2007).
- Sexton, D. L. *et al.* Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **197**, 848–860, <https://doi.org/10.1128/JB.02464-14> (2015).
- Urem, M. *et al.* OsdR of Streptomyces coelicolor and the Dormancy Regulator DevR of Mycobacterium tuberculosis Control Overlapping Regulons. *mSystems* **1**, <https://doi.org/10.1128/mSystems.00014-16> (2016).
- Rioseras, B. *et al.* Characterization of SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in spore cell wall maturation, resistance, and germination in Streptomyces coelicolor. *Sci Rep* **6**, 21659, <https://doi.org/10.1038/srep21659> (2016).
- Ueda, K., Tomaru, Y., Endoh, K. & Beppu, T. Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in Streptomyces tanashiensis. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 693–695 (1997).
- Keijsers, B. J., van Wezel, G. P., Canters, G. W., Kieser, T. & Vijgenboom, E. The ram-dependence of Streptomyces lividans differentiation is bypassed by copper. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 565–574 (2000).
- Dwarakanath, S. *et al.* Response to copper stress in Streptomyces lividans extends beyond genes under direct control of a copper-sensitive operon repressor protein (CsoR). *J Biol Chem* **287**, 17833–17847, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.352740> (2012).
- Worrall, J. A. & Vijgenboom, E. Copper mining in Streptomyces: enzymes, natural products and development. *Nat Prod Rep* **27**, 742–756, <https://doi.org/10.1039/b804465c> (2010).
- Chaplin, A. K., Tan, B. G., Vijgenboom, E. & Worrall, J. A. Copper trafficking in the CsoR regulon of Streptomyces lividans. *Metallomics* **7**, 145–155, <https://doi.org/10.1039/c4mt00250d> (2015).
- Vijgenboom, E. & Keijsers, B. In *Handbook of copper pharmacology and toxicology* (ed. Edward J. Massaro) Ch. 31, 503–525 (Humana; Oxford: Blackwell, 2002).
- Fernandez-Martinez, L. T. *et al.* A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism Streptomyces coelicolor A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 515–522, <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9518-1> (2011).
- Brana, A. F., Mendez, C., Diaz, L. A., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in Streptomyces antibioticus. *J Gen Microbiol* **132**, 1319–1326, <https://doi.org/10.1099/00221287-132-5-1319> (1986).
- Corte Rodriguez, M., Alvarez-Fernandez Garcia, R., Blanco, E., Bettmer, J. & Montes-Bayon, M. Quantitative Evaluation of Cisplatin Uptake in Sensitive and Resistant Individual Cells by Single-Cell ICP-MS (SC-ICP-MS). *Anal Chem* **89**, 11491–11497, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02746> (2017).
- Derouaux, A. *et al.* Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of Streptomyces coelicolor. *J Bacteriol* **186**, 1893–1897 (2004).
- Straw, M. L. *et al.* A cytosolic copper storage protein provides a second level of copper tolerance in Streptomyces lividans. *Metallomics* **10**, 180–193, <https://doi.org/10.1039/c7mt00299h> (2018).
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B. S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* **26**, 1362–1384, <https://doi.org/10.1039/b817069j> (2009).
- Ma, Z., Cowart, D. M., Scott, R. A. & Giedroc, D. P. Molecular insights into the metal selectivity of the copper(I)-sensing repressor CsoR from Bacillus subtilis. *Biochemistry* **48**, 3325–3334, <https://doi.org/10.1021/bi900115w> (2009).
- Jeong, Y. *et al.* The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer Streptomyces coelicolor A3(2). *Nat Commun* **7**, 11605, <https://doi.org/10.1038/ncomms11605> (2016).
- Cihak, M. *et al.* Secondary Metabolites Produced during the Germination of Streptomyces coelicolor. *Front Microbiol* **8**, 2495, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02495> (2017).
- Salas, J. A., Gujjarro, J. A. & Hardisson, C. High calcium content in Streptomyces spores and its release as an early event during spore germination. *J Bacteriol* **155**, 1316–1323 (1983).
- Kieser, T. *Practical streptomyces genetics*. (John Innes Foundation, 2000).
- Fernandez, E. *et al.* Identification of two genes from Streptomyces argillaceus encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol* **180**, 4929–4937 (1998).
- Li, S., Wang, W., Li, X., Fan, K. & Yang, K. Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for Streptomyces coelicolor. *Sci. Rep.* **5**, 15840 (2015).

32. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> (2001).
33. Bishop, A., Fielding, S., Dyson, P. & Herron, P. Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res* **14**, 893–900, <https://doi.org/10.1101/gr.1710304> (2004).
34. Gonzalez-Quinonez, N. *et al.* New PhiBT1 site-specific integrative vectors with neutral phenotype in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2797–2808, <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7271-0> (2016).
35. Lee, J., Shin, M. K., Ryu, D. K., Kim, S. & S., R. W. Insertion and deletion mutagenesis by overlap extension PCR. In: Braman J. (eds) *In Vitro Mutagenesis Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 634. 3rd ed. edn, (Humana, 2010).
36. Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P. & Sanchez, J. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3877–3886, <https://doi.org/10.1128/AEM.02715-07> (2008).
37. Tsao, S. W., Rudd, B. A., He, X. G., Chang, C. J. & Floss, H. G. Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **38**, 128–131 (1985).
38. Bystrykh, L. V. *et al.* Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**, 2238–2244 (1996).
39. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* **7**, 562–578, <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.016> (2012).
40. MacNeil, D. J. *et al.* Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**, 61–68 (1992).
41. Flett, F., Mersinias, V. & Smith, C. P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 223–229 (1997).

## Acknowledgements

We thank the European Research Council (ERC Starting Grant; Strp-differentiation 280304) and the Spanish “Ministerio de Economía, Industria y Competitividad” (MINECO; BIO2015-65709-R and CTQ2016-80069-C2-1R) for financial support. Nathaly Gonzalez-Quinonez was funded by a Severo Ochoa fellowship (FICYT, Consejería de Educación y Ciencia, Asturias, Spain). Roberto Álvarez-Fernández García was funded by “Fundación para la Investigación Biosanitaria de Asturias” (FINBA, Asturias, Spain). Thanks to Beatriz Gutierrez Magan (Universidad de Oviedo, Dpto. Biología Funcional, Área de Microbiología) for her laboratory assistance, Paul Dyson and Meirwyn Evans (Swansea University) for providing the disrupted cosmids, Wouter de Jong (University of Groningen, the Netherlands) for providing the *S. coelicolor* NepA mutant strain, Proof-Reading-Service.com and Nature Publishing Group Language Editing service for proofreading the text.

## Author Contributions

N.G., P.Y., B.R., M.T.L.G. and G.F.G. performed the main experiments. M.C.R. and R.A.F.G. performed mass-spectrometry copper quantification. P.Y., A.M. and M.M.B. designed experiments. P.Y. and A.M. wrote the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40876-0>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher’s note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



Cite this: DOI: 10.1039/c9an01565e

## Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: analytical strategies based on ICP-TQ-MS†

R. Álvarez-Fernández García, <sup>a</sup> M. Corte-Rodríguez, <sup>a</sup> M. Macke, <sup>b</sup>  
 K. L. LeBlanc, <sup>c</sup> Z. Mester, <sup>c</sup> M. Montes-Bayón <sup>a</sup> and J. Bettmer \*<sup>a</sup>

Several organisms have demonstrated the ability of synthesising biogenic selenium-containing nanoparticles. Such particles from biological sources have attracted great attention due to several proven activities as antioxidants or antimicrobial agents. However, little is known in terms of size (distribution), shapes, chemical composition and number/amount/concentration of these particles. Therefore, in this work, we proposed the use of complementary analytical strategies that enabled the detection and characterization of selenium-containing nanoparticles in selenized yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The first strategy to address the intracellular presence of Se within yeast cells, involves the use of single cell ICP-TQ-MS (inductively coupled plasma-mass spectrometry). For this aim, selenium and phosphorous (as constitutive element) were measured as oxides ( $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$  and  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ , resp.) in the triple-quadrupole mode. Then, a simple and fast cell lysis by mechanical disruption is conducted (approx. 30 min) in order to prove the presence of selenium-containing nanoparticles (SeNPs). The lysate is analysed by single particle ICP-TQ-MS and, complementarily, by liquid chromatography coupled to ICP-TQ-MS to cover a wider range of particle sizes. One of the samples revealed the presence of dispersed SeNPs with sizes between a few nm and up to 250 nm also confirmed by transmission electron microscopy (TEM) in the form of elemental selenium. The analysis of the certified reference material SELM-1 showed the presence of spherical SeNPs of 4 to 7 nm diameter. These biogenic particles, at least partially, were made of elemental selenium as well. The whole study reveals the excellent capabilities of “single” event ICP-MS methodologies in combination with HPLC-based strategies for a complete characterization of nanoparticulated material in biological samples.

Received 14th August 2019,  
 Accepted 16th December 2019

DOI: 10.1039/c9an01565e

rsc.li/analyst

## 1. Introduction

Several agents, including selenium compounds, have been shown to have chemopreventive potential against several experimental cancers including prostate cancer. The strongest evidence of the efficacy of selenium as an anti-cancer agent, particularly for prostate cancer, was provided by the Nutritional Prevention of Cancer (NPC) trial, carried out by

Clark and co-workers in the 80 s using 200  $\mu\text{g}$  Se supplementation, as Se-enriched yeast, per day.<sup>1</sup> Out of these experiments it was concluded that Se-methionine, the main selenium component of selenized yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), was the main Se-species responsible for such an effect. However, years later, the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), the largest cancer chemoprevention trial ever conducted, demonstrated that the oral supplementation of selenium in the form of Se-methionine (200  $\mu\text{g}$  daily for a mean of about 5 years), vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol acetate, 400 IU) or selenium + vitamin E did not prevent prostate cancer in the generally healthy, heterogeneous population.<sup>2</sup> Thus, the presence of other Se-containing species in the yeast, proportionally lower in abundance than Se-methionine, seemed to be crucial for the preventive effect observed. In fact, Se-yeast has been reported to contain over 100 unique selenium species, however, the lack of a formal definition of Se-yeast and the extensive variation of strains complicates any verification.<sup>3</sup>

<sup>a</sup>University of Oviedo, Faculty of Chemistry, Dept. of Physical and Analytical Chemistry, C/Julían Clavería 8, E-33006 Oviedo, Spain.

E-mail: bettmerjorg@uniovi.es

<sup>b</sup>University of Münster, Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, Corrensstraße 30, D-48149 Münster, Germany

<sup>c</sup>National Research Council Canada, 1200 Montreal Road, K1A 0R6 Ottawa, Ontario, Canada

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedure, Table S1, and Fig. S1–S5. See DOI: 10.1039/c9an01565e

In this regard, it was clear already from earlier studies that yeast-based nutritional supplements were inconsistent in their makeup relative to their label indications.<sup>4</sup> Such inconsistencies may result from the Se enrichment process,<sup>5</sup> since all the steps of the cellular growth have to be carefully controlled and selenium must be added during critical stages for an optimal bioconversion by yeast cells. In addition, the analytical protocols used for the determination of total selenium and the individual Se-species content in yeast needed some years to be developed and optimized. Nowadays, total Se determination in selenized yeast can be routinely measured using ICP-MS after mineral digestion of the sample and the results can be validated by analysing some of the available reference material.<sup>6</sup> Such determination is usually conducted on the finalized dry yeast product. However, it would be biotechnologically beneficial to have a fast analytical method that helps to monitor, in real time, the selenium incorporation process during yeast growth. Such strategy that should permit to optimize the form and doses of Se exposure meanwhile the yeast fermentation process is occurring is still desirable in the industry. For this aim, the development of single cell-ICP-MS monitoring protocols could be of high interest in this regard. The introduction of individual yeast cells to ICP-MS has been conducted by other authors as “proof of concept” of the fundamental aspects of single cell analysis.<sup>7–9</sup> However, there is a lack of studies that permit the quantitative evaluation of Se incorporation into yeast cells at the individual cell level as well as the cell to cell variations. This can be done by means of a pneumatic high efficiency sample introduction system<sup>8,10,11</sup> and the combination of P and Se monitoring using triple quadrupole ICP-MS technology, as we show in this work.

On the other hand, another important aspect to take into account during Se-rich yeast production is the metabolic formation of the different Se-species. It seems to be clear that most of the selenium in yeast is present in the form of Se-methionine as part of yeast proteins. In this regard, the typical analytical demand from industry concerns verification of the minimum content of Se-methionine (usually >60%) in Se-rich yeast and demonstration of the absence (<2%) of selenite and selenate.<sup>12</sup> However, the characterization of other Se-metabolic products, even at the trace or ultratrace level, is a hot topic of research since, as previously stated, the positive effect of this nutritional supplement might arise from these minor species. For this aim, different speciation methods have been developed in order to identify and characterize the different species biochemically synthesized by the yeast after production.<sup>12–15</sup> A recent review article covers most of the analytical strategies developed over the years for Se-methionine determination, water soluble Se-metabolome characterization and Se-containing proteins analysis.<sup>15</sup> The authors conclude that even high-quality Se yeasts contain traces of inorganic Se (less than 1%). However, the level of such species might depend on the level of Se enrichment and could have industrial (and toxicological) interest. According to the literature, some of these unidentified inorganic Se-species could

be due to the formation of biogenic Se-nanoparticles. Selenium nanoparticles (SeNPs) can be synthesized by microorganisms, such as bacteria, fungi or yeast and have been characterized in some of these matrices using different techniques.<sup>16–21</sup>

As in the case of single cell analysis, the growing interest in the nature of biogenic selenium-containing nanoparticles is accompanied with the need for suitable analytical techniques. A recent work has been published aiming the characterisation of the formation of SeNPs in selenized yeast by means of single particle analysis.<sup>18</sup> In this work, the authors are able to detect particles in the range of 40 to 100 nm in highly enriched selenized yeast with an obtainable size detection limit down to 18 nm. However, it might be possible that smaller particles can be formed when lower concentrations are used for Se-exposure. Micro X-ray tomography has been shown to be able to detect intracellular nanoparticles down to size of few hundred nanometres, however sub ten nanometre particle are posing a significant challenge to this technique.<sup>22,23</sup> The detection of such smaller particles, therefore, requires alternative analytical techniques.

Thus, in this work, we propose the combination of several tools that permitted the detection and characterisation of potentially present SeNPs. Based on different single cell ICP-MS experiments using an introduction system with high cell transport efficiency, the determination of selenium in individual yeast cells facilitated the quantification of its incorporation. Rapid cell lysis of yeast samples with incorporated selenium is developed to run the resulting suspensions in a single-particle ICP-MS experiment. In the case of no detectable signals due to the insufficient size detection limits, HPLC-ICP-MS being well-suited for smaller nanoparticles could be used to address the presence of selenium-containing nanoparticles in the yeast samples. All these tools combined with transmission electron microscopy (TEM) will be applied to evaluate the presence of SeNPs in yeast cells supplemented under different conditions.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

All solutions and suspensions were prepared in water (18.2 M $\Omega$  cm) purified in a PURELAB flex 3 system (ELGA VEOLIA, Lone End, United Kingdom). The ICP-MS instrument was operated with 99.999% Alphagaz Argon (Air Liquide, Valladolid, Spain) and oxygen (from Air Liquide) was used in the reaction cell of the instrument.

Citrate-stabilized gold nanoparticles of different diameters (RM 8011, 8012, and 8013) used as calibrants in HPLC and for the determination of the transport efficiency were obtained from the NIST (Gaithersburg, MD, USA). Selenium nanoparticles (50 nm nominal size) were purchased from Nanocs (New York, NY, USA). The elemental standard solutions (1000 mg L<sup>-1</sup> each) of gold, selenium, and phosphorous were from Merck (Darmstadt, Germany), ammonium acetate

(≥97%) was purchased from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Other reagents (L-(+)-selenomethionine (97%), sodium selenite (99%), sodium selenate decahydrate (99.999%), sodium sulphite (>98%), sodium dodecylsulfate, SDS (98%), and glass beads diameter 0.5 mm (for Mini-Beadbeater) were all obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

In total, four different yeast samples were used in this work. SELM-1, the certified reference material that was produced for the evaluation of methods for the determination of total selenium, methionine and selenomethionine (NRC Canada, Ottawa, Canada).<sup>24</sup> The other yeast samples were prepared from an initial stock culture of *Saccharomyces cerevisiae*, grown in normal strength Miller Broth in a flask capped with a sterile foam stopper, in an incubation chamber held at 28 °C on an orbital shaker at 120 rpm. On day 3 of the stock culture's growth, an aliquot was used to inoculate Miller Broth containing 25 ppm sodium selenite (Se-yeast 1), 25 ppm sodium selenate (Se-yeast 2), or no selenium (yeast 1). On day 7 of growth at the same conditions described above, the culture was centrifuged, washed twice with water, frozen at −80 °C, then freeze-dried.

## 2.2. Instrumentation

**ICP-MS.** All measurements were performed on the iCAP™ TQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) in the triple quadrupole mode using oxygen as reaction gas. For single cell and single particle experiments, the instrument was fitted with a high efficiency sample introduction system (HECIS) that consists of a high performance concentric nebulizer (HPCN) with an inner capillary tube of 110 μm and a low-volume spray chamber that was designed to improve transport efficiency of cells by the use of a sheath gas flow.<sup>10</sup> Solutions and cell suspensions were pumped to the ICP-MS at a flow rate of 10 μL min<sup>−1</sup> using the syringe pump SP101i (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) fitted with a 1 mL Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). The data was acquired using time-resolved analysis mode at a dwell time of 5 ms. The data were further proceeded by the npQuant software (Thermo Fisher Scientific) and OriginPro 8 (Northampton, MA, USA), respectively.

**HPLC-ICP-MS.** Chromatographic separations were carried out on a reversed-phase column (Nucleosil 7 μm particle size, C18, 1000 Å pore size, 250 × 4.6 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany). This type of column proved to be versatile in our research group for other nanoparticle systems.<sup>25,26</sup> The chromatographic system 1260 Series (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was used at a flow rate of 0.5 mL min<sup>−1</sup> with a mobile phase containing a 10 mmol L<sup>−1</sup> ammonium acetate buffer (pH 6.8) and 10 mmol L<sup>−1</sup> of sodium dodecyl sulphate. Under these conditions, the nanoparticles followed a size exclusion mechanism and eluted according to their size (exclusion particle diameter: approximately 50–60 nm).<sup>27</sup> A sample volume of 20 μL was used in each analysis. The exit of the column was directly coupled to the ICP-MS equipped with a concentric MicroMist nebulizer

and a cyclonic spray chamber (both from ESI Elemental Service & Instruments GmbH, Mainz, Germany). The operation conditions of the iCAP TQ ICP-MS are summarized in Table S1.†

**Flow cytometry.** In order to calculate the transport efficiency of the sample introduction system, cells suspensions were counted precisely by using the Flow Cytometer Cytoflex S from Beckman Coulter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), instead of using conventional haemocytometers.

**Transmission electron microscopy (TEM).** For further characterization of the biogenic SeNPs, images were taken in two different transmission electron microscopes: MET JEOL-2000 (Tokyo, Japan) operated at 160 kV and the high resolution MET JEOL JEM-2100F (Tokyo, Japan) at 200 kV. A small volume (150 μL) of the lysed and filtrated cell suspensions as described in 2.3 were deposited on the Cu grids and introduced into the instruments after evaporation of the solvent.

## 2.3. Cell treatment

For single cell ICP-MS analysis, 10 mg of each sample was suspended in 10 mL of water. Before the measurements, each yeast suspension was washed three times by centrifugation at 5000 rpm during 5 min by discarding the supernatant and suspending the pellet in clean water. Finally, suspensions were diluted in water (1:10<sup>4</sup>) and directly injected into the ICP-MS.

On the search for selenium-containing nanoparticles inside the cells, a cell lysis was required. Yeast cells contain, apart from the cell membrane, another layer that is called the cell wall being responsible for the exceptional cell rigidity. For this reason, usually time-consuming enzymatic digestions are needed to lyse them.<sup>18</sup> In this work, a mechanical method based on the use of 500 μm diameter glass beads is proposed. The first step is to mix these glass beads (approx. 850 mg) with the washed cell suspensions (1 mL) followed by further treatment in an ultrasonic bath for 10 min (Ultrasons, J.P. Selecta S.A., Abrea, Spain) and 5 min in a Vortex mixer at maximum speed (Vortex ZX3 VELP Scientifica, Usmate, Italy). Both steps were repeated to ensure higher efficiency. Finally, the mixture was passed through a 0.22 μm filter and diluted with water to carry out the sp-ICP-MS (dilution 1:10<sup>4</sup>) and HPLC-ICP-MS measurements (dilution 1:1).

In order to check the presence of elemental selenium (the form of Se present in the SeNPs) in the yeast lysates, a derivatization with sodium sulphite was carried out.<sup>28,29</sup> Sodium sulphite reacts selectively with Se<sup>0</sup> forming sodium selenosulphate (eqn (1)):



For this, an aliquot of 100 μL of each lysate was mixed with 100 μL of 0.2 mol L<sup>−1</sup> sodium sulphite and heated up to 50 °C during 20 min. After cooling down to room temperature, the mixture was then injected into HPLC-ICP-MS. The corresponding chromatograms were compared to those without treatment with sodium sulphite.

### 3. Results and discussion

Since its introduction in 2005,<sup>30</sup> single cell ICP-MS has been further developed, particularly due the remarkably increased sensitivity of the instruments. Instrumental detection limits (particularly salient with the new triple quadrupole ICP-MS systems) for various isotopes down to the ag-range allow nowadays the elemental monitoring of small objects like single cells or single particles. In contrast to bulk analysis, single cell ICP-MS offers an insight into the individual variation of the elemental content in sought cell populations. Therefore, the first objective of this work was the analysis of different yeast cell lines for its selenium content in individual cells.

The sample introduction system consisted of a high efficiency cell introduction system (HECIS) and a large-bore high performance concentric nebulizer (HPCN) developed by Inagaki and colleagues<sup>11</sup> and used under the conditions described in the experimental part. In order to determine the transport efficiency for yeast cells, the previously washed yeast cells were accurately counted by flow cytometry. In order to perform an absolute counting of the yeast cells, the peristaltic pump of the flow cytometer was calibrated at 60  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Forward and scattered light from the blue laser (488 nm) was registered in order to determine and count the intact cells according to their size and morphology. In the ICP-MS studies, phosphorous served here as internal cell marker since is ubiquitously present in prokaryotic and eukaryotic cells as constitutive element of important cellular components (DNA, RNA, phosphate, phospholipids, *etc.*). Both,  $^{31}\text{P}$  and  $^{80}\text{Se}$ , were monitored in the TQ-mode using oxygen to form  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  and  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ , respectively. The event duration for an individual cell in the case of these elements was about  $\sim 1500 \mu\text{s}$ . In comparison, copper as another constitutive element in yeast cells showed shorter signals ( $\sim 600\text{--}800 \mu\text{s}$ ) using no gas in the collision/reaction cell. This finding suggests that pressuring the collision/reaction cell strongly influences the ion cloud distribution, however, this effect will need more investigation in future. For the present work, phosphorous was chosen as elemental cell marker. Typical time-resolved measurements of phosphorous and selenium are shown in Fig. 1 for the single cell analysis of the reference material SELM-1 using a dwell time of 5 ms.

The ICP-MS detection of  $^{31}\text{P}$  in the single cell mode revealed the corresponding cell events based on the chosen  $4\text{-}\sigma$  criterion. By comparing the detected cell signals within 2 min and the theoretically expected cell number concentration (measured by flow cytometry), the transport efficiency was calculated.<sup>31</sup> For cell number concentrations between 25 000 and 100 000 cells per mL, a constant transport efficiency of  $(69 \pm 3)\%$  was observed in good agreement of formerly published results using a similar set-up.<sup>10</sup> By external calibration with  $^{31}\text{P}$  and  $^{80}\text{Se}$  standards and taking into account the considerations to compare transient and continuous signals as previously described,<sup>31</sup> it is possible to obtain the elemental content in individual cells. Table 1 represents

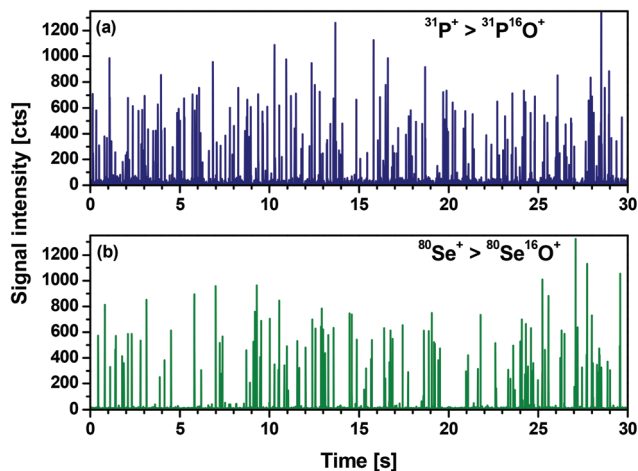


Fig. 1 Single cell ICP-MS of SELM-1 monitoring (a)  $^{31}\text{P}$  (as  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) and (b)  $^{80}\text{Se}$  (as  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) with a dwell time of 5 ms.

Table 1 Determined content of phosphorous and selenium in different yeast samples (values are given in fg per cell)

Sample	Phosphorous		Selenium		Fraction of selenium-containing cells [%]
	Average	Range	Average	Range	
Yeast 1	8.8	5.1–25.0	N.D.	—	—
Se-yeast 1	9.5	2.3–36.1	12.1	0.5–59.8	46
Se-yeast 2	10.9	4.9–32.3	N.D.	—	—
SELM-1	55.3	8.3–201.4	26.5	1.1–94.7	90

N.D.: not detected.

the obtained data for different yeast cells. Yeast 1 represented yeast samples without selenium enrichment, whereas SELM-1 and Se-yeast 1 and Se-yeast 2 were obtained by Se exposure with Se-containing compounds. The results revealed the widespread distribution of both elements in the investigated yeast cells as a fact of biological variation. Whereas the phosphorous content in yeast 1, Se-yeast 1, and Se-yeast 2 was quite comparable, its mass fraction in the reference material SELM-1 was five times higher. This sample was also capable to accumulate higher amounts of selenium in comparison to Se-yeast 1. The sample incubated with selenate did not show significant accumulation of selenium, so that selenate cannot be considered as compound for the production of selenized yeast.

By comparing the number of cell events for both elements, it was also possible to calculate the percentage of cells with incorporated Se. As shown in Table 1, SELM-1 consisted of cells with 90% selenium incorporation, whereas in Se-yeast 1 roughly only every second cell contained detectable selenium mass fractions (detection limits for Se were 0.16 fg per cell). This important information along with the quantification of these elements in individual cells can be useful in order to distinguish (commercial) selenized yeast (Fig. 1) from yeast with

simple addition of any selenium-containing compound (see Fig. S1†). In addition, this kind of experiment could be used in the production of selenized yeast for real-time evaluation of the Se incorporation level, as explained in the introduction. Additionally the fraction of cells detected with Se incorporation could also be indicative growth conditions (*i.e.* static, *vs.* continues fermentation) where the availability of nutrients during the growth of the cell population either be constant or continuously depleted.

With the focus on the samples that were Se-enriched, SELM-1 and the Se-yeast 1 sample, further strategies were developed to scrutinize the presence of selenium-containing nanoparticles. Biogenic Se-containing nanoparticles have wide use in medicine, therapeutics, and environmental remediation. They have been explored for their antimicrobial, antioxidant, and anticancer activity and are synthesized by various bacteria, plants, and fungi.<sup>19</sup> Recently, the group of Lobinski reported about the detection and characterization of biogenic nanoparticles in selenium-rich yeast applying single-particle ICP-MS.<sup>18</sup> For this purpose, a lengthy, multi-step enzymatic procedure was applied for cell lysis. Here, we propose the cell lysis through mechanical disruption of yeast cells. As described in the experimental part, glass beads (with a diameter of 0.5 mm) served in combination with vortex treatment and subsequent filtration for aiming a maximum yield of cell disruption and removal of intact cells. Besides that, a standard suspension of Se nanoparticles underwent the same procedure in order to guarantee that they were not affected in terms of size (distribution) and particle number concentration. The results are shown in Fig. S2 (ESI†) and demonstrated that the mechanical impact of the used glass beads was negligible. After optimising the procedure, flow cytometry generally showed removal of entire cells at about 99.87%. This finding was confirmed by monitoring phosphorous in the single cell mode as shown in Fig. 2a. The time-

resolved measurements revealed the successful cell lysis and cell debris removal as only very few phosphorous events were observed. In contrast, Se-yeast 1 showed various temporal Se signals (Fig. 2b). This observation indicated the presence of possible Se-containing particles that was then subject for further investigations. Provided that eventually present particles consisted of elemental selenium, the conversion of the obtained signal intensities to (spherical) particle sizes resulted in a range of diameters between 40 and 250 nm with a median of 103 nm and average size of 111 nm (see Fig. S3†). Similar particle size distributions were also documented in the literature.<sup>18</sup>

For complementary evidences, TEM images were recorded of the suspensions after cell lysis. Indeed, these images showed the presence of nanoparticles with diameters between 100 and 200 nm (Fig. 3a), but due to their low concentration a representative histogram was not achievable. With the help of a high-resolution TEM, a significant number of smaller nanoparticles (particle diameters between approx. 3.5 and 10.5 nm) were observed in the same suspension (Fig. 3b). These particle sizes were much below the size detection limit of sp-ICP-MS‡, and were, therefore, invisible for this technique. The EDX analysis confirmed the presence of selenium in the observed particles (see Fig. S4†), but unfortunately, the analysis by XRD did not provide the unambiguous evidence about the presence of elemental selenium forming the observed particles. As an alternative proof, a formerly developed HPLC-ICP-MS method was tested that has proven to be suitable for the analysis of smaller nanoparticles (smaller than 40 to 60 nm) for other elements.<sup>25,26</sup> It allowed to distinguish between nanoparticle-bound elements and their corresponding low-molecular species. The expected elution order coincides with a size-exclusion-like mechanism, so that bigger particles elute first followed by smaller ones and low-molecular species.<sup>27</sup> In general, the chromatographic resolution ( $R$ ) between differently sized particles strongly depends on their size dispersity. For nanoparticles of Au and Ag with nominal diameters of 10 and 20 nm,  $R$  was determined to be at about 0.64 and about 1 between 10 nm particles and ionic species. The aim was to complement the chromatographic results with the use of the reaction with sulphite being specific for elemental selenium.<sup>28,29</sup> In the presence of elemental selenium in the nanoparticle fraction, sulphite should degrade these particles and form selenium sulphite ( $\text{SeSO}_3$ ).<sup>29</sup>

In Fig. 4, these comparative experiments are shown. Before adding sodium sulphite (blue trace in Fig. 4), the resulting chromatogram showed two major peaks. The signal at 4.9 min corresponded to the nanoparticle fraction containing selenium (SeNPs). Comparing this retention time to those of standard gold nanoparticles,<sup>25</sup> it indicated the pres-

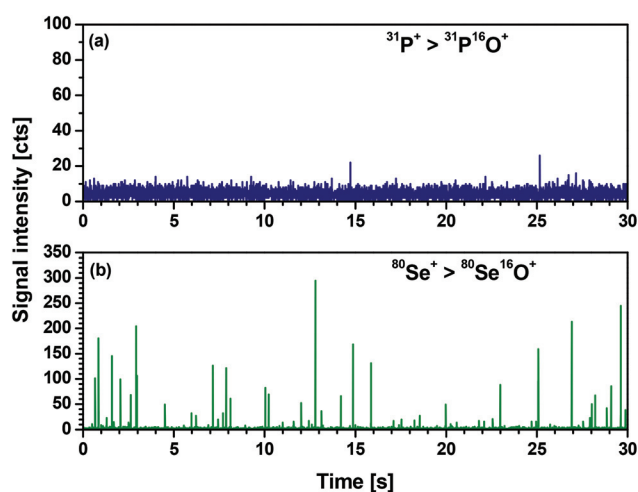


Fig. 2 Single cell ICP-MS of Se-yeast 1 monitoring (a)  $^{31}\text{P}$  (as  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) and (b)  $^{80}\text{Se}$  (as  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) with a dwell time of 5 ms after cell lysis.

‡ Size detection limit under these conditions (5 ms dwell time) considering spherical nanoparticles composed of elemental selenium and applying the 3 $\sigma$ -criterion.

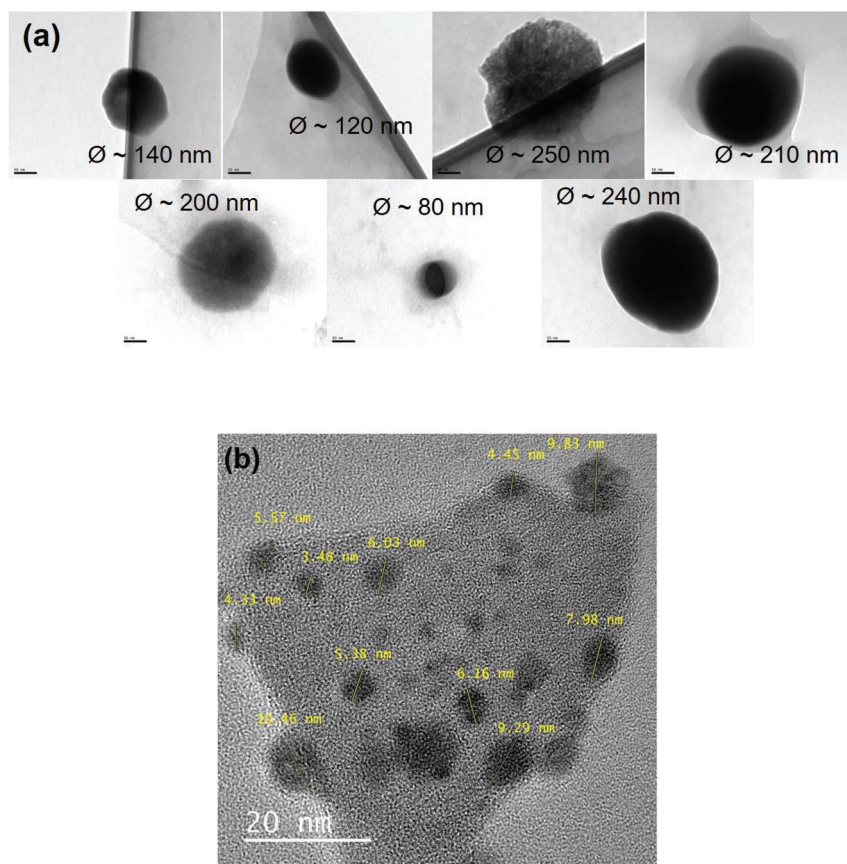


Fig. 3 TEM images of the suspension after cell lysis and filtration. (a) A few detected particles with diameters between approx. 80 and 250 nm (scale bar is 50 nm), and (b) a HR-TEM image showing the presence of particles with diameters between 3.5 and 10.5 nm.

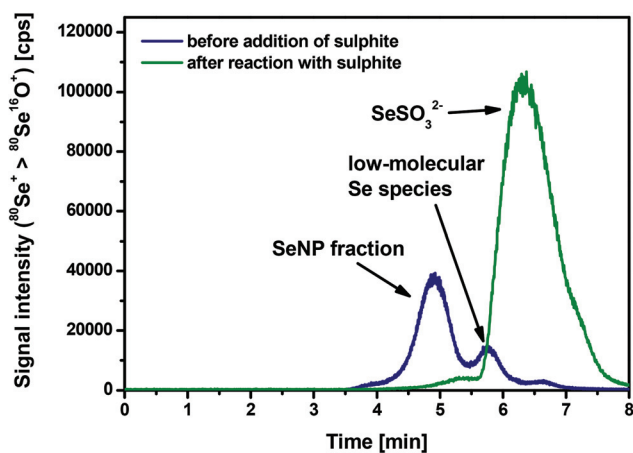


Fig. 4 HPLC-ICP-MS chromatograms of Se-yeast 1 after cell lysis, before (blue) and after (green) reaction with sulphite.

ence of SeNPs with diameters between approximately 4 and 6 nm. This finding matched very well with the TEM observations. The second peak (5.7 min) could be assigned to low-molecular selenium species, probably selenite. After the reaction with sodium sulphite (green trace in Fig. 4), two major

changes became obvious. First of all, the signal for the SeNP fraction disappeared, in fact, completely. This observation indicated the presence of particles formed by elemental selenium in the above mentioned size range, and obviously, the quantitative yield of the applied reaction (eqn (1)). Similar results were found for other organisms after incubation with high concentrations of selenite.<sup>16,17</sup> It is suggested that the microbial reduction of selenite generally serves as detoxification mechanism, which might be true for *S. cerevisiae* as well.

The second drastic change was observed related to the reaction product selenosulphate. The relatively high signal observed at a retention time of 6.4 min represented its formation. However, the obtained signal intensity was disproportionately high compared to the initially present nanoparticle fraction. A plausible explanation was that as mentioned above, the single cell ICP-MS experiments after lysis (Fig. 2b) and also the TEM images in Fig. 3a confirmed the presence of larger nanoparticles. The chosen chromatographic conditions did not allow their elution,<sup>27</sup> but they were present in the suspension during the reaction with sodium sulphite. Provided that this particle fraction also reacted with sodium sulphite, higher signal intensities of selenosulphate would be expected. We tried to quantify the



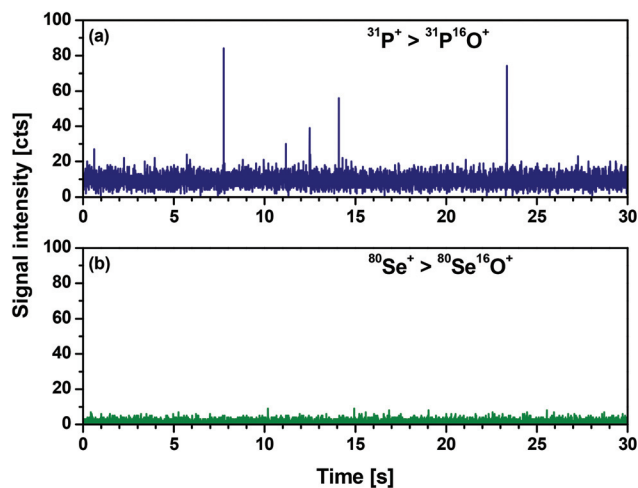


Fig. 5 Single cell ICP-MS of SELM-1 monitoring (a)  $^{31}\text{P}$  (as  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ) and (b)  $^{80}\text{Se}$  (as  $^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ ) with a dwell time of 5 ms after cell lysis.

reaction product by post-column isotope dilution analysis, but due to the poor chromatographic resolution a reliable quantification was not possible. As shown in Fig. S5,† spICP-MS experiments showed a significant decrease in the observed particle number concentration after the reaction with sodium sulphite (roughly 78% less particles). These observations proved that at least an important portion of the larger particle fraction also consisted of elemental selenium. Taking all these observations into account, it can be stated that the complementary use of ICP-MS based techniques (single cell, single particle and HPLC-coupled) supported by TEM could give a deeper insight into the presence of differently sized nanoparticles formed of elemental Se.

Similarly, the evaluation of the presence of NPs in the certified reference material, SELM-1, was attempted. The cell lysis of SELM-1 with following filtration was again carried out in the same manner as described in the Experimental section. Besides a few signals observed in the phosphorous trace (Fig. 5a), this procedure obviously worked satisfactory for this sample as well. However, the absence of any signals for selenium revealed that no detectable selenium-containing nanoparticles were present in SELM-1 (Fig. 5b). In further measurements at a significantly shorter dwell time (100  $\mu\text{s}$ ),§ we neither detected any signals originating from particles. Owing to these findings the presence of selenium-containing nanoparticles above 20 nm (provided that they consist of elemental selenium) could be excluded. The next step was to apply the HPLC-ICP-MS approach that is preferably useful to discriminate between smaller nanoparticles and low-molecular species.<sup>25</sup> Fig. 6 shows a representative

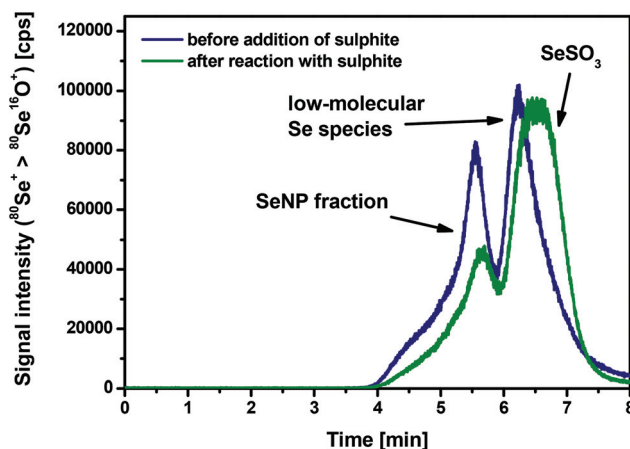


Fig. 6 HPLC-ICP-MS chromatograms of SELM-1 after cell lysis, before (blue) and after (green) reaction with sulphite.

chromatogram of SELM-1 after cell lysis. Besides unidentified low-molecular selenium species (elution time between approx. 5.8 and 7 min) a broader signal was observed between 4 and 5.8 min that gave a first hint on the presence of smaller SeNPs. These retention times matched those obtained analysing the NIST 8011 materials (gold nanoparticles with a nominal particle diameter of 10 nm). In order to confirm these preliminary results, chromatographic fractions were collected between 4 and 6 min and further analysed by HR-TEM. Fig. 7 represents the observation of mostly spherical nanoparticles with diameters between 4 and 7 nm. An additional measure was the treatment of the lysed suspension of SELM-1 with sulphite followed by the analysis using HPLC-ICP-MS. The corresponding chromatogram is shown in Fig. 6. In comparison to the chromatogram without treatment, it showed a decreased signal in the nanoparticle fraction indicating the presence of elemental SeNPs similar to the observations made for Se-yeast 1. However, the smaller remaining signal was an unidentified co-elution of either selenium-containing nanoparticles of different composition or high-molecular species like proteins with incorporated selenomethionine.

To our best knowledge, this is the first report about the presence of biogenic SeNPs in *Saccharomyces cerevisiae* grown in a non-potentially challenged conditions having only low ppm levels of Se in the growth medium. They occurred in a size range between 4 and 7 nm according to the TEM images, and at least part of them consisted of elemental selenium. Future investigations should clarify whether SeNPs with other compositions were present as well. Another aspect that requires future attention is the quantification of the detected nanoparticles. The methodological approach as suggested here cannot be considered as being fully quantitative. For this, the individual analytical steps will have to be optimised with a special focus on the cell lysis and the isolation of the selenium-containing nanoparticles.

§ Size detection limit were 20 nm under these conditions (100  $\mu\text{s}$  dwell time) considering spherical nanoparticles composed of elemental selenium and applying the 3 $\sigma$ -criterion.

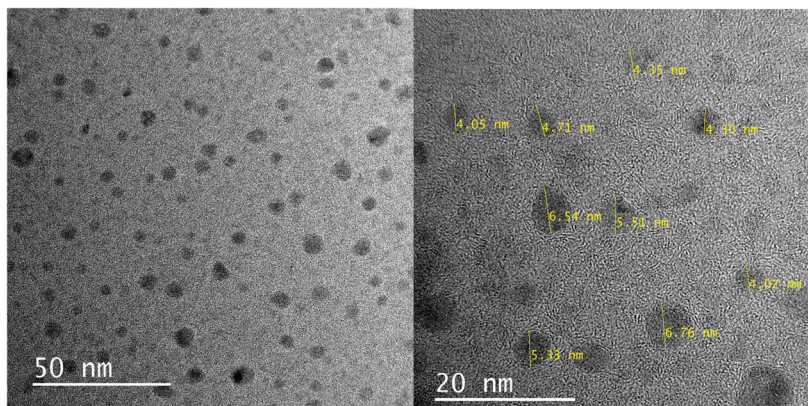


Fig. 7 HR-TEM images of the collected HPLC fraction (SeNP fraction) of SELM-1.

## 4. Conclusion

The application of diverse analytical techniques was suggested for the detection of potentially present selenium-containing nanoparticles in *Saccharomyces cerevisiae*. As first step, the intracellular incorporation of Se was checked using single cell ICP-MS. This technique provided a fast tool to distinguish between incorporated and extracellular Se and might be useful in future work for controlling the fabrication process of commercial selenized yeast. With the help of single particle ICP-MS, the detection of biogenically formed Se-containing nanoparticles was possible provided that the particle sizes exceed the size detection limit of this technique (18 nm as described in ref. 18 and 20 nm using a dwell time of 100  $\mu$ s in this work). For the detection of smaller particle systems, complementary techniques like TEM and HPLC-ICP-MS were required and successfully demonstrated in this study. Although a characterisation of selenium nanoparticles is possible in terms of size, size distribution and partially of chemical composition, further method improvements are necessary in order to achieve quantitative information about their presence in yeast cells. Nevertheless, it can be expected that ICP-MS based techniques will receive more attention for the detailed characterisation of biogenically synthesised Se-containing nanoparticles due to their potential as antioxidants or antimicrobial agents.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Spanish MICINN (Spanish ministry for science and innovation, Grant Numbers MINECO-16-CTQ2015-69583-R and RTI2018-094605-B-I00) and from FICYT (Grant number: FC-GRUPIN-IDI/2018/000242). R. Álvarez-Fernández García

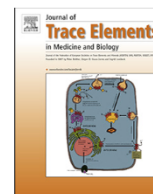
acknowledges his fellowship from FINBA (Foundation for Biosanitary Research and Innovation of the Government of Asturias). Moreover, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, is kindly acknowledged for the instrumental support (iCAP<sup>TM</sup> TQ ICP-MS).

## References

- 1 L. C. Clark, G. F. Combs, B. W. Turnbull, E. H. Slate, D. K. Chalker, J. Chow, L. S. Davis, R. A. Glover, G. F. Graham, E. G. Gross, A. Krongrad, J. L. Leshner, H. K. Park, B. B. Sanders, C. L. Smith and J. R. Taylor, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, 1996, **276**, 1957–1963.
- 2 E. A. Klein, Selenium and vitamin E cancer prevention trial, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, **1031**, 234–241.
- 3 B. Gilbert-López, M. Dernovics, D. Moreno-González, A. Molina-Díaz and J. F. García-Reyes, Detection of over 100 selenium metabolites in selenized yeast by liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2017, **1060**, 84–90.
- 4 K. L. Sutton, C. A. Ponce de Leon, K. L. Ackley, R. M. C. Sutton, A. M. Stalcup and J. A. Caruso, Development of chiral HPLC for selenoamino acids with ICP-MS detection: application to selenium nutritional supplements, *Analyst*, 2000, **125**, 281–286.
- 5 C. A. Ponce de León, M. M. Bayón, C. Paquin and J. A. Caruso, Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods, *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **92**, 602–610.
- 6 Z. Mester, S. Willie, L. Yang, R. Sturgeon, J. A. Caruso, M. L. Fernández, P. Fodor, R. J. Goldschmidt, H. Goenaga-Infante, R. Lobinski, P. Maxwell, S. McSheehy, A. Polatajko, B. B. M. Sadi, A. Sanz-Medel, C. Scriver, J. Szpunar, R. Wahlen and W. Wolf, Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an

- intercomparison exercise for quantifying these analytes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 168–180.
- 7 K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino and N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 637–645.
  - 8 S.-I. Miyashita, A. S. Groombridge, S.-I. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba and K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**, 1598–1606.
  - 9 Z. Liu, A. Xue, H. Chen and S. Li, Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, **103**, 1475–1483.
  - 10 A. S. Groombridge, S.-I. Miyashita, S.-I. Fujii, K. Nagasawa, T. Okahashi, M. Ohata, T. Umemura, A. Takatsu, K. Inagaki and K. Chiba, High sensitive elemental analysis of single yeast cells (*saccharomyces cerevisiae*) by time-resolved inductively-coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system, *Anal. Sci.*, 2013, **29**, 597–603.
  - 11 S.-I. Miyashita, A. S. Groombridge, S.-I. Fujii, A. Takatsu, K. Chiba and K. Inagaki, Time-resolved ICP-MS measurement: a new method for elemental and multiparametric analysis of single cells, *Anal. Sci.*, 2014, **30**, 219–224.
  - 12 K. Bierla, J. Szpunar, A. Yiannikouris and R. Lobinski, Comprehensive speciation of selenium in selenium-rich yeast, *Trends Anal. Chem.*, 2012, **41**, 122–132.
  - 13 R. Jagtap and W. Maher, Determination of selenium species in biota with an emphasis on animal tissues by HPLC-ICP-MS, *Microchem. J.*, 2016, **124**, 422–529.
  - 14 K. M. Kubachka, T. Hanley, M. Mantha, R. A. Wilson, T. M. Falconer, Z. Kassa, A. Oliveira, J. Landero and J. Caruso, Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation, *Food Chem.*, 2017, **218**, 313–320.
  - 15 K. Bierla, S. Godin, R. Lobinski and J. Szpunar, Advances in electrospray mass spectrometry for the selenium speciation: Focus on Se-rich yeast, *Trends Anal. Chem.*, 2018, **104**, 87–94.
  - 16 J. Kessi, M. Ramuz, E. Wehrli, M. Spycher and R. Bachofen, Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4734–4740.
  - 17 A. V. Tugarova, E. P. Vetchinkina, E. A. Loshchinina, A. M. Burov, V. E. Nikitina and A. A. Kamnev, Reduction of selenite by azospirillum brasilense with the formation of selenium nanoparticles, *Microb. Ecol.*, 2014, **68**, 495–503.
  - 18 J. Jiménez-Lamana, I. Abad-Álvaro, K. Bierla, F. Laborda, J. Szpunar and R. Lobinski, Detection and characterization of biogenic selenium nanoparticles in selenium-rich yeast by single particle ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, **33**, 452–460.
  - 19 S. A. Wadhvani, U. U. Shedbalkar, R. Singh and B. A. Chopade, Biogenic selenium nanoparticles: Current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, **100**, 2555–2566.
  - 20 A. G. Pereira, L. G. L. Gerolis, L. S. Gonçalves, T. A. Pedrosa and M. J. Neves, Selenized *Saccharomyces cerevisiae* cells are a green dispenser of nanoparticles, *Biomed. Phys. Eng. Express*, 2018, **4**, 035028.
  - 21 Z. Mester and L. Ouerdane, Production of sulfur-free nanoparticles by yeast, *US Patent* US8986975B2, 2015.
  - 22 J. C. Andrews, F. Meirer, Y. Liu, Z. Mester and P. Pianetta, Transmission X-ray microscopy for full-field nano imaging of biomaterials, *Microsc. Res. Tech.*, 2011, **74**, 671–681.
  - 23 Y. Liu, J. C. Andrews, F. Meirer, A. Mehta, S. C. Gil, P. Sciau, Z. Mester and P. Pianetta, Applications of hard X-ray full-field transmission X-ray microscopy at SSRL, *AIP Conf. Proc.*, 2010, **1365**, 357–360.
  - 24 Z. Mester, C. Brophy, M. McCooeye, V. Clancy, P. Maxwell, S. McSheehy, R. Sturgeon, S. Willie and L. Yang, *SELM-1: Selenium enriched yeast certified reference material*, National Research Council Canada, 2010, DOI: 10.4224/crm.2010.selm-1.
  - 25 J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayón and J. Bettmer, Speciation of silver nanoparticles and silver(i) by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICPMS, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 1316–1321.
  - 26 J. García Fernández, C. Sánchez-González, J. Bettmer, J. Llopis, N. Jakubowski, U. Panne and M. Montes-Bayón, Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1039**, 24–30.
  - 27 C. A. Sötebier, S. M. Weidner, N. Jakubowski, U. Panne and J. Bettmer, Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1468**, 102–108.
  - 28 J. Zhang, H. Lu and X. Wang, Sodium selenosulfate synthesis and demonstration of its in vitro cytotoxic activity against HepG2, Caco2, and three kinds of leukaemia cells, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2008, **125**, 13–21.
  - 29 K. Loeschner, N. Hadrup, M. Hansen, S. A. Pereira, B. Gammelgaard, L. H. Møller, A. Mortensen, H. R. Lam and E. H. Larsen, Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats, *Metallomics*, 2014, **6**, 330–337.
  - 30 F. Li, D. W. Armstrong and R. S. Houk, Behavior of Bacteria in the Inductively Coupled Plasma: Atomization and Production of Atomic Ions for Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 1407–1413.
  - 31 M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco, J. Bettmer and M. Montes-Bayón, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 11491–11497.





## Complementary techniques (spICP-MS, TEM, and HPLC-ICP-MS) reveal the degradation of 40 nm citrate-stabilized Au nanoparticles in rat liver after intraperitoneal injection

Roberto Álvarez-Fernández García<sup>a</sup>, Nerea Fernández-Iglesias<sup>a</sup>, Carlos López-Chaves<sup>b</sup>,  
Cristina Sánchez-González<sup>b,\*</sup>, J. Llopis<sup>b</sup>, Maria Montes-Bayón<sup>a</sup>, Jörg Bettmer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Oviedo, Faculty of Chemistry, Dept. of Physical and Analytical Chemistry, C/ Julián Clavería 8, E-33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> University of Granada, Faculty of Pharmacy, Dept. of Physiology, Campus Cartuja, E-18071 Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Gold nanoparticles  
Single particle ICP-MS  
HPLC-ICP-MS  
TEM  
Rat liver tissues

### ABSTRACT

**Background:** Due to the increased use of engineered nanoparticles (NPs), their tracing in environmental and biological systems is of utmost importance. Besides their accumulation within a biological specimen, little is known about their degradation and transformation into corresponding low-molecular species that might influence any toxicological impact.

**Analytical methods:** Wistar rats underwent intraperitoneal injections of 40 nm citrate-stabilized gold nanoparticles. Different liver samples were analysed for the occurrence of nanoparticles and potential degradation products by means of spICP-MS, TEM and HPLC-ICP-MS.

**Main findings:** Studies using spICP-MS revealed the presence of the originally administrated Au NPs (40 nm diameter) and some evidences of other Au-containing species due to the increased background signal. Images obtained by transmission electron microscopy (TEM) showed the predominant presence of particles of significantly smaller diameter ( $6 \pm 2$  nm). As complementary method, HPLC-ICP-MS confirmed the presence of both particle types indicating a degradation of the Au NPs accompanied by detection of low-molecular Au species.

**Conclusions:** This study underlines that degradation of gold nanoparticles to low-molecular gold species might have to be taken into account in future for studies on their toxicological behaviour and their potential use in clinical applications.

## 1. Introduction

Since the industrial use of nanomaterials (NMs) has continuously grown in the last two decades, their impact on the environment and the biosphere is of general concern. Among them, Au NPs attracted great interest for their use in electronics, catalysis, and solar cells, but also in biomedical applications. The evaluation of potential impact of these emerging materials on organisms requires analytical techniques being capable of delivering information about the elemental composition, size, shape and concentration of the particles as well as the possible release of ionic species in the case of metal-based NMs [1–3].

The great interest in tracing NPs in environmental and biological systems has encouraged the development of various methods for the analysis of Au NPs; in particular, ICP-MS was found to be a very valuable tool in various applications. Besides hyphenated techniques like

flow field-flow fractionation [4–6], liquid chromatography [7,8] and electrophoresis [9,10] coupled to ICP-MS, single particle ICP-MS (spICP-MS) turned out to be a powerful alternative thanks to its simplicity of operation, its rapidness and its potential to provide valuable species information (e.g. the presence of solubilized ions together with the NPs) [11,12].

All these techniques were combined with different extraction strategies to address the fate of NPs in various biological samples [13]. In these experiments, alkaline solubilization with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) resulted in recoveries between 86 and 123% of 10 and 60 nm Au NPs as total Au. However, initial investigations using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) on separating the Au NPs extracted this way (stabilized by bovine serum albumin) did not succeed [5]. TMAH extraction also turned out to be suitable for the analysis of Au and Ag NPs in ground beef using spICP-MS [14].

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [crissg@ugr.es](mailto:crissg@ugr.es) (C. Sánchez-González), [bettmerjorg@uniovi.es](mailto:bettmerjorg@uniovi.es) (J. Bettmer).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.006>

Received 25 February 2019; Received in revised form 29 April 2019; Accepted 9 May 2019

0946-672X/ © 2019 Published by Elsevier GmbH.

Loeschner et al. compared the use of alkaline (TMAH) and enzymatic (proteinase K) digestion for the determination of 60 nm Au NPs in Wistar rat spleen tissues after intravenous injection using spICP-MS [15]. This technique showed significant lower recovery of the sought species after enzymatic digestion due to inferior transport efficiency of Au NPs in the presence of enzymatically digested tissue residues. In another approach, tomato plant samples were analyzed by spICP-MS after releasing Au NPs enzymatically by Macerozyme R-10 enzyme [16]. Jenkins et al. studied spICP-MS for the discrimination of Au NPs and their agglomerates in spiked blood samples [17].

Lately, methods based on liquid chromatography coupled ICP-MS have become popular due their ability to distinguish between particle-bound metals and the corresponding low-molecular (ionic) species [18,19]. HeLa cells and cell media were analyzed after incubation with 10 nm Au NPs or dissolved Au<sup>3+</sup> in order to follow their transformation in the different environment [20]. A similar study was conducted on the lysates of algae cells after incubation with 10 nm Au NPs or dissolved Au<sup>3+</sup> [21]. Recently, our group studied the use of HPLC-ICP-MS for the analysis of 10 nm Au NPs (NIST RM 8011) in Wistar rat liver and spleen tissues after intraperitoneal injection [22]. By applying enzymatic solubilization with proteinase K, a remarkable fraction of total Au (~30%) turned out to be present as ionic species indicating the importance of NP degradation processes during their transport, storage and metabolism in biological organisms. This type of Au NP degradation was also observed for other particle sizes [23].

Understanding the fate of Au NPs within biological systems is, therefore, of high importance, and analytical techniques are required to monitor the accumulation and potential degradation of the sought nanoparticles. In this study, we aim a comparative study of spICP-MS, HPLC-ICP-MS and TEM for tracing citrate-stabilized Au NPs in rat liver tissues after intraperitoneal injection. We intend to demonstrate that they can provide complementary data giving a more complete picture about the degradation and transformation of Au NPs in biological systems.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and materials

All solutions were prepared using ultrapure water (> 18 MΩ cm) obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The investigated citrate-stabilized Au NPs of 40 nm nominal size in an aqueous suspension (GC-40) were obtained from Nanovex Biotechnologies S.L. (Llanera, Spain) and used without any further purification. Standard aqueous suspensions of citrate-stabilized Au NPs with nominal diameter of 10, and 30 nm (RM 8011, and 8012, respectively) were acquired from National Institute of Standards & Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

All tissue samples were prepared in phosphate-buffered saline (PBS). Sodium chloride was purchased from Prolabo (Leuven, Belgium) and potassium chloride, disodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) and potassium dihydrogen phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). In addition, tris(hydroxymethyl)amino-methane (TRIS, pH 7.5, Bio-Rad Laboratories, USA), sodium chloride (NaCl, ≥ 99%, Sigma-Aldrich), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA, Fluka) and Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) were used for the preparation of the lysis buffer. Sucrose (α-D-Glucopyranosyl, Sigma-Aldrich) was used for an additional pre-concentration step. The mobile phase for HPLC coupled to ICP-MS contained ammonium acetate (> 98%) adjusted to pH 6.8 and sodium dodecylsulfate (SDS, 98.5%) both from Sigma-Aldrich. For spICP-MS experiments, methanol (Fisher, Geel, Belgium) was used to dilute all the samples. Elemental standard solution of Au (1000 mg L<sup>-1</sup>) was purchased from Merck. The ICP-MS was operated with Alphagaz Argon (purity 99.999%, Air Liquid, Valladolid, Spain) and was daily optimized in terms of detection sensitivity by introducing a multi-element tuning

**Table 1**

Instrumental settings of the ICP-MS coupled to HPLC and in the single particle mode.

ICP-MS system	
Instrument	Agilent 7700
RF power	1500 W
Auxiliary gas flow	0.87 L·min <sup>-1</sup>
Coolant gas flow	15.5 L·min <sup>-1</sup>
Isotope monitored	<sup>197</sup> Au
Dwell time	100 ms (HPLC) 10 ms (spICP-MS)
Nebulizer	
	Meinhard type (HPLC) EnyaMist (spICP-MS)
Spray chamber (T)	
	Scott type (2 °C) (HPLC) Home-made total consumption spray chamber (spICP-MS) [22]
Nebulizer gas flow	
	1.1 L·min <sup>-1</sup> (HPLC) 1.1 L·min <sup>-1</sup> (spICP-MS)
Sample flow rate	
	0.5 mL·min <sup>-1</sup> (HPLC) 10 μL·min <sup>-1</sup> (spICP-MS)
HPLC system	
Instrument	Shimadzu LC-10AD
Column	Nucleosil 7 μm particle size, C18, 1000 Å pore size, 250 x 4.6 mm ID
Mobile phase	10 mmol L <sup>-1</sup> ammonium acetate, 10 mmol L <sup>-1</sup> SDS, pH 6.8
Injection volume	20 μL

solution with a concentration of 1 μg L<sup>-1</sup> of each element (Merck). <sup>7</sup>Li<sup>+</sup>, <sup>89</sup>Y<sup>+</sup>, <sup>205</sup>Tl<sup>+</sup> were used for the sensitivity check, double-charged ions by measuring the ratio <sup>140</sup>Ce<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>2+</sup>, and finally, the oxide formation was monitored by the ratio <sup>140</sup>Ce<sup>16</sup>O<sup>+</sup>/<sup>140</sup>Ce<sup>+</sup>.

### 2.2. Instrumentation

All measurements were performed using the quadrupole based inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) Agilent 7700 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Chromatographic separations were carried out on a Nucleosil C18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) with an HPLC pump (LC-10AD, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and a 6-way injection valve (Rheodyne model 3125, Cotati, CA, USA). All connections and the injection loop (20 μL) were made of PEEK. The coupling was realized by directly connecting the column outlet to the nebulizer of the ICP-MS instrument at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. Detailed information are summarized in Table 1. For the single particle experiments, the ICP-MS was equipped with a micro nebulizer, EnyaMist (ESI Elemental Service & Instruments GmbH, Mainz, Germany) operated at a flow rate of 10 μL·min<sup>-1</sup> using an syringe pump (SP100IZ syringe pump, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) and a home-made total consumption spray chamber [24]. A dwell time of 10 ms was chosen (<sup>197</sup>Au<sup>+</sup>). The ICP-MS was used in time-resolved analysis (TRA) mode and the acquisition time of each run was typically 180 s. For the further characterization of Au NPs in the tissues, a high resolution transmission electron microscope JEOL JEM 2000ExII (Jeol Ltd, Tokyo, Japan) was used.

### 2.3. Sample preparation

Animals. Two adult male Wistar rats (180–200 g of weight) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Citrate-stabilized gold nanoparticles suspension (40 nm) was injected intraperitoneally at a single dose to the first rat (2 mL of 50 μg mL<sup>-1</sup>). The second rat was injected with 2 mL of ultrapure water.

After 4 h of formulation administration, both rats were anesthetized with a solution of ketamine (0.75 mg kg<sup>-1</sup> body weight) and xylazine (0.10 mg kg<sup>-1</sup> body weight) (both from Fatro Ibérica, Barcelona, Spain), and exsanguinated by cannulating the posterior aorta. Each liver was removed, weighed, placed in pre-weighed polyethylene vials, and stored at -80 °C until analysis.

All experiments with rats were carried out in accordance with Directional Guides Related to Animal Housing and Care and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

NP extraction. Liver was excised in little portions, snap frozen and homogenised in a mortar cooled with liquid nitrogen to grind and pulverize samples. The resulting frozen liver powder from each sample were suspended into the appropriate volume of cold lysis buffer (containing  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.5), 1% (v/v) Triton X-100). This suspension underwent sonication in an ice bath for 15 min. Lysates were cleared by centrifugation for 15 min at  $13,000g$  and  $4^\circ\text{C}$  and were further used for TEM, spICP-MS and HPLC-ICP-MS studies.

### 3. Results and discussion

The purpose of applying different techniques was the determination of particle sizes and size distribution by spICP-MS and the detection of eventually present smaller nanoparticles ( $< 18 \text{ nm}$  that was the size detection limit of spICP-MS) and their corresponding low-molecular Au species by HPLC-ICP-MS. In order to visualize the particles, TEM was applied as a complementary technique. The nominal size given by the producer was  $40 \text{ nm}$  and was determined to be  $(37 \pm 2) \text{ nm}$  by our TEM measurements (Fig. S1).

First, the EnyaMist nebulizer was tested for spICP-MS analysis as it showed recently excellent suitability for single cell analysis [24]. This nebulizer was chosen due to the expected higher transport efficiency in comparison to standard pneumatic nebulizers accompanied by a reduction of sample consumption. The sample flow was fixed to  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . According to the manufacturer the addition of an organic modifier was recommended. The variation of the methanol concentration between 0 and 15% (v/v) showed that pure suspensions of  $30 \text{ nm}$  Au NPs in water resulted in a relatively unstable aerosol with significantly lower transport efficiency and detection sensitivity (Fig. 1). A maximum transport efficiency was obtained at methanol concentrations of 10% (v/v). Increasing methanol concentrations resulted in higher sensitivity of the individual particle pulses. However, in order to prevent carbon deposition on the sampler cone, it was decided to continue further studies with 10% methanol.

Under these conditions, the transport efficiency was determined by relating the pulse frequency to the calculated particle number concentration of the NIST materials [11,25] and determined to be 48.3% for the  $30 \text{ nm}$  Au NPs. Using these parameters for spICP-MS analysis, the  $40 \text{ nm}$  Au NPs suspension was characterized in terms of size and distribution. The corresponding spICP-MS experiment and the particle size distribution can be found in Fig. S2. The obtained average particle size  $(34 \pm 5) \text{ nm}$  was in good agreement with the TEM data  $(37 \pm 2) \text{ nm}$ , and served as a reference for the following studies. They

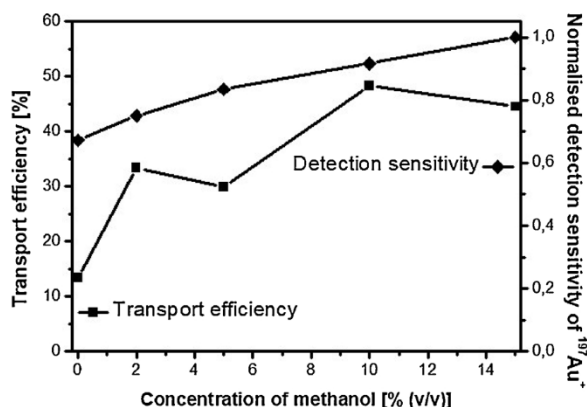
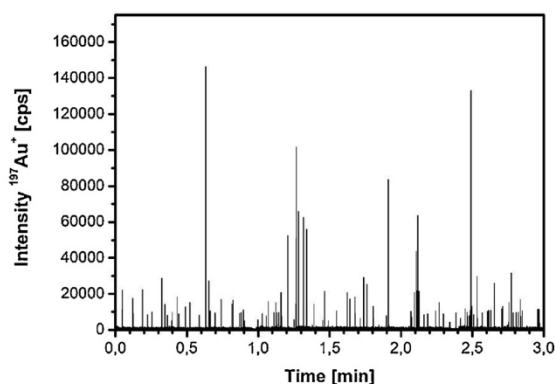
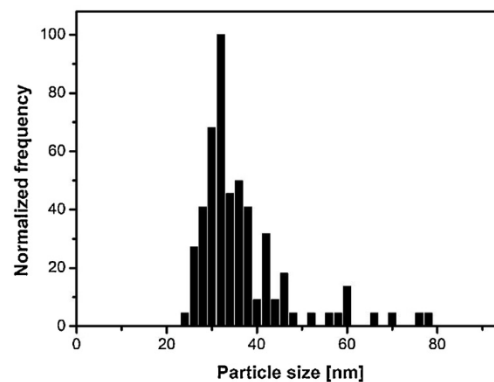


Fig. 1. Influence of the methanol concentration on the detection sensitivity and transport efficiency.



(a)



(b)

Fig. 2. Analysis of Au NPs in the extract of a rat liver tissue by spICP-MS. (a) Time-resolved measurement of Au, and (b) the resulting size distribution (bin size:  $2 \text{ nm}$ ).

had the aim to investigate and determine the potential degradation of Au NPs in biological systems.

The  $40 \text{ nm}$  Au NPs suspension was injected intraperitoneally into a Wistar rat and the liver tissue was prepared for further analysis as described in the experimental section. The lysate of the liver tissue was diluted 1:20 in a methanol/water mixture (10/90, v/v) and analysed by spICP-MS. No significant matrix effects on the detection sensitivity were found. Fig. 2 illustrates the obtained time-resolved measurement (Fig. 2a) and the resulting particle size distribution (Fig. 2b). The particle size distribution was equal to the one of the standard suspension (Fig. S2) indicating the adequate performance of the whole strategy to preserve the originally injected Au NPs. The background was slightly higher than in the spICP-MS experiments of the standard. The background signal increased from approximately 100 cps to 1000 cps. This observation suggested the presence of dissolved Au species or Au NPs of a size smaller than the achievable (size) detection limits ( $\sim 18 \text{ nm}$  using the  $3\sigma$ -criterion [12]) and indicated a degradation of the originally administered nanoparticles. Such a degradation in biological systems was also observed in other studies, e.g. for Ag NPs after oral administration in rats [26] or for Au NPs after intraperitoneal injection [22].

In order to prove the findings, complementary TEM measurements should reveal the presence of the initially administered Au NPs and other potentially present NPs of smaller diameter. Fig. 3 depicts a TEM image of the previously analysed lysate solution. As can be observed, various NPs were present with an average diameter of  $(6 \pm 2) \text{ nm}$ . In contradiction to the spICP-MS analysis, the Au NPs of original size  $(37 \pm 2) \text{ nm}$  could not be observed. According to the spICP-MS and the TEM measurements, the detected number of bigger sized NPs was quite low or even negligible. Interestingly, the size distribution of the

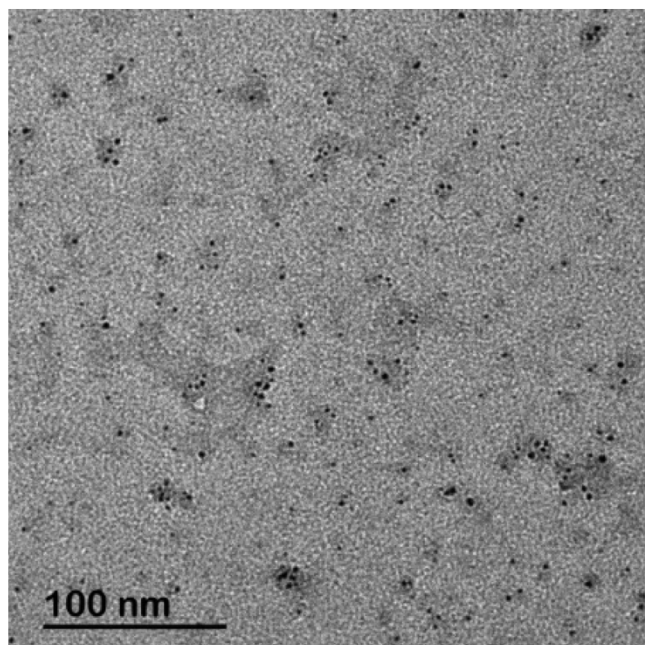


Fig. 3. TEM image of the extracted Au NPs from the liver tissue.

observed particle sizes in the TEM images is relatively narrow. As the observed population of smaller particles presented sizes below the detection limit of spICP-MS, the latter method only revealed the presence of bigger Au NPs. On the other hand, the TEM image gave a first proof that smaller particles were predominantly accumulated in the liver tissue, probably due to degradation during transport and/or accumulation in the tissue.

Since HPLC-ICP-MS has proven to be a versatile tool for the analysis of Au and Ag NPs in a size range between roughly 2 and 50 nm and their corresponding ionic species [7,9,27], this was the next strategy to be tested. In combination with an enzymatic extraction (proteinase K), it provided important information about different Au species (NPs and ionic species) present in rat liver tissues [22,23].

Thus, the previously obtained lysate was subjected after 1:10 dilution in the mobile phase to this complementary method. The presence of SDS in the mobile phase was necessary to elute nanoparticles from the column [7]. It should also facilitate protein denaturation and reduce the protein corona formed around the nanoparticles. A representative chromatogram is shown in Fig. 4. Three different fraction could be observed, each one with very low abundance. A relatively broad NP fraction eluted between 3.5 and 4.5 min and could be correlated to Au NPs with sizes of around 30 nm (NIST 8012 (30 nm Au NPs) elute at 3.9 min). Obviously, they represent the particles initially administrated and beforehand detected by the spICP-MS experiments. The second fraction between 4.5 and 5 min reflected the presence of smaller Au NPs (roughly between 6 and 10 nm, NIST 8011 (10 nm Au NPs) eluted at 4.6 min.) in agreement with the observation in the TEM measurements.

Comparing the peak areas of both fractions resulted in a ratio of approximately 2:1 (fraction 1 : fraction 2). This is, at first view, contradictory to the observation by TEM in which the fraction of smaller Au NPs was dominant. In order to explain this result, it has to be kept in mind that each particle of the fraction containing the bigger Au NPs (~37 nm diameter) consists of about 200 times more Au atoms than the particles of the smaller size (~6 nm)<sup>1</sup>. This means that equal particle number concentrations would result in a roughly 200 times larger peak area for the bigger Au NPs. In conclusion, the observed peak intensity

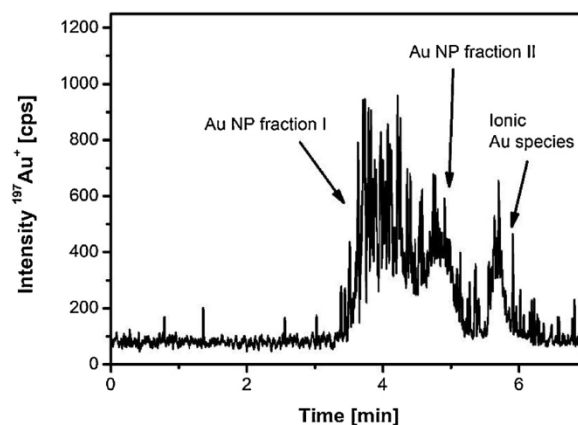


Fig. 4. Chromatogram of the liver lysate after dilution in the mobile phase (1:10, v/v).

for the fraction of the smaller Au NPs revealed a clearly higher particle number concentration. The third peak proved the presence of low-molecular Au species that obviously appeared due to particle degradation. In fact, TEM is not capable of monitoring these species. Thus, the HPLC-ICP-MS approach revealed the presence of two differently sized NP fractions, and additionally, low-molecular species. Other studies reported about the presence of such Au species in different biological systems [18,20–22] and their presence should be taken into consideration for any toxicological study [28].

These studies clearly revealed that the administrated Au NPs were predominantly degraded to smaller ones of a narrow size distribution. Although the mechanism remains unclear, the significant reduction in size might accompanied by a reduced cytotoxicity of Au NPs [28]. Sulphur-containing compounds like cysteine have been recognized for its influence on the dissolution of Ag NPs [29] and could play a significant role for the observed effects on Au NPs. As “side effect”, low-molecular Au species were formed, but it could not be clarified whether the processes appeared during the transport and/or accumulation of the Au NPs.

#### 4. Conclusions

The stability of citrate-coated Au NPs was investigated in liver samples after intraperitoneal injection into Wistar rats. The application of three different techniques (spICP-MS, TEM, and HPLC-ICP-MS) revealed the presence of the originally administrated Au NPs with a diameter of approximately 37 nm together with nanoparticles with a significantly smaller size ( $6 \pm 2$  nm). The latter ones could be only detected by TEM and HPLC-ICP-MS as their sizes were lower than the size detection limit obtainable by spICP-MS. Another product of the observed degradation process, low-molecular Au species, could be detected by HPLC-ICP-MS. These findings underlined that the monitoring of the fate of nanoparticles in biological systems requires various complementary techniques in order to fully understand the evolution of the sought species. Although little is known about the mechanism of nanoparticle degradation within a biological system, the detection of particles with significantly smaller diameters and the corresponding low-molecular species (in this case of Au) might help to understand the defence mechanisms of living organisms to the exposure of nanomaterials.

#### Author contributions

C. S.-G., J. L., M. M.-B. and J. B. conceived and designed the experiments; R. A.-F.G., N. F.-I. and C. L.-C. performed the experiments; all authors analyzed the data; J. B. wrote the paper.

<sup>1</sup> For spherical particles with a volume (V) and diameter (d) following  $V = \frac{1}{6} \pi d^3$ .



## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Spanish MICINN (Spanish ministry for science and innovation, Grant Numbers CTQ2011-23038 and MINECO-16-CTQ2015-69583-R), from the FICYT (Grant number: FC-15-GRUPIN14-010) and MECED (Spanish ministry for education culture and sports, Grant Number FPU13/00062). R. Álvarez-Fernández García acknowledges his fellowship from FINBA (Foundation for Biosanitary Research and Innovation of the Government of Asturias).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.006>.

## References

- [1] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M.L. Forrest, P. Stroeve, M. Mahmoudi, Toxicity of nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2323–2343, <https://doi.org/10.1039/C1CS15188F>.
- [2] T.M. Benn, P. Westerhoff, Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4133–4139, <https://doi.org/10.1021/es7032718>.
- [3] SO/TS 19590, *Nanotechnologies – Size Distribution and Concentration of Inorganic Nanoparticles in Aqueous Media via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, (2017).
- [4] H. Hagendorfer, R. Kaegi, J. Traber, S.F.L. Mertens, R. Scherrers, C. Ludwig, A. Ulrich, Application of an asymmetric flow field flow fractionation multi-detector approach for metallic engineered nanoparticle characterization – prospects and limitations demonstrated on Au nanoparticles, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 367–378, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.014>.
- [5] B. Schmidt, K. Loeschner, N. Hadrup, A. Mortensen, J.J. Sloth, C. Bender Koch, E.H. Larsen, Quantitative characterization of gold nanoparticles by field-flow fractionation coupled online with light scattering detection and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 2461–2468, <https://doi.org/10.1021/ac102545e>.
- [6] S. López-Sanz, N. Rodríguez-Fariñas, R.D. Rodríguez Martín-Doimeadios, A. Ríos, Analytical strategy based on asymmetric flow field flow fractionation hyphenated to ICP-MS and complementary techniques to study gold nanoparticles transformations in cell culture medium, *Anal. Chim. Acta* 1053 (2019) 178–185, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11>.
- [7] A. Helfrich, W. Brüchert, J. Bettmer, Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 431–434, <https://doi.org/10.1039/B511705D>.
- [8] E.P. Gray, T.A. Bruton, C.P. Higgins, R.U. Halden, P. Westerhoff, J.F. Ranville, Analysis of gold nanoparticle mixtures: a comparison of hydrodynamic chromatography (HDC) and asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1532–1539, <https://doi.org/10.1039/C2JA30069A>.
- [9] A. Helfrich, J. Bettmer, Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS-based hyphenated and complementary ESI-MS techniques, *Int. J. Mass Spectrom.* 307 (2011) 92–98, <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.01.010>.
- [10] B. Franze, C. Engelhard, Fast Separation, characterization, and speciation of gold and silver nanoparticles and their ionic counterparts with micellar electrokinetic chromatography coupled to ICP-MS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 5713–5720, <https://doi.org/10.1021/ac403998e>.
- [11] C. Degueldre, P.-Y. Favarger, S. Wold, Gold colloid analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry in a single particle mode, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 263–268, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.021>.
- [12] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278, <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- [13] C.-K. Su, Y.-C. Sun, Considerations of inductively coupled plasma mass spectrometry techniques for characterizing the dissolution of metal-based nanomaterials in biological tissues, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 1689–1705, <https://doi.org/10.1039/C5JA00132C>.
- [14] E.P. Gray, J.G. Coleman, A.J. Bednar, A.J. Kennedy, J.F. Ranville, C.P. Higgins, Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 14315–14323, <https://doi.org/10.1021/es403558c>.
- [15] K. Loeschner, M.S.J. Brabrand, J.J. Sloth, E.H. Larsen, Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3845–3851, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7431-y>.
- [16] Y. Dan, W. Zhang, R. Xue, X. Ma, C. Stephan, H. Shi, Characterization of gold nanoparticle uptake by tomato plants using enzymatic extraction followed by single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 3007–3014, <https://doi.org/10.1021/es506179e>.
- [17] S.V. Jenkins, H. Qu, T. Mudalige, T.M. Ingle, R. Wang, F. Wang, P.C. Howard, J. Chen, Y. Zhang, Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood, *Biomaterials* 51 (2015) 226–237, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.072>.
- [18] Y. Yang, L. Luo, H.-P. Li, Q. Wang, Z.-G. Yang, Z.-P. Qu, R. Ding, Analysis of metallic nanoparticles and their ionic counterparts in complex matrix by reversed-phase liquid chromatography coupled to ICP-MS, *Talanta* 182 (2018) 156–163, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.077>.
- [19] J. García Fernández, C. Sánchez-González, J. Bettmer, J. Llopis, N. Jakubowski, U. Panne, M. Montes-Bayón, Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures, *Anal. Chim. Acta* 1039 (2018) 24–30, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.003>.
- [20] S. López-Sanz, N. Rodríguez-Fariñas, R. Serrano Vargas, R.D.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, A. Ríos, Methodology for monitoring gold nanoparticles and dissolved gold species in culture medium and cells used for nanotoxicity tests by liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Talanta* 164 (2017) 451–457, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.11.060>.
- [21] J. Malejko, N. Swierzevska, A. Bajguz, B. Godlewska-Zylkiewicz, Method development for speciation analysis of nanoparticle and ionic forms of gold in biological samples by high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 142 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.01.014>.
- [22] J. Soto-Alvaredo, C. López Chaves, C. Sánchez-González, M. Montes-Bayón, J. Llopis, J. Bettmer, Speciation of gold nanoparticles and low-molecular gold species in Wistar rat tissues by HPLC coupled to ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 193–199, <https://doi.org/10.1039/C6JA00248J>.
- [23] C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, C. Sanchez-Gonzalez, Gold nanoparticles: distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 14 (2018) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.011>.
- [24] M. Corte Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco, J. Bettmer, M. Montes-Bayón, Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by single-cell ICP-MS (SC-ICP-MS), *Anal. Chem.* 89 (2017) 11491–11497, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02746>.
- [25] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9361–9369, <https://doi.org/10.1021/ac201952t>.
- [26] K. Loeschner, N. Hadrup, K. Qvortrup, A. Larsen, X. Gao, U. Vogel, A. Mortensen, H. Rye Lam, E.H. Larsen, Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate, *Part. Fibre Toxicol.* 8 (2011) 18, <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-18>.
- [27] C.A. Sötebier, S.M. Weidner, N. Jakubowski, U. Panne, J. Bettmer, Separation and quantification of silver nanoparticles and silver ions using reversed phase high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in combination with isotope dilution analysis, *J. Chromatogr. A* 1468 (2016) 102–108, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.028>.
- [28] S.K. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S.N. Luoma, E. Valsami-Jones, The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies, *Sci. Total Environ.* 438 (2012) 225–232, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.066>.
- [29] A.P. Gondikas, A. Morris, B.C. Reinsch, S.M. Marinakos, G.V. Lowry, H. Hsu-Kim, Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 7037–7045, <https://doi.org/10.1021/es3001757>.





## Single cell ICP-MS using on line sample introduction systems: Current developments and remaining challenges



M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón\*, J. Bettmer\*\*

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 18 September 2020

#### Keywords:

Single cell analysis  
ICP-MS  
Nanoparticles  
Metallodrugs

### ABSTRACT

Due to the improvements in detection sensitivity, inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) has matured to be an exceptional tool for the elemental analysis of small objects. The characterisation of individual metallic nanoparticles by so-called single particle ICP-MS (SP-ICP-MS) has paved the way for the analysis of smallest biological systems like individual cells. Developments in single cell ICP-MS (SC-ICP-MS) have increased significantly with essential efforts in the introduction of cell suspensions into the ionisation source by developing nebulizer/spray chamber systems that allow maximum transport efficiencies. These developments have been accompanied with the commercial launches of ICP-MS instruments for better control of spectral interferences and time-of-flight instruments with improved sensitivity.

In this review, special emphasis was put on summarizing the recent developments in sample introduction systems for liquid cell suspensions. Where available, analytical figures of merit will be compared for the different approaches as well as the most relevant applications of SC-ICP-MS.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction: The cell to cell variation and the need for single cell analysis

A cell's state is defined largely by the interplay between its genome (and epigenome), transcriptome and proteome. Two daughter cells that have just been produced from the same precursor cell during mitosis can exhibit, after a number of multiplications, differences in their genomes, transcriptomes and proteomes. Thus, the cell to cell variation on the genes, transcripts and proteins can be the cause of several diseases, including cancer, neurological and developmental disorders [1]. Furthermore, in the case of tumoral cells, the understanding of the plurality of cancer cell states within a tumour, of which some can be metastatic and/or resistant to therapy, could determine the level of progression of the disease as well as the treatment to be applied [2]. Regarding metals, cells utilize metal ions for their fundamental processes like signalling, catalysis and gene expression. Metals are also important for

maintaining the structural integrity of DNA and RNA which are polyanionic in nature. Besides being required for replication, metals are also utilized in structure formation, folding and in catalytic mechanisms. Therefore, the study of the cell to cell variation in terms of the metallome is also of vital importance [3]. Thus, the development of analytical/biotechnological strategies that enable the exploration of heterogeneity between cells and within populations, previously assumed to be homogeneous, is an active area of research. Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) was proposed many years ago for the determination of metal content in individual cells in the pioneer work of Houk and colleagues [4], but it was not until few years ago when this potential started to be fully exploited [5]. This development coincided with the instrumental improvement of time-of-flight (TOF) mass analysers with fast scanning capabilities that provide quasi-simultaneous multi-element detection maintaining high sensitivity. Although there is still a great need for further improvement in miniaturization, integration and detection sensitivity, the analysis of single cells by ICP-MS is now an almost mature topic that could be revised in order to summarize the most significant figures and the still remaining challenges.

Indeed, a crucial choice for any single-cell experiment is the method for isolating individual cells into a format compatible with

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [montesmaria@uniiovi.es](mailto:montesmaria@uniiovi.es) (M. Montes-Bayón), [bettmerjorg@uniiovi.es](mailto:bettmerjorg@uniiovi.es) (J. Bettmer).

the downstream single-cell elemental analysis. Two main ways have been taken to approach single cell introduction systems into ICP-MS: 1) the use of “online” pneumatic or microfluidic devices that can activate the throughput to tens of thousands of single cells and 2) the application of “offline” approaches by means of ablation techniques (mainly laser ablation ICP-MS, LA-ICP-MS) after cells are deposited on suitable surfaces [6,7]. A recent tutorial review has focussed on LA-ICP-MS for the analysis of individual cells [8]. In this work, we will focus on the on-line introduction techniques and on how the cell type and morphology are significant factors to take into account when selecting a specific device as sample introduction system. In addition, we try to illustrate the most significant applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry for addressing cell to cell variations regarding: i) differences in constitutive elements that might contribute to differentiate cell populations within a tissue or a fluid; ii) differences with the respect to the uptake of metalloids and/or metallic particles; iii) differences in the presence of specific cell markers (mostly of protein structure) using specific element-containing labels.

## 2. Cellular characteristics for on-line introduction into ICP-MS

Single-cell-ICP-MS analysis has been used for the analysis of different types of unicellular systems of different origin such as human [9–11] or other mammalian cell lines [12,13], bacteria [4,14], yeast [15,16] or unicellular algae [14,17–19]. Parameters like cell size, morphology or stability, determined by the composition and structure of their cellular envelope, have an influence on their analysis, facilitating or hindering their transport into the plasma, where cellular integrity must be preserved. The most critical features of the different cell types are revised in the following section.

Human and animal cell cultures will proliferate indefinitely given appropriate fresh medium and space [20]. Cell lines of different origin are widely used in biomedical research, since they are a simple and representative model for a huge variety of studies, such as the cellular incorporation of metalloids and nanoparticles. For this aim, cell cultures are used to maintain cells *in vitro*, preserving their physiological, biochemical and genetic properties and allowing cellular research without the systemic variations and ethical aspects affecting studies that use complete organisms. However, each cell type has its own features that can be very different depending on their origin. As first parameter, the cell size can be the first differential feature. For example, among human cells the sizes range from about 7  $\mu\text{m}$  for red blood cells up to 150  $\mu\text{m}$  in some ova. Nevertheless, all of them have common structural features. Their cellular envelope is constituted by a cellular membrane that surrounds the cytoplasm containing the cell organelles. The cell membrane is a lipid bilayer consisting of two layers of phospholipids that are oriented with the hydrophobic chains in the inside part of the bilayer and the hydrophilic groups in the outside part (the cytoplasm in the inner layer and the extracellular medium in the outer layer). In addition, proteins and other types of lipids such as cholesterol can also be present. The cell membrane protects and delimits the cell and is also a semipermeable barrier that regulates the passage of substances through it.

Most cell lines are adherent, which means that they need to adhere to a solid surface to grow. After seeding the cells, they adhere to the surface of the flask by adhesion proteins. Since SC-ICP-MS by using liquid sample introduction systems requires a cellular suspension, cells should be first efficiently detached from the solid surface preserving their structure and avoiding the formation of aggregates. To detach the cells, the most used method is the addition of low concentrations of trypsin, an enzyme that

hydrolyses cell adhesion proteins to the surface. The proteolytic activity of trypsin can damage cells by cleaving membrane proteins [21], so the trypsinization process must be carried out carefully. Furthermore, once the cell suspension has been obtained, its analysis should be performed immediately to avoid cell degradation. Optical microscopy is a suitable technique in order to control the cell morphology during handling, transport to the nebulizer and nebulization [22].

Popular for SC-ICP-MS experiments are yeast cells, being eukaryotic unicellular microorganisms that belong to the fungi kingdom. There are thousands of yeast species whose sizes show a wide variation. They typically have diameters of 3–4  $\mu\text{m}$ , but they can reach up to 40  $\mu\text{m}$  [23]. Yeasts have a lipid bilayer membrane and a second envelope, the cell wall, separated by a periplasmic space with a high protein concentration. The cell wall is a structural component that has different functions such as maintaining cell turgor, preserving morphology and stabilizing the internal osmotic conditions of the cell. This protects the cell against physical damage by providing significant mechanical resistance. It also prevents degradation by foreign proteins and dehydration while serving as a scaffold for external proteins [24,25]. The cell wall represents about 10–25% of the dry weight of yeast cells [26] such those from *Saccharomyces cerevisiae*. It is constituted of polysaccharides, proteins and lipids. The proportion of the components of the cell wall can vary according to the culture and harvest conditions of the yeast [26] and, specially, to the yeast strain [27], but it is around 35–40% mannoproteins, 50–55%  $\beta$ -1,3-glucans, 5–10%  $\beta$ -1,6-glucans and 2% chitin [28]. The mechanical strength of the wall is mainly due to the innermost layer of the wall, consisting mainly of  $\beta$ -1,3-glucans and chitin. Such mechanical strength facilitates that yeast cells can be introduced into ICP-MS using pneumatic nebulization in a highly efficient way avoiding cell disruption, as previously stated.

Single-cell-ICP-MS has also been applied to bacteria, which are prokaryotic unicellular microorganisms that comprise a very heterogeneous domain of different morphologies and exhibit smaller sizes. The average size of most bacteria is between 0.2 and 2  $\mu\text{m}$ . For example, *Escherichia coli* has an approximate diameter of 0.5  $\mu\text{m}$  and a cell volume of 0.6–0.7  $\mu\text{m}^3$  [29]. The cell cytoplasm is surrounded by a cell envelope consisting of the cytoplasmic membrane, cell wall and, in some cases, a second outer membrane. Among its different functions, the provision of mechanical resistance and morphological robustness is of interest here, protecting the cell against adverse conditions such as osmotic shock, for example [30]. The bacterial cell membrane is a typical lipid bilayer. Surrounding the cytoplasmic membrane is the cell wall. The main component of this cell wall is peptidoglycan, a polysaccharide consisting of residues of N-acetylmuramic acid (NAM) and N-acetylglucosamine (NAG) that alternate in equal amounts. The peptidoglycan chains of the cell wall cross-link with each other using short peptides that form peptide bonds with them [30]. Depending on the cell envelope structure, Gram-positive and Gram-negative bacteria can be distinguished, which show different colour under Gram staining. The first ones have only the cytoplasmic membrane and a thick peptidoglycan cell wall. Gram-negative bacteria have a thinner cell wall and a second lipid bilayer, the outer cell membrane. In these ones, the peptidoglycan wall has a thickness of 3–6 nm, while in Gram-positive bacteria cells it is typically 10–40 nm [31,32]. Bacterial cells, as yeast cells, are robust and can resist the pneumatic nebulization, so they are transported with high efficiencies into the ICP-MS. Examples have been shown in the evaluation of the incorporation of Te nanoparticles into different bacterial strains including *Salmonella* or *E. coli* by single cell ICP-MS using micronebulizers exhibiting transport efficiencies about 70% [33] or in the evaluation of Cu uptake in different mutants of *Streptomyces* [34].

Finally, algae are a very heterogeneous phylogenetic group of organisms that contain chlorophyll and have the ability to perform the oxygenic photosynthesis. They can be unicellular or multicellular and include green algae, brown algae, red algae and various groups of unicellular organisms such as dinoflagellates or diatoms, reflecting the huge diversity of the group. Unicellular algae are microorganisms of a variable size that usually have a cell wall (except for euglena). As an example, there are species such as *Chroomonas sp* with a size of 5–7  $\mu\text{m}$ , *Cryptomonas ovata* of 20–30  $\mu\text{m}$  or *Gonyostomum semem* of 50–70  $\mu\text{m}$  [17]. The structure and composition of the cell walls of algae vary considerably. In the majority, the cell wall is mainly composed of cellulose fibers and, to a less extent, other polysaccharides such as xylan, pectin, mannans, alginic acids or fusidic acid [35]. Sometimes the wall is also strengthened by the deposition of calcium carbonate, producing calcareous walls. In others, the major component is silicon, to which proteins and polysaccharides are bonded, as in the case of diatoms [36]. These walls remain intact even after the death of the alga. In this regard, as mentioned before, Mavrikakis et al. utilized cell cultures of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* to investigate their uptake of arsenate by SC-ICP-MS and its effect on the membrane lipid profile by EASI-MS (Easy Ambient Sonic-Spray Ionisation) [37]. The cell integrity was confirmed by obtaining optical and fluorescence microscopy images of the cells spotted on a glass slide prior to EASI-MS analysis. In addition, Meermann et al. used diatoms (*Cyclotella meneghiniana*) to develop an automated purification HPLC single-cell ICP-MS approach [38].

The presence of cell walls in yeast, bacteria and single-celled algae provides stability to the cells that allows their easy manipulation prior to analysis. This permits their washing by centrifugation and their dilution in different solvents without loss of intact cells, which makes their use common in the development and characterization of new methods and cell introduction systems. Cell robustness also facilitates the transport of walled cells to the nebulizer and the nebulization process preserving cell integrity, which contributes to improve transport efficiencies. However, when working with human cell lines, their only dilution in water can cause cell membrane degradation due to osmotic shock.

On the other hand, an inverse relationship between cell size and transport efficiency has been observed [14]. This is maybe due to the greater trend of larger cells to deposit through the sample introduction system or to their incomplete ionization in the plasma, which also affects human cell lines, usually larger than microbial cells. An alternative way to solve stability problems of cell lines is the chemical fixation of the cell structure in suspension with different fixatives such as formaldehyde [39]. Cell fixation is very useful when there is a time lapse between cell collection and analysis to avoid cell degradation or when the sample preparation can compromise cell structure [40]. This strategy helps to preserve the architecture and composition of cells since it provides mechanical rigidity and prevents cell decomposition and autolysis [39]. The use of formaldehyde is a widely used fixation method that produces the crosslinking between proteins and nucleic acids in cells, effectively preserving the cell structure in a wide range of cells and tissues [42,43].

However, there are many other reasons why cellular fixation might be also needed and one of them is related to immunolabelling using primary and secondary antibodies that require the cell membrane to be disrupted to allow the antibodies access to their targets within the cell. This usually requires fixation and permeabilization, i.e. the creation of holes in the cell membrane, while keeping intact the main membrane structure and intracellular components. In any case, chemical fixation methods for cells in suspension are simpler and less prone to modify cell status than many of those applied to fix cells on solid surfaces for direct analysis or imaging.

### 3. On-line single cell introduction systems: General considerations

As previously stated, some instrumental setups, such as LA-ICP-MS, allow the analysis of single cells which have been previously fixed on a solid surface. Such systems can provide the elemental analysis of single cells even with subcellular resolution, in the best case, under certain premises [44]. This article, however, is focused on sample introduction systems that can be applied to the analysis of single cells in suspension, avoiding the step of fixing the cells on a solid holder, which requires time, appropriate protocols and can stimulate the cells to a different biological status. Although some types of cells can be analysed in their native form in a suspension-based approach (e.g. yeast or bacteria) the cell robustness, as previously stated, is a crucial factor to determine whether a specific cell type is susceptible for direct analysis in its native form or needs to be treated for fixation.

The direct analysis of cell suspensions requires, however, several steps potentially prone to uncertainties. Fig. 1 gives an overview of the potential pitfalls and challenges associated to the individual steps undertaken during the analysis of single cells from liquid suspensions. Storage, for instance, needs to guarantee the integrity of the sample in terms of cell number concentration and cell stability. This includes factors like shaking to avoid cell sedimentation, temperature, ionic strength of the sample, etc. At the same time, any sample preparation has to eliminate potential contaminations from elements of interest (e.g. the constitutive elements like phosphorous, sulphur, iron, copper and zinc). This aspect influences the choice of buffer solutions, cell culture media or the addition of some reagents during sample preparation.

Regarding transport, cell suspensions should be efficiently transported into the plasma by devices that keep cell integrity while transferring the highest number of cells into the ICP-MS (Fig. 1). Otherwise, sample introduction systems that break a large percentage of the cells during nebulization and transport will have not only low transport efficiencies, but will provide high background signals corresponding to the solubilisation of the element present in the different subcellular compartments. Lastly, memory effect due to adsorption of cells in the transport tubing and inner nebulizer lines may not only reduce the transport efficiency, but also affect the cell number concentration. With all these limitations in mind, the following section summarizes the most successful individual cell nebulization approaches and their applications.

#### 3.1. Data evaluation of single cell ICP-MS analysis

Data evaluation in single cell analysis follows the same principles as those already established for single particle analysis, which have been already discussed by Degueldre et al. [45–48]. In this regard, there is no difference in considering cells or (nano)particles and all equations can be adapted to single cell analysis. Discrimination between cell events and background, which is proportional to the concentration of the dissolved element, is the first step in data processing. For this aim, the most usual approach consists on setting a threshold value to discriminate when signals can be considered as a countable cell event. The threshold can be set empirically, but some approaches remove the subjective component when defining the threshold by mathematical methods. Most publications use as criterion to set the threshold value the sum of the average background plus N-fold the standard deviation ( $N\sigma$ ), being N usually 3 [49,50]. Such value can be re-set by applying an iterative procedure by which the events complying the criteria are collected, the remaining dataset is averaged again and the standard deviation recalculated. Finally, the data points  $N\sigma$  above the mean are the countable data (cell) events [49,50].

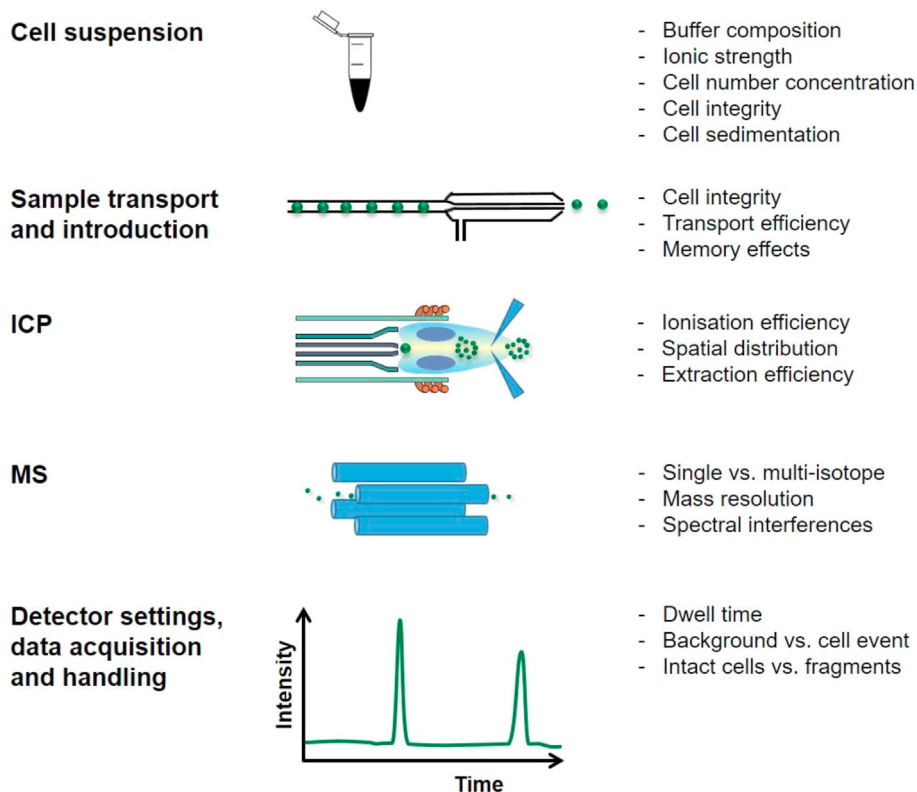


Fig. 1. Some considerations about single cell ICP-MS experiments.

Once the data are filtered as described, the next step refers to the transformation of every event into the mass of the given element per cell (Fig. 2). For this aim, it is possible to apply an external calibration using liquid standards, following the principles of single particle analysis. The mass of element per cell can then be calculated by relating the height or area of each cell event with that obtained by the external calibration, and following the equation (1), which is modified from the original equation published by Degueldre et al. for single particle analysis [48]:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \tag{1}$$

where  $m_c$  is the mass of the element in the cell,  $F$  is the sample flow rate,  $t$  is the dwell time,  $I$  is the net event intensity (or area),  $b$  is the slope of the calibration curve using external liquid standards and  $\eta$  is the transport efficiency of the inorganic standard solutions (Fig. 2). It is important to remark that  $\eta$  is generally different from the transport efficiency of cells, because cells can be transported to

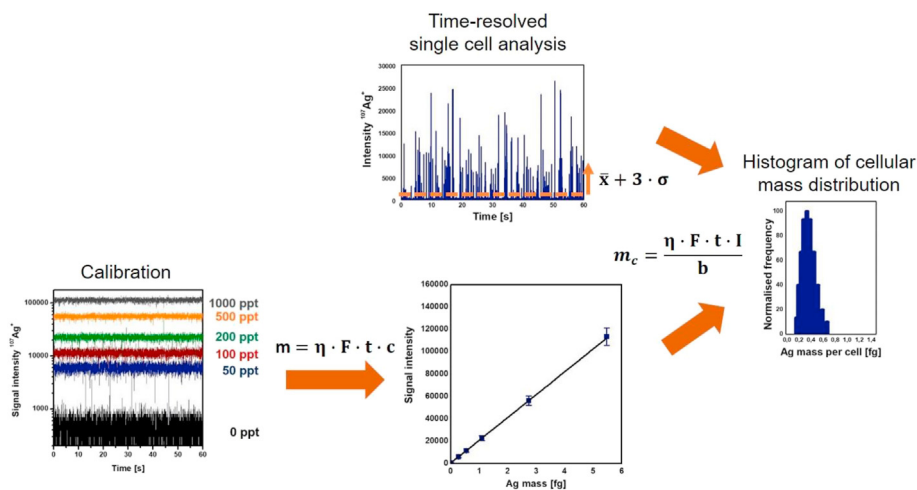


Fig. 2. Typical data evaluation procedure in single cell ICP-MS.

the plasma in a different manner, due to their different physical features (size, shape, robustness, etc.). Therefore, some authors estimate  $\eta$  by comparing the mass of uptake and waste of the sample introduction system [50]. However, this is not a feasible alternative for total consumption sample introduction systems and does not account for solvent losses like evaporation or cell losses due to adsorption within the tubes or the nebulizers during the transport. Other authors approximate  $\eta$  as the transport efficiency of a suspension of a known concentration of nanoparticles [22,40,50]. Due to their much smaller size (usually 30 or 60 nm nanoparticles versus approx. 10  $\mu\text{m}$  cells), their behaviour in the spray is considered to be closer to that of liquid standards.

As more detailed in the following chapter 5, monitoring more than one element in SC-ICP-MS is only possible when using TOF mass analysers. The use of such instruments can increase the certainty to differentiate cell events from signal spikes. In this regard, the CyTOF® technology includes the use of cell markers such as metal DNA intercalators, which can be only present in the signals produced by nucleated cells. Using TOF mass analysers, both intensities and transport efficiencies, can be normalized in every sample by the addition of metal-loaded polystyrene beads [51].

Single cell data are often presented as histograms, in which the frequency of each range of element mass per cell is presented in graph bars or boxplots, where the average, median, quartiles, dispersion and outliers can be visualized in the same graph. In case of multi-dimensional data, like mass cytometry data provided by ICP-TOF-MS or CyTOF instruments, dot plots are mostly used, in which the content of two elements per cell are plotted in a bidimensional graph. For the highly multidimensional data usually obtained in CyTOF, more complex data reduction needs to be applied. The specific challenges that high-dimensional mass cytometry needs to face, and the methods that can be applied to solve them, have been already discussed in the literature [52,53].

Some commercial systems provide dedicated software for data evaluation in single cell analysis, like the Syngistix Single Cell Application Software Module from PerkinElmer or Cytobank, from Fluidigm, to be used with CyTOF instruments.

#### 4. Pneumatic nebulization

During the nebulization process, a liquid sample is turned into a number of droplets of a small size suspended in a gas. Adequate dilution factors of the cell suspension should guarantee that individual cells are introduced into the ionisation source in a time-resolved manner. Pneumatic nebulization uses the kinetic energy from a high-speed gas stream as the driving force to overcome the forces that keep a liquid together, such as surface tension or viscosity. Due to their high robustness, stability, easy-handling and low-cost, pneumatic nebulizers have been most commonly used for ICP-MS analysis, as well as for single-cell-ICP-MS analysis applications. There are different successful combinations nowadays applied for the analysis of individual cells.

##### 4.1. Regular-flow nebulizers and cyclonic or Scott-type spray chambers

Most commonly used nebulizers for most standard ICP-MS applications are concentric pneumatic nebulizers, the so-called Meinhard type. The argon and the liquid sample flows converge at the tip of the nebulizer, where a fine aerosol is produced thanks to the Venturi effect. High transport efficiencies of the aerosol into the plasma can only be obtained upon production of monodisperse and small sized droplets. However, this type of nebulizers produces a large droplet size dispersion. In order to improve the quality of the aerosol before reaching the plasma, spray chambers act as size and

speed filters for the aerosol droplets by removing the largest droplets and equalling their speeds to this of the carrier gas. A variety of spray chambers can be coupled to standard high-flow nebulizers, being the most common the Scott type, cyclonic and single-pass spray chambers.

The sample transport efficiency through the combination of high-flow (sample flow rates between 0.1 and 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) nebulizers and spray chambers is typically lower than 1% [13,54], meaning that 99% of the sample is, therefore, wasted. This is not a significant problem for the analysis of an analyte in solution, or even for coupling with separation techniques, such as HPLC or capillary electrophoresis. However, every cell counts in the case of single cell analysis, especially when valuable biological samples are analysed and the available cell number is limited.

Some of the first studies on the elemental analysis of single cells used such nebulizers in combination with Scott type spray chambers. In 1994, the group of Nomizu used a concentric Meinhard-type nebulizer for the analysis of mammalian cells of 10–20  $\mu\text{m}$  diameter to quantify their calcium content [13]. At the first attempt, they could not obtain any signal, due to the massive loss of cells in the sample introduction system, but after heating the spray chamber to 70°C and neutralizing the surface charge of the cells to prevent the deposition on the chamber, tubes and connections, they could finally obtain Ca signals. Although the limit of detection for calcium with this combination was 0.01 pg, the transport efficiency for the cells was as low as 0.1%. Coupling of a PFA-ST nebulizer to a cyclonic spray chamber did not allow much higher transport efficiencies, with only 0.2% [9].

More recent publications also used a concentric nebulizer coupled to a Scott-type spray chamber [15,55] for the analysis of nanoparticles or trace elements in different types of cells. The authors reported a transport efficiency of around 5%. However, this value is estimated by weight difference after nebulization of water and, therefore, may be lower for the transport of cells, since it does not account for sample losses due to solvent evaporation or deposition on the walls of the glassware. Actually, Sun et al. reported a lower transport efficiency, of only 1%, for the analysis of cobalt in HepG2 and MCF-7 cells with a similar set-up [56].

Slightly higher transport efficiencies of 2–3% were reported by the combination of a MicroMist concentric nebulizer operated at 0.25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and a conical spray chamber with an impact bead [10], which was applied to the quantification of nanoparticle uptake by single human monocytic (THP-1) cells.

##### 4.2. Microflow-based nebulizer systems

Increased transport efficiencies can be achieved by reducing the dimensions of the nebulizer and spray chamber. For this aim, adequate nebulizers for sample flows in the range of  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  have been recently coupled to different spray chambers. Mostly used micronebulizers are pneumatic nebulizers with reduced dimensions in terms of liquid and gas cross section, inner diameter and thickness of sample capillary [57]. By using microflows, the aerosol dispersity is decreased at the same time that the dead volumes and, therefore, memory effects are minimized or removed. On the other hand, micronebulizers are more prone to clogging, limiting their applicability to high salt concentrations and suspensions containing large particles.

Some examples of microflow nebulizers are the microconcentric nebulizer (MCN) and the MicroMist nebulizer (MM). The tip of the sample capillary in the MCN is placed slightly out of the nebulizer, whereas the sample capillary in the MM is shorter than the nebulizer body. Therefore, the MCN produces more monodisperse aerosols than the MM, giving rise to higher signal stabilities and comparable sensitivities to those obtained with conventional

nebulizers, although in the case of micronebulizers sample flow rates 10–40 times lower are used [58].

First elemental analysis of single cells by ICP-MS was performed in 2005 with the aim of monitoring  $U^+$  incorporation into bacteria by using a microconcentric nebulizer, showing the presence of  $U^+$  events concurrent with the presence of bacteria and the possibility of using inorganic standards for calibration [4], with no explicit reference to the transport efficiency. Using a MicroMist nebulizer and a Scott-type spray chamber, Meyer et al. obtained a transport efficiency of 0.5% for the analysis of P and S in single human cancer cells A549 [59]. With the same nebulizer in combination with a single-pass spray chamber, other publications reported about transport efficiencies of 2.9% for human cancer cells [12,60].

One of the highest transport efficiencies using micro-flow nebulizers was obtained by our group for the analysis of cisplatin uptake by single human ovarian cancer cells. The combination of an EnyaMist nebulizer operated at  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and a total consumption low-volume spray chamber allowed for a transport efficiency of 25% for the human cell model A2780/A2780cis [22]. This setup was later applied for the determination of copper in single spores of *Streptomyces coelicolor* [34], but it has to be mentioned that proper aerosol formation required the addition of an organic modifier (10% methanol) to the sample.

Dedicated nebulizers in combination with spray chambers for single cell analysis have been produced in order to overcome the problems of low transport efficiencies mentioned in the previous paragraphs. Most common high-efficiency nebulizers are micronebulizers, which are operated in combination with spray chambers that employ an additional sheath gas flow (argon) in order to prevent cell deposition and increase transport efficiencies.

In this regard, Groombridge et al. developed a high-efficiency pneumatic nebulizer that was named HECIS (High Efficiency Cell Introduction System). Such system consists of a High Performance Concentric Nebulizer (HPCN) and an on-axis, low-volume ( $15 \text{ cm}^3$ ) total consumption spray chamber, which makes use of a sheath gas flow to increase the transport efficiency of the aerosol into the plasma by minimizing the deposition of cells after impacting on the inner walls of the spray chamber [61].

The HPCN has a triple-tube conic structure, with an inner capillary of  $110 \mu\text{m}$  diameter. By using this nebulizer with low sample flows ( $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ), and the addition of a sheath gas flow in the spray chamber, the transport efficiency for the introduction of individual yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) was 75% [61]. The same group later modified their initial design increasing the diameter of the inner capillary from  $110 \mu\text{m}$  to  $150 \mu\text{m}$  and the length of the spray chamber from 10.7 cm to 11.1 cm, while decreasing the inner tube length to 3.2 cm from the initial 4.0 cm. The new design achieved transport efficiencies ranging from 86% up to 108% for different sized cells ( $2.0\text{--}6.4 \mu\text{m}$  mean diameter) [14].

Recent publications have used the HECIS for different biological applications, such as the evaluation of the presence of selenium nanoparticles in selenium-treated yeast cells, both for single cell and single particle measurements [62] and for the detection and quantification of transferrin receptors (TfR1) on the surface of single human breast cancer cells [40]. Transport efficiencies in these studies range from 55% in cancer cells up to 69% for yeast cells.

Based on a similar principle as the HECIS, Perkin Elmer uses a proprietary combination of a high-efficiency micronebulizer and a total consumption spray chamber (Asperon™), both designed for efficient transport of intact cells into the plasma. This system employs an argon nebulizer flow of  $0.35 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  and an additional gas flow of  $0.7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  is tangentially introduced in the spray chamber to improve the cell transport efficiency. The so-called NexION®ICP-MS Single Cell Analysis System from Perkin Elmer was recently

used for the study of the uptake and distribution of gold nanoparticles in unicellular algae of  $20\text{--}30 \mu\text{m}$  diameter. The transport efficiency has been calculated as 31% for certified 60 nm gold nanoparticles and 30% for lanthanide-doped polystyrene beads in this study [17]. Using a similar setup, the Pergantis group studied the arsenate uptake and distribution within a population of unicellular algae. In this case, the Asperon™ spray chamber was fitted to a PFA nebulizer, resulting in a lower transport efficiency of 10%, calculated with 60 nm gold nanoparticles [37].

Another high-efficiency cell introduction system for single cell analysis is commercialized by Glass Expansion under the name of High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS. This system consists of a glass concentric nebulizer that provides a high nebulization efficiency at low sample flow rates ( $15\text{--}45 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) and using a low argon flow rate to minimize damages to cell membranes or walls. The total consumption borosilicate spray chamber uses an additional high argon gas flow that prevents cell deposition and improves sample-to-sample washout times. This novel system is still under evaluation by our and other research groups. Our recently published first results show transport efficiencies up to 70% for bacteria by the use of this system [33].

#### 4.3. Other systems

Trying to improve the often very low transport efficiencies, especially of high- and micro-flow based systems, and due to the lack of commercial systems until recently, some groups have developed their own approaches to attempt single cell sample introduction into ICP-MS.

Shi et al. developed a capillary system for the analysis of mercury in individual tetrahymena [63] by injecting the cell suspension into a capillary in the nebulizer using a syringe pump. They reached a transport efficiency of 10% for this ciliate microorganism. Another group uses a concentric nebulizer and a mini-coaxial chamber preceded by an interesting spiral-helix tubing array for ultrahigh-throughput single cell sampling. With this setup, a transport efficiency of 42% for K562 bone marrow human cells was achieved [64]. The most remarkable figure for this assembly is that it achieves a high single-cell throughput of 40,000 cells per minute by spatially focusing and monodispersing the single cell sample stream in the spiral helix.

The system developed by Cao et al. uses a homemade concentric nebulizer and total consumption spray chamber for the analysis of copper in red blood cells. As the differential point, the cell sample flow is mixed with a higher PBS flow in a flow chamber, which focuses the cells into a  $50 \mu\text{m}$  i.d. capillary. The cells flow through a microscope for inspection prior to injection into the nebulizer. Operated at a total flow rate of  $5.20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , the transport efficiency can reach up to 100% [65].

In a recent publication, an interesting instrumental set-up was presented for on-line purification and analysis of single diatoms [38]. In the most innovative part, they show a novel approach based on on-line coupling of a HPLC system, switching valves and a filter to the SC-ICP-MS, which is applied to automatize the cleaning and measurement of algae samples, avoiding the manual washing steps needed before. The interface between the sample cleaning setup and the ICP-MS is a modified low-flow Teflon and PEEK nebulizer coupled to a cylindrical single pass spray chamber using a sheath gas to improve the transport efficiency. For the same reason, they inserted a customized cylindrical PEEK inlet into the spray chamber to focus the sheath-gas flow and heated the spray chamber. The overall “transport efficiency” of this system was calculated to be 1%, but this included all the washing steps, which would rather correspond to a cell recovery. The actual transport efficiency for the cells of the sample introduction system was, in this case, not shown [38].



#### 4.4. Sample introduction in CyTOF®

The development of SC-ICP-MS occurred simultaneously to this of ICP-TOF(MS). The so-called mass cytometry using a CyTOF® instrument is a special case of multiparametric single cell analysis [66], in which proprietary sample introduction and detection systems from Fluidigm are used. In this regard, the cell delivery system of CyTOF® consists of a glass concentric pneumatic nebulizer which is fitted to a heated total consumption spray chamber. The spray chamber is housed within a heater block, which heats the sample to 200°C while passing through the spray chamber. A make-up argon gas flow is also introduced into the spray chamber, increasing the evaporation of the droplets generated by the nebulizer before they reach the plasma. Typical sample flow rate for this system is 45  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Depending on the instrumental configuration, the sample flow can be delivered either by a syringe pump-based delivery system or an autosampler.

The original prototype of the mass cytometer, which was described by Bandura in 2009 [67] had an aerosol splitter that only allowed to reach the plasma a fraction of the aerosol stream of typically 0.9  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  out of 6  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Such system provided cell introduction efficiencies in the range of 6–10%. However, further improvements in this set-up allowed to eliminate the aerosol splitter, achieving much higher transport efficiencies in the range of 30–40% [68]. The CyTOF® is becoming a standard instrument used for hundreds of biological applications that will be further discussed later in this article.

#### 4.5. Microdroplet generator

Together with the different types of pneumatic nebulizers, the microdroplet generator ( $\mu\text{DG}$ ) is the second alternative for the introduction of single cell suspensions into the plasma. The main advantage of this system is the production of an aerosol consisting of very monodispersed droplets, in which the frequency of droplet production can be easily modified, and their size can be tuned by the use of different hardware configurations. By adequate dilution factors, each microdroplet contains only one particle (nanoparticle, microparticle or cell). Most applications using the  $\mu\text{DG}$  are focused on single-particle analysis, but some groups have also used this system for single-cell analysis.

After the development of a microdroplet system for the analysis of nano- and microparticles by ICP-OES [69], the group of Günther at the ETH improved this initial microdroplet generator and applied it to the analysis of nanoparticles by ICP-MS with transport efficiencies of 100% [70]. With this design, they used a commercial dispenser head, which consisted of a piezoelectric actuated quartz capillary and an internal, annular carrier gas supply. The droplets produced by this system can be controlled in terms of size, velocity and stability by tuning the duration and voltage applied to the piezoactuator, and the droplets could be monitored and sized by a CCD camera with an accuracy of  $\pm 3.4\ \mu\text{m}$ . In order to incorporate a device that allows desolvation after droplet generation (droplets of 30–45  $\mu\text{m}$  diameter), a 35 cm long and 4.0 mm internal diameter tube was vertically fitted after the dispenser head with two additional gas inlets and attached to a T-piece at the bottom, serving as an argon inlet at one side and connected to the ICP torch at the other side. Although the droplet diameter can be slightly tuned in the piezoactuator, bigger differences in droplet size can only be obtained by changing the inner diameter of the quartz capillary in the dispenser head.

Although the microdroplet generator was initially applied to mostly nanoparticle characterization, applications to single cell analysis soon appeared. Only two years after the publication of the ETH group, Shigeta et al. developed an application for label-free

analysis of trace elements in single selenized yeast cells by a double-focussing sector field ICP-MS with 100% transport efficiency [16]. Shortly before that, the same group deeply investigated the coupling of the  $\mu\text{DG}$  to the sector field ICP-MS, including a fast scan mode of the instrument [71]. For the reduction of the droplet diameter, they applied a triple pulse mode to the microdroplet generator, achieving again 100% transport efficiency with smaller droplets of only 23  $\mu\text{m}$  diameter. They achieved, with this setup, limits of detection in the range of attograms for magnesium, iron, manganese, copper, zinc and selenium.

Different modifications of the  $\mu\text{DG}$  have been developed, trying to increase the sensitivity for trace elements in single cells. As an example, a heating/cooling system has been applied to the falling tube, heating the droplets at 200°C and cooling them subsequently, in order to improve the evaporation and removal of the produced water vapour in the cooling step. In this case, the system was characterized by ICP-OES and applied to the elemental analysis of unicellular algae, with increased sensitivities for a number of metals [72].

The  $\mu\text{DG}$  exhibits, however, some disadvantages. Although the droplet size can be slightly tuned by the electrical parameters in the piezoelectric mechanism, if much bigger or smaller sizes are needed (e.g. for the analysis of bigger or smaller cell types) this can be only achieved by the use of different capillary sizes in the dispenser head. This system is also very sensitive to physico-chemical changes in the liquid samples (e.g. salt content, pH, organic solvents), which requires the optimization of the droplets size, shape and velocity for each different sample. These are probably some of the reasons why the number of applications to single cell analysis is still limited. Nevertheless, it is surprising that no applications of the  $\mu\text{DG}$  to the analysis of mammalian cells have been published so far. Unlike yeast or algae cells, most mammalian cells do not have a strong cell wall, making them more prone to be physically disrupted in their way through the dispenser head and the piezoelectric mechanism and during the droplet production itself. Therefore, we believe that the analysis of more fragile cells may be complex and more problematic with these systems.

As an alternative to the conventional  $\mu\text{DG}$ , some microfluidic platforms have been developed, which can be used for single cell manipulation and can encapsulate single cells in microdroplets for their introduction into the ICP-MS [73]. The microdroplet generation in this case is usually achieved by mixing an aqueous suspension of the cells and immiscible organic phases like alcohols, although the amount of this phase is limited by the ICP-MS. Therefore, the interphase between the microfluidic platform and the ICP-MS plays a key role in these systems. Most microfluidic chips for this purpose are made of polydimethylsiloxane (PDMS). The organic phase is usually eliminated before reaching the ICP-MS, either by evaporation while traveling to the plasma, like in the approach of Verboket et al. using a liquid assisted droplet ejection (LADE) [74], or by the addition of an  $\text{O}_2$  gas flow, like in the strategy proposed by Wang et al. [75]. This approach makes use of a micronebulizer to introduce the droplets generated by the microfluidics chip into the plasma. Both systems were applied to the analysis of single mammalian cells. The LADE was used for the quantification of iron content in red blood cells, and the second method was applied to determine the uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. However, the transport efficiencies were only 4.5% and 2.56%, respectively. Other microfluidic systems have been also developed based on glass, Teflon or PEEK, being able to handle higher working pressures, up to 5000 psi. High pressures allow higher frequencies of droplet production of up to 8.3 kHz. This reduces the probability of embedding two cells in one droplet from cell suspensions of  $10^6\ \text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$  at flow rates of 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  to only 0.005%. These type of high-pressure microfluidic systems have

been applied to the quantification of nanoparticles in breast cancer [55] and hepatocarcinoma cells [76]. The characteristics and the applications of the mentioned sample introduction systems are summarized in Table 1.

## 5. Mass spectrometric detection of single cells by ICP-MS

The presented sample introduction systems play a very crucial role in SC-ICP-MS. The quality of obtainable results strongly depends on their performance and their operational control. However, the grade of information that can be obtained from introduced cell suspensions is rather dependent on the type of mass spectrometer (Fig. 1). The commercially available instruments are based on the following technologies: quadrupole analysers (in combination with collision/reaction cells or as tandem-MS, for instance, as a triple quadrupole configuration), double-focussing sector field (allowing enhanced mass resolving power), time-of-flight (for simultaneous detection of various isotopes), and multi-collector

instruments. All of them are well-suited to the analysis of single cells, although - to our best knowledge - the potential of multi-collector MS has been shown neither on the example of single particle detection nor of single cell analysis.

### 5.1. Mass spectrometers for single cell analysis

The performance of the commercially available mass spectrometers for single cell analysis depends on several factors [8]. Probably the most important ones are the sensitivity (limit of detection), the speed of data acquisition (minimum dwell time), and the possibility of monitoring several isotopes/elements simultaneously.

In general, the sensitivity and resolution of sector-field instruments (ICP-SF-MS) is highest at a mass resolution comparable to that of quadrupole instruments. However, the slow hysteresis loops of the internal magnetic fields limit the speed of multi-elemental analysis [77]. Current quadrupole-based mass analysers show slightly lower detection limits than sector-field instruments,

**Table 1**  
Reported experimental conditions, and analytical figures of merit for single cell ICP-MS applications.

Sample introduction system (nebulizer, spray chamber)	Application	Instrument	Dwell time (ms)	Transport efficiency (%)	Threshold criterion	LOD (fg per cell)	Ref.
Meinhard, heated	Ca in mammalian cells	ICP-OES	–	0.1	–	10 (Ca)	[13]
PFA-ST, cyclonic	Mineral elements in human cells	ICP-Q-MS	5	0.2	3 $\sigma$	4 (Fe), 0.6 (Cu), 8 (Zn), 0.3 (Mn), 2800 (P), 800 (S).	[9]
Concentric, Scott-type	Au nanoparticles in single cells	ICP-Q-MS	10	5 <sup>a</sup>	3 $\sigma$	–	[55]
Concentric, Scott-type	Trace elements in yeast cells	ICP-Q-MS	0.1	5 <sup>a</sup>	3 $\sigma$	1.68 (K), 0.29 (Mg), 0.17 (Zn), 0.01 (Mn), 0.02 (Cu)	[15]
Concentric, Scott-type	Co in human cells	ICP-Q-MS	10	1	3 $\sigma$	–	[56]
MicroMist, conical with impact bead	Nanoparticles in human cells	ICP-SF-MS	0.1	2–3	3 $\sigma$	0.686 (Ag)	[10]
Microconcentric	U in bacteria	ICP-SF-MS	4	–	–	–	[4]
MicroMist, Scott-type	As, P, S in human cells	ICP-TQ-MS	3	0.5	3 $\sigma$	0.35 (As)	[59]
MicroMist, Scott-type	Nanoparticles in human cells	ICP-Q-MS	5	2.9	–	–	[12]
EnyaMist, total consumption	Cisplatin in human cells	ICP-Q-MS	10	25	3 $\sigma$	–	[22]
EnyaMist, total consumption	Cu in spores of bacteria	ICP-TQ-MS	1	–	3 $\sigma$	0.09 (Cu)	[34]
HECIS (primitive)	Yeast	ICP-Q-MS/ICP-TOF-MS	10/1	75	–	–	[61]
HECIS	Different cells	ICP-Q-MS	0.05–10	86–100	–	–	[14]
	Nanoparticles in yeast	ICP-TQ-MS	5	69	4 $\sigma$	0.16 (Se)	[62]
	Labelled marker in human cells	ICP-TQ-MS	5	55	3 $\sigma$	–	[40]
MCN, Asperon™	Gold nanoparticles in algae	ICP-Q-MS	0.05	30	–	0.006 (Au)	[17]
PFA, Asperon™	Arsenate in algae	ICP-Q-MS	0.05	10	Poisson statistics	–	[37]
GE <sup>b</sup>	Human cells, yeast	ICP-TQ-MS	5	50–95	3–5 $\sigma$	–	[88]
Capillary system	Microorganism	ICP-TQ-MS	3	10	3 $\sigma$	3.8 (Hg)	[63]
Concentric, mini-coaxial. 3D-spiral helix tubing array	Human cells	ICP-TQ-MS	1	42	3 $\sigma$	–	[64]
Homemade, total consumption. Online dilution	Cu in red blood cells	ICP-Q-MS	0.1	100	3 $\sigma$	0.043 (Cu)	[65]
Low-flow, single pass with sheath gas	Algae	ICP-Q-MS	5	1 <sup>c</sup>	–	–	[38]
Concentric, heated total consumption (CyTOF, improved)	Polystyrene beads <sup>d</sup>	CyTOF	–	30–40	–	–	[68]
Microdroplet generator	Trace elements in yeast	ICP-SF-MS	0.1–1	100	–	0.0057 (Na), 0.0011 (Mg), 0.120 (Fe), 0.01 (Cu), 0.0014 (Zn), 0.04 (Se)	[16]
Microfluidics chips	Nanoparticles in human cells	ICP-Q-MS	10	4.5	–	–	[74]
Microfluidics chips	Nanoparticles in human cells	ICP-Q-MS	5	2.6	3 $\sigma$	–	[75]

<sup>a</sup> Estimated by weight difference.

<sup>b</sup> GE as abbreviation from Glass Expansion, the producer of the High Sensitivity Single-Cell Sample Introduction System for ICP-MS.

<sup>c</sup> Cell recovery from the whole process.

<sup>d</sup> CyTOF® is used for a high number of applications on different types of human cells, but the transport efficiency was calculated here for calibration polystyrene beads.

and are equipped with collision/reaction cells to remove spectral interferences. These instruments are simpler in terms of handling and maintenance. Commercially available quadrupole-based ICP-MS instruments can have lower dwell times down to 25  $\mu\text{s}$ , whereas ICP-SF-MS can go down to 10  $\mu\text{s}$  with excellent detection limits as shown recently for single particle ICP-MS [78]. These features make these instrumentations, in general, feasible for monitoring several data points within an individual cell event. In both types of instruments, data acquisition is sequential, meaning that only one isotope can be measured in single cell experiments due to the very fast transient signals obtained from one event.

On the other hand, both multi-collector and time of flight mass analysers principally allow a simultaneous multi-isotopic analysis. However, multi-collector systems have not been used for single particle or single cell analysis so far, although, depending on the detector configuration, they might reach excellent detection limits for various elements. For time of flight (TOF) mass spectrometers, some authors precisely write about *quasi-simultaneous* measurements because the instant of the arrival of the ions to the detector depends actually on their mass, although the ions were sampled simultaneously in the plasma. The time resolution of TOF mass analysers is also very high (in the low  $\mu\text{s}$  range), allowing the acquisition of the whole mass spectrum within very short time. The importance of this feature for single cell analysis will be discussed in the next section. However, the sensitivity of TOF instruments is between one and two orders of magnitude lower than for the case of quadrupole or sector field instruments [79].

## 5.2. The influence of time resolution (dwell time)

It has been reported that the general duration of a particle event in the plasma is about 0.5 ms [80,81]. Therefore, the use of dwell times in the order of milliseconds causes the particles or, in the present case, cells, to be detected as pulses. However, when the dwell times are shortened to the range of 100  $\mu\text{s}$  or below, the cells can be detected as transient signals, with several data points defining the shape of the peak and this would even open the possibility to detect more than one isotope in the same event [82,83]. Besides the effects on the peak integration, dwell time also has an obvious influence on particle counting, since shorter dwell times decrease the possibility of counting two or more cells within the same event. This effect contributes at the same time to increase cell throughput that is principally limited by the duration of the event.

When measuring in single cell mode, the plasma polyatomic interferences and dissolved ions in the sample contribute to the continuous background signal. A higher background signal hinders the detection of the events with a lower mass of the analyte, increasing the size detection limit in single particle, or mass detection limit in single cell mode [84]. As the dwell time is reduced, the signal/noise ratio improves as the contribution of the background to the event signal decreases. This in turn facilitates the discrimination of cellular events from the background. A more detailed discussion about the effect of the dwell time in single particle ICP-MS can be found elsewhere [85]. Abad-Álvarez et al. showed that the dwell time is also correlated with the uncertainty of the data, while this dependence disappears at dwell times below 100  $\mu\text{s}$  [83]. The effect of all these factors on the detection of single cells was shown by Miyashita et al. for the quantification of  $^{31}\text{P}$  in unicellular algae, comparing dwell times between 0.5 and 10 ms [14]. In this publication, the authors suggested to increase from 1 to 3.4 data points per event when decreasing the dwell time, decreasing the probability of having two cells in the same time window from 1.8% to  $4 \cdot 10^{-5}\%$  and increasing the signal/noise ratio between 12.9 and 22 times.

Excluding multi-collector ICP-MS, double-focussing sector-field ICP-MS might be superior in terms of achievable detection limits and sensitivity. Shigeta et al. have reported detection limits in the attogram range for several constitutive elements like sodium, magnesium, and zinc [16]. Shortest dwell time was 100  $\mu\text{s}$  that allows to detect only one isotope within a single event produced by the introduction of an individual cell. This limitation affects also the quadrupole-based ICP-MS instrumentation that can offer dwell times down to 10  $\mu\text{s}$  [86]. Dwell times at this lower level would principally allow the monitoring of more than one isotope during the event of the detection of an individual cell. But in fact, the stabilisation time of quadrupole filters during the jump from one  $m/z$  to another restricts this feasibility, so that - to our best knowledge - approaches using quadrupole mass spectrometer have been so far restricted to the measurement of one isotope in a single cell experiment. Some of the achievable detection limits are given in Table 1 and are usually in the sub-fg and low fg level depending on the element monitored. The triple quadrupole systems have basically the same limitations as the single-quadrupole systems in terms of dwell times and the lack of multi-isotopic simultaneous detection, although most of them have improved the sensitivity compared to their single-quadrupole equivalents. However, the main advantage of triple-quadrupole systems remains on interference removal, improving the access to otherwise heavily interfered analytes.

The restriction to monitor merely single isotopes can be overcome by the use of time-of-flight mass analysers. The entire mass spectrum is nowadays scanned within a time scale of  $\mu\text{s}$ . This technique, therefore, allows the measurement of several isotopes and elements within a single cell event with approximately 20 data points per isotope and cell. This is a unique feature that makes time-of-flight instruments superior to the others discussed above. On the other hand, lower detection sensitivities are expected. Günther's group reported about a sensitivity of 60,000 cps per  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the detection of uranium [87], that is about 10-fold lower than the one observed in nowadays quadrupole instruments.

## 6. Applications of pneumatic nebulization with ICP-MS detection for single cell analysis

As reflected in the previous sections, the continuous instrumental advances in the SC-ICP-MS field have allowed to apply it in a wide variety of scientific fields. Up to now, these applications can be organized according to the object of study: constitutive elements and cellular models to address elemental exposure, metallodrugs uptake, nanoparticles in cells and cell biomarkers, in this latter case, including the use of metal labelled antibodies.

### 6.1. Constitutive elements and evaluation of exposure

The accurate elemental analysis of trace elements at cell level is of vital importance to understand several biological processes as metabolism, anti-oxidation, gene expression, signalling and cancer cell growth [65]. This is partly due to their structural and catalytic functions in proteins and enzymes, such as zinc-containing DNA and RNA polymerase, and in other structures, such as phosphorus in phospholipid membranes or ATP. Also, the determination of the concentration of certain elements is essential to study their toxic effects in living organisms [61].

Regarding constitutive elements, most abundant literature is focused on the analysis of yeast cells for the stability reasons explained in the previous section. In this sense, Groombridge et al. performed a trace elemental analysis of single yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae*, with a high performance concentric nebulizer (HPCN), being able to detect events for Mg, P, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn

[61]. In the same year, Shigeta et al. analysed yeast cells using a  $\mu$ DG for sample introduction, obtaining signal intensities from individual cells for Cu, Zn, and Se [16]. In 2019, the group of Liu et al. employed a concentric nebulizer to successfully determine the content of K, Mg, Zn, Mn, and Cu in single *Saccharomyces cerevisiae* cells using dissolved metal standard solutions for quantification. As an attempt to obtain quantitative data, the authors compared the average contents of the elements in single cells with the concentrations obtained through conventional ICP-MS after cell digestion, finding a good agreement between both sets of results and proving the reliability of the technique [15].

As yeasts can be enriched with specific nutrients to be used as yeast-based food supplement, a recent publication deals with the analysis of chromium and selenium enriched yeast samples in order to demonstrate the intracellular incorporation of these elements by SC-ICP-MS and serves, in this way, as a fast tool for the control of this type of products. For this, the total number of cells was determined with a high sensitivity sample introduction system by measuring an ubiquitous present element, phosphorus, and then compared with the number of selenium or chromium detected events [88].

Other examples of the use of single cell ICP-MS for the analysis of microbial origin samples were the cyanobacterium *Synechocystis*, the red algae *Cyanidioschyzon merolae* and *Galdieria sulphuraria*, the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*, the eukaryotic protozoon *Tetrahymena malaccensis* and the bacteria *Streptomyces coelicolor*. The first four ones, together with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, were analysed by Miyashita et al. [14] using a large-bore high performance concentric nebulizer, achieving the detection of Mg, Al, P, S, K, and Mn in *Synechocystis*; C, Mg, P, S, Mn, and Zn in *Saccharomyces cerevisiae*; C, Mg, P, S, K, Mn, and Zn in *Cyanidioschyzon merolae*; C, Mg, P, Ca, Cr, Fe, and Mn in *Galdieria sulphuraria* and C, Mg, Al, P, S, Mn, and Zn in *Chlamydomonas reinhardtii*.

The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was also used by Mavrakis et al. [37] to evaluate the uptake of arsenate in cells and its toxic effect on the membrane lipid profile employing a PFA nebulizer. Single-cell-ICP-MS allowed to evaluate the arsenic mass distribution within the cell population (log-normal), the most frequently contained arsenic mass per cell (1.5–1.8 fg As per cell), the mean arsenic uptake value (ranging from 2.7 to 4.1 fg As) and the differentiation of the arsenic present in and/or adsorbed on the cells from the one present in the extracellular solution.

A different unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, was also employed as a model for the quantitative determination of metal contents in algal cells with a V-groove nebulizer [19]. Due to the high abundance of magnesium in this type of algae cells as an essential constituent of chlorophyll, this element was used as a cell marker. Manganese and copper were also detected in the same cells, and the determination of chromium uptake after incubation of the algae with an aqueous standard of the element was also evaluated.

*Tetrahymena malaccensis*, an unicellular eukaryotic protozoon, plays an essential role in the bioaccumulation of mercury, so it was analysed by Shi et al. in order to track mercury in individual cells using a homemade capillary online system [63]. The protozoon was exposed to four different  $Hg^{2+}$  concentrations finding that the accumulated Hg showed a very high variation from cell to cell, and that the difference was more significant at higher exposure concentrations. The average Hg content was compared with that obtained by traditional analysis showing a relatively good consistency.

Finally, the *Streptomyces coelicolor* bacteria was analysed by González-Quinónez et al. in order to obtain information about the specific mechanisms buffering cytosolic copper and the biochemical pathways modulated by the element [34]. In this work,

cytosolic copper in single spores was quantified employing a microflow nebulizer EnyaMist, which helped to extract the conclusion that this metal modulates asynchronous germination.

More challenging, as previously mentioned, is the analysis of mammalian cells using pneumatic nebulization. However, the technique has been applied to the determination of elements in human cell lines. In 2015 Wang et al. [9] determined the contents and distribution patterns of Fe, Cu, Zn, Mn, P, and S in two types of cancer cell lines, human cervical carcinoma (HeLa) and human lung epithelial carcinoma (A549), and a non-carcinogenic line, human bronchial epithelial cells (16HBE), employing a concentric PFA-ST nebulizer. The obtained mass of Fe, Zn, Cu, Mn, P, and S in individual HeLa cells, by using standard solutions for calibration, was significantly higher and the range of values was broader than in individual 16HBE and A549 cells, in fact 16HBE cells showed the most homogeneous distribution of Cu, Zn, P, and S. This evidenced that tumour cells generally require larger concentration of the analysed elements than non-tumoral ones to sustain their growth and proliferation and that the differences between elemental distribution patterns can be used to differentiate among normal and tumour cells.

The same group repeated the analysis of the same cell lines but in this case including one more measured element, cobalt, and employing a d-CMN nebulizer. In this attempt, in addition to the variation of the masses of Cu, Fe, Zn, and P in individual HeLa cells, the analysis showed a variation of Fe, Zn, and P in individual A549 cells, evidencing element subpopulations in cancer cell lines, specially HeLa. The normal 16HBE cells maintained their homogeneity in the masses of the measured elements except for Zn [89].

Wei et al. [11] used HeLa and MCF-7 cell lines to investigate the levels variation and distribution patterns of chromium species in cells when cultured either in a Cr(III) or Cr(VI) enriched medium with a V-groove nebulizer. The selection of these species of chromium was based on their abundance in the environment and the considerations of Cr(III) as being toxic at high levels and Cr(VI) as highly toxic and carcinogenic to human beings.

Finally, two recent studies focussed their analysis on cells of human origin. In one, the quantitative analysis of arsenic in human epithelial lung adenocarcinoma cells (A549) after incubation with arsenite at increasing exposure times was assessed. This quantification at cell level, using a MicroMist nebulizer, was carried out applying an external calibration with arsenic standard solutions. The advantage of the procedure, in addition to knowing the cell-to-cell variability in the uptake of As, was the direct analysis of the cells after re-suspending them in water, avoiding the normal cell membrane permeabilization caused by cell fixation methods and, thereby, minimizing the loss of cytosolic metal [59].

In the second one, the copper content in human red blood cells was evaluated with a customized nebulizer. The single cell experiment provided a range of 0.20–0.40 fg of copper per cell, which, compared with the mean content obtained by microwave digestion (0.266 fg/cell), showed the difference between single human red blood cells and demonstrated the reliability of the method [65].

## 6.2. Uptake of metallodrugs

The success of the platinum-based anticancer drug cisplatin is undeniable, however, a lot of active research is still put on understanding its cell uptake and resistance mechanisms derived from its use. Therefore, the study of the cellular uptake of drugs and, specially, metallodrugs, at single cell level for the elucidation of drug action, drug safety, and drug resistance is highly important.

In this regard, some studies were published already in 2011 by Tsang et al. [90] demonstrating the determination of the metal content in *Helicobacter pylori* after treatment with the bismuth-based drug CBS (colloidal bismuth subcitrate). The single cell

technique with a microconcentric nebulizer was employed in the monitoring of intact cells by tracking magnesium. The time- and dose-related bismuth uptake after CBS treatment were evaluated by SC-ICP-MS, too. For the study of the kinetics, cells were cultured in  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  Bi and measured at different incubation times. A linear increase in the accumulation of Bi for  $[\text{CBS}] < 20 \mu\text{g mL}^{-1}$  that then gradually reached a maximum was observed.

Regarding cisplatin, Zheng et al. [60] determined the intracellular content of this chemotherapeutic drug and a new nanomaterial anti-tumour agent,  $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$ , in HeLa and 16HBE cells after 2 h and 24 h treatment using a microconcentric nebulizer MicroMist. The data obtained by SC-ICP-MS showed the difference in the response and intracellular content of the, in principle, equal cells of Gd when compared to Pt under the same exposure dose or time. For example, for HeLa cells treated during 24 h with  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  cisplatin and  $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$  the content of Pt ranged between 0 and 2.5 pg, and the Gd between 0 and 25 pg. This indicated that  $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$  caused less cytotoxicity *in vitro*, making possible the tumour inhibition at a lower dose, and demonstrating that the anti-tumour mechanisms of these two drugs were different.

Another study incubating cisplatin with different cell lines was carried out by our group. The determination of intracellular Pt concentration as a biomarker of cisplatin resistance was carried out in resistant and sensitive cell lines (A2780cis and A2780) with an EnyaMist nebulizer. Both cell lines were exposed to two different cisplatin concentrations resulting in a great difference in the mass of Pt per cell between sensitive and resistant lines. This revealed the potential of the technique to differentiate between cell lines of different sensitivity to the drug for medical interests. In addition, the sensitive cells showed a more heterogeneous distribution of the platinum contents than the resistant type, indicating the possibility of a resistance mechanism associated to an inhibition on the drug influx [22].

Arsenic, as the basis of arsenic drugs to treat specific types of cancer was also investigated by Zhou et al. [91]. They studied the cytotoxicity of  $\text{As}_2\text{O}_3$  applied a metallodrug in the treatment of acute myelocytic leukaemia in single leukaemia cells (NB4 and HL60) employing a microconcentric nebulizer. First of all, they determined the arsenic concentration in individual cells after treatment, with the finding of differential intracellular arsenic contents upon exposure to higher arsenic concentrations in the culture medium. Also, it was observed that NB4 cells accumulate more arsenic than HL60, indicating a higher sensitivity to the drug.

The same group employed arsenic trioxide and another arsenic-based drug, ZIO-101, to evaluate their uptake in single NB4 and HL60 cells across the cell cycle with a glass concentric nebulizer [92]. After treating the cells with a double thymidine block for cell cycle synchronization, they were allowed to grow in the culture medium and treated with  $\text{As}_2\text{O}_3$  or ZIO-101 at different times, corresponding to the different phases of the cell cycle G1, G1, S, S, G2/M and G2/M. The intracellular arsenic contents monitored by SC-ICP-MS showed that the cells treated with either of the drugs absorbed arsenic mostly in G2/M and G1 phases and the least amount in the S phase, proving the cycle dependent therapeutic efficiency of arsenic drugs.

Curcumin is another universal anticancer agent, that was proved to exert a better anti-tumour activity by including it in a cobalt complex ( $[\text{Co}(\text{tpa})(-\text{cur})](\text{ClO}_4)_2$ ). Sun et al. [56] studied the cellular uptake and excretion of this complex in HepG2 and MCF-7 cells by monitoring Co to elucidate the transport and metabolism process of the drug in cancer cells. In the case of HepG2 cells, the uptake level of the complex was shown to increase with rising concentrations of the drug in the culture medium until a certain concentration threshold at which the increase slowed down. The excretion,

investigated by measuring the Co level remained in the culture medium after cell incubation, exhibited a similar trend as that for its uptake with further increase of the concentration of the complex. This indicated that in the uptake and excretion of the drug probably analogous cell membrane components are involved.

### 6.3. Nanoparticles in cells

In the same way as constitutive elements, the analysis of nanoparticles in cells is usually carried out in bulk by taking a number of cells, conducting a digestion in acid media and giving the results as an average of the cell population. In this way, information about the heterogeneity of the cell population is lost and the transformations and real exposure concentrations of the nanoparticles are not taken into account. These issues can have an important role in the interpretation of toxicity data and in the understanding of the dose-response relationship, and thus, make necessary the use of an appropriate methodology with the ability to quantify internalized cellular concentrations of nanoparticles.

Gold nanoparticles are the most studied nanoparticles by this technique as the evaluation of their uptake is critical in drug delivery studies, cell/tissue imaging and quantitation analysis of biomarkers in cells.

The distribution and determination of internalized or bound to the cell wall gold mass in *Cyptomonas ovate* alga after both, nanoparticle and dissolved metal exposures, was carried out by Merrifield et al. using a NexION 350 D ICP-MS [17]. The results showed that the percentage of cells containing the nanoparticles (60 nm) increased with exposure time and initial Au NP concentrations, as occurred with dissolved gold, being 40–50% at the highest exposure conditions. However, in contrast to the dissolved form, under proportional mass exposure conditions, a higher percentage of the cell population accumulated gold in the particulate form, an indication of a more rapid uptake or slower elimination of the NPs. SC-ICP-MS also allowed to quantify the number of cells containing multiple nanoparticles per cell, being the probability of this increased with an increase in the initial nanoparticle dose.

The quantification of the uptake of gold nanoparticles was also carried out in individual MCF-7 cells at increasing incubation times employing a MicroCross droplet generator. The single cell analysis indicated a higher signal intensity of Au when the incubation time increased and a significant discrepancy of the number of nanoparticles among the individual cells cultured at identical conditions. Using a suspension of nanoparticles as a calibration standard was possible to calculate the number of nanoparticles per cell, falling into a range of 130–584 per MCF-7 cell [55].

The same group studied the uptake of gold nanoparticles in human leukemic cells (K562) employing a spiral-helix tubing array single-cell focusing system with a concentric nebulizer. The cells were incubated at increasing concentrations of the nanoparticles, obtaining gold events of higher intensity as the incubation concentration increased. Also, as the incubation concentration increased, the distribution of the nanoparticles in cells tend to be variable. This observation indicated the heterogeneity of Au content in individual cells, corresponding to different behaviours in the cellular uptake of AuNPs (different cell-division cycle or cell physiological states) [64].

Wang et al. [75] evaluated the uptake of two modified gold nanoparticles (Au NPs@citric acid and Au NPs@DNA) of different sizes, 15, 30 and 60 nm, in single HeLa cells using a PFA microflow nebulizer. By measuring Zn as a cell marker, it was possible to calculate the percentage of cells containing nanoparticles. This uptake grew at increasing incubation times and concentration and, for nanoparticles with the same size, the uptake was greater for Au NPs@DNA at low concentrations and short incubation times while

at higher concentrations and incubation times the uptake was greater for Au NPs@citric acid. This indicated that the surface modification influenced the cellular uptake and that the internalization pathway of both kind of nanoparticles should be different, founding that clathrin-mediated endocytosis was the major internalization pathway for 15 and 30 nm Au NPs@DNA. The distribution of the number of incorporated Au NPs in single HeLa cells also showed differences depending on the kind and size of nanoparticle employed. These differences could be explained in terms of nature of the modification, aggregation and hydrodynamic diameters.

The same group also used ZnO nanoparticles to study their incorporation in single HepG2 cells and as standards for Zn quantitation. They found that the mean incorporation of Zn per cell was 21.7 fg, similar to the one obtained by an acid digestion (25.0 fg per cell), and that there were four different concentration levels of Zn in HepG2 cells, which represent cells without ZnO NPs (71%) and cells incorporating/adsorbing one, two or three ZnO NPs (29%). These results exhibited the heterogeneity of HepG2 cells in the uptake/adsorption of ZnO NPs and so the different characteristics of individual cells [93].

In the same way, other studies centred their attention in silver nanoparticles. López-Serrano et al. [10] evaluated the cellular incorporation of 50 nm silver nanoparticles in human THP-1 monocytes and their differentiated macrophages using 0.1 and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nanoparticle concentrations for 4 h and 24 h. Employing a MicroMist concentric nebulizer and suspensions of silver nanoparticles for calibration, it was possible to perform a quantitative analysis of the nanoparticles and determine the number of particles per cell. The results showed a minimal nanoparticle uptake by the monocytes when exposed to the lower incubation concentration whereas a higher and time-dependent uptake was observed for the higher one. The macrophages, on the contrary, showed a much higher nanoparticle uptake dependent, in this case, on exposure concentration but not on time.

Yu et al. [76] evaluated the uptake of ionic and nanoparticulated (51 nm) silver in single HepG2 cells using a Burgener Ari Mist HP nebulizer and silver nanoparticles for quantitation and evaluation of the methodology. The cells were incubated using 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ag<sup>+</sup> or AgNPs from 6 h to 24 h obtaining a higher cell-to-cell variability and uptake of silver for cells incubated with nanoparticles (6.1  $\pm$  0.6 fg and 7.6  $\pm$  0.9 fg, respectively). The percentage of cells incorporating Ag could be calculated by monitoring the constitutive element Zn, resulting in an almost 100% incorporation for both forms of silver at the different incubation times. Moreover, with SC-ICP-MS, in contrast to acid digestion methodology, was possible to eliminate the influence of silver chloride precipitates and AgNPs aggregation on cell detection that in other way would be detrimental for the silver quantitation.

Other nanomaterials like quantum dots, semiconductor nanocrystals of a few nanometres in diameter with unique optical and electrical properties, were also employed to study their incorporation in cells. Zheng et al. [12] assessed the uptake kinetics of 7 nm carboxyl CdSe quantum dots in Raw 264.7 cells by incubating them at a concentration of 30 nmol L<sup>-1</sup> during 2 h and 12 h employing a MicroMist concentric nebulizer. The number of quantum dots per cell was estimated monitoring cadmium and employing standards of the element and the results of the uptake kinetics study showed that the uptake of QDs gradually increased for the first 8 h and reached a plateau between 8 h and 12 h.

In addition to synthetic nanoparticles, biogenic ones have been also detected in cells but, in this case, there is a lack of studies in which SC-ICP-MS have been used for their determination. An example of a study in which the technique is employed as a preliminary detection of the nanoparticles is the one carried out by our group recently [62]. In this work, the presence of selenium-

containing nanoparticles in *Saccharomyces cerevisiae* was first addressed using single cell ICP-MS with a High Performance Concentric Nebulizer (HPCN). Once the intracellular selenium incorporation was checked, a mechanical lysis of the cells and a single particle ICP-MS detection were performed to prove the presence of the nanoparticles with the help of liquid chromatography coupled to ICP-MS to cover a wider range of particle sizes. The results showed that one of the analysed samples contained dispersed elemental selenium nanoparticles with sizes up to 250 nm and that the certified reference material SELM-1 contained spherical SeNPs of 4–7 nm [62].

#### 6.4. Cell biomarkers

A biomarker can be defined as a characteristic protein, gene, or small molecule that can be objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological or pathogenic processes. The analysis of biomarkers and, especially, at the single cell level is so important, because it can contribute to a correct classification of a disease, which may lead to a better selection of personalized therapies.

In this sense, single cell ICP-MS have been used for a variety of studies. Among them, Zhou et al. [91] who evaluated the exposure of leukaemia cells to As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, the authors evaluated also studies on apoptosis and cell differentiation using two lanthanide tags (DOTA-Nd and DOTA-Dy, respectively, were conjugated to a cell protein related with apoptosis, Annexin-V, and to other related to differentiation, anti-CD11b antibody). By measuring Nd (Annexin-V) and Dy (CD11b) is possible to evaluate the apoptosis and differentiation status by ICP-MS that can be also correlated with the As exposure.

Our group [40] also developed a strategy based on Nd-labelled antibodies and single cell ICP-MS detection with a high performance concentric nebulizer (HPCN) to quantify the transferrin receptor 1 (TfR1), a cancer biomarker, present in the cell membrane of breast cancer cell lines with different malignancy, MCF-7 and MDA-MB-231 (most malignant phenotype), at different expression levels. The detection was carried out by monitoring phosphorus as cellular marker and neodymium as TfR1 marker after tagging the antibody specific for such receptor with this metal. Using Nd standard solutions to quantify the mass of Nd per cell and knowing the stoichiometry of Nd atoms per antibody it was possible to convert the Nd mass per cell into number of receptor molecules per cell.

Liang et al. [94] applied single cell ICP-MS in combination with europium tagged antibodies for counting, and five different lanthanide tagged polyclonal antibodies for simultaneously recognizing bacterial cells from five typical bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella dysenteriae*, and *Vibrio parahaemolyticus*). Moreover, the developed approach was applied to show the different behaviour between genetically identical *Staphylococcus aureus* under the treatments of vancomycin and Ag nanoparticles.

However, the analysis of single biomarkers does not provide enough sensitivity and specificity for diagnosis and disease prognosis when measured on its own. Due to this, a technique capable of simultaneously detect multiple biomarkers in individual cells is needed. This technique is known as mass cytometry, which is essentially an ICP-MS with a time-of-flight detector in combination with the use of antibodies linked to rare earth metals through metal chelating polymers as reporters in conjunction to the previously described sample introduction system [67]. Since many available stable isotopes can be used in the tags, up to 100 biomarkers can potentially be detected simultaneously in individual cells, avoiding the spectral overlap problems associated to the traditional fluorescent detection and thanks to the multiple isotope detection capabilities of TOF-MS.

One of the first studies applying this technique was carried out by Bandura et al. [67]. They performed the analysis of the expression levels of 20 antigens in human leukaemia model cell lines, immature myeloid (KG1a) and B-lymphoblastoid (Ramos), and five myeloid leukaemia patient samples employing lanthanide-tagged antibodies. The antibodies, labelled with MAXPAR® element tags, were selected against myeloid and lymphoid markers and non-lineage and differentiation ones. The results showed that KG1a cells displayed an immune phenotype similar to that of primitive hematopoietic stem cells whereas Ramos cells were considered representative of immature B-cells. For the five myeloid leukaemia patient samples three exhibited immunophenotypes representative of monoblastic myeloid leukaemia and two of monocytic one.

Another study involving Ramos cells was the one of Zhang et al. [95]. They developed antibodies tagged with tantalum oxide-based nanoparticles (TaO<sub>2</sub>-PEG2k-goat anti-mouse, TaO<sub>2</sub>-PEG2k-CD25, TaO<sub>2</sub>-PEG2kCD196) and applied them for the detection of high and low abundance biomarkers.

Bodenmiller et al. [96] focused their study on human peripheral blood mononuclear cells (PBCMs) using a mass cytometer and applying a mass-tag cellular barcoding approach. In this approach, eight samples of PBCMs from different donors were combined after tagging each one with a unique combination of mass tags and analysed in a single run, increasing mass cytometry throughput. The samples were arrayed in a 96-well plate and multiplexed with seven tags allowing the characterization of the cells in terms of signalling dynamics and cell-to-cell communication, signalling variability responses between different donors, and the effects of 27 kinase inhibitors on 14 PBCM subpopulations.

Related to blood cells, Majonis et al. [97] performed the single cell analysis of whole umbilical cord blood stained with a mixture of 11 metal-tagged antibodies using a self-developed metal-chelating polymer, P(DTPA)-maleimide. The polymer was used to label the 11 antibodies with different lanthanide isotopes, allowing the phenotypic analysis of the major cell types found in human umbilical cord blood (lymphocytes, granulocytes, monocytes, and subsets of CD3 T-cells and B-cells) in a single mixture.

Other groups that centred their research in immune cells were the ones of Bendall, Newell and Yang. Bendall et al. [66] applied mass cytometry to monitor 13 surface and 18 intracellular epitopes with antibodies conjugated to transition element isotope reporters in order to identify immune cell types and interrogate intracellular signalling biology in healthy human bone marrow. The signalling dynamics of these 18 intracellular epitopes were examined in response to *ex vivo* stimulation conditions that have prognostic value in leukaemia, lymphoma, and myeloproliferative disorders.

Newell et al. [98] analysed human CD8<sup>+</sup> T cells, cytotoxic lymphocytes that directly kill infected or aberrant cells and secrete proinflammatory cytokines, in order to probe the relationships between surface marker phenotypes, functional capacities and antigen specificities. For it, 17 variably expressed cell surface markers were studied together with nine functional attributes, including cytokines, and metal-labelled peptide-MHC tetramers were used for the identification of antigen-specific T cells.

Yang et al. [99] studied simultaneously the incorporation of AuNPs and the expression levels of a series of cellular proteins in different cellular types from mouse lung tissue using lanthanide-marked antibodies. The results allowed the identification of each cell and the *in vivo* quantification of the Au content per cell, being it different for alveolar macrophages, dendritic cells and B/T cells. Moreover, the biodistribution of the particles in lymph nodes was carried out, evidencing a great particle accumulation in myeloid dendritic cells.

Finally, Chang et al. [100] used a mass cytometer to evaluate cisplatin uptake into individual pancreatic (BxPC-3) and cervical

(ME-180) cancer cells in combination with the measurement of the incorporation of 5-iodo-20-deoxyuridine into DNA, to quantify the distribution of drug within tumour tissue and its effect on growth kinetics, and the determination of the 2-nitroimidazole probe EF5, an indicator of tumour hypoxia. Using clinically relevant doses, the uptake of cisplatin and 5-iodo-20-deoxyuridine was readily detected monitoring platinum and iodine, showing the results an inverse relationship of both compounds in both cell lines and higher Pt levels in ME-180 cells.

## 7. Conclusions

Single cell ICP-MS has opened a novel field of research with a large projection in other fields like biology or biotechnology. A wide number of applications have demonstrated its feasibility and usefulness in studying the mass distribution of constitutive elements, concentrations of elements after external uptake of metalloids or nanoparticles as well as the well-recognised potential in the study of cellular biomarkers. However, to the best of our knowledge, we are only seeing the top of the iceberg and we foresee a bright future to the technique. The current developments and the general status clearly demonstrate that single cell ICP-MS is expected to become soon a routine tool in order to support advances in biology, medicine, and pharmacology on the cellular level. However, multiple and simultaneous element/isotope monitoring while maintaining high sensitivity and fast scanning capabilities are the key aspects to address over the next years to make it real.

## Declaration of competing interest

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

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from Spanish Ministry for Science, Innovation and Universities (CTQ2017-83569-C2-1-R, RTI2018-094605-BI00) and FICYT (Foundation for the Promotion of Applied Scientific Research and Technology) in Asturias, FC-GRUPIN-IDI/2018/000242). M. Corte-Rodríguez acknowledges the financial support from the Instituto de Salud Carlos III through a Sara Borrell contract (CD19/00249). R. Álvarez-Fernández acknowledges his fellowship from FINBA (Foundation for Biosanitary Research and Innovation of the Government of Asturias). Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany, and Teledyne Cetac Technologies, Omaha, NE, USA, are kindly acknowledged for their instrumental support.

## References

- [1] E. Shapiro, T. Biezuner, S. Linnarsson, Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science, *Nat. Rev. Genet.* 14 (2013) 618–630. <https://doi.org/10.1038/nrg3542>.
- [2] C.E. Meacham, S.J. Morrison, Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity, *Nature* 501 (2013) 328–337. <https://doi.org/10.1038/nature12624>.
- [3] H. Haraguchi, Metallomics: the history over the last decade and a future outlook, *Metallomics* 9 (2017) 1001–1013. <https://doi.org/10.1039/C7MT00023E>.
- [4] F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk, Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1407–1413. <https://doi.org/10.1021/ac049188l>.
- [5] X. Yu, M. He, B. Chen, B. Hu, Recent advances in single-cell analysis by inductively coupled plasma-mass spectrometry: a review, *Anal. Chim. Acta* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.041>.
- [6] K. Löhr, H. Traub, A.J. Wanka, U. Panne, N. Jakubowski, Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging,





- [53] A.K. Kimball, L.M. Oko, B.L. Bullock, R.A. Nemenoff, L.F. van Dyk, E.T. Clambey, A beginner's guide to analyzing and visualizing mass cytometry data, *J. Immunol.* 200 (2018) 3–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701494>.
- [54] A. Montaser, M.G. Minnich, J.A. McLean, H.Y. Liu, A.G.T. Gustavsson, R.F. Browner, *Fundamental aspects of sample introduction in ICP spectrometry*, in: A. Montaser (Editor), *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Wiley-VCH, New York, 1998, pp. 335–420.
- [55] X. Wei, D.H. Zheng, Y. Cai, R. Jiang, M.L. Chen, T. Yang, Z.R. Xu, Y.L. Yu, J.H. Wang, High-throughput/high-precision sampling of single cells into ICP-MS for elucidating cellular nanoparticles, *Anal. Chem.* 90 (2018) 14543–14550. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04471>.
- [56] Q.X. Sun, X. Wei, S.Q. Zhang, M.L. Chen, T. Yang, J.H. Wang, Single cell analysis for elucidating cellular uptake and transport of cobalt curcumin complex with detection by time-resolved ICPMS, *Anal. Chim. Acta* 1066 (2019) 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.062>.
- [57] S.E. Maestre, J.L. Todolí, J.M. Mermet, Evaluation of several pneumatic micronebulizers with different designs for use in ICP-AES and ICP-MS. Future directions for further improvement, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 888–899. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2664-4>.
- [58] J.L. Todolí, V. Hernandez, A. Canals, J.M. Mermet, Comparison of characteristics and limits of detection of pneumatic micronebulizers and a conventional nebulizer operating at low uptake rates in ICP-AES, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1289–1295. <https://doi.org/10.1039/a900598f>.
- [59] S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, *Metallomics* 10 (2018) 73–76. <https://doi.org/10.1039/c7mt00285h>.
- [60] L.-N. Zheng, M. Wang, L.-C. Zhao, B.-Y. Sun, B. Wang, H.-Q. Chen, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, W.-Y. Feng, Quantitative analysis of Gd@C82(OH)22 and cisplatin uptake in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2383–2391. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8422-3>.
- [61] A.S. Groombridge, S. Miyashita, S. Fujii, K. Nagasawa, T. Okahashi, M. Ohata, T. Umegura, A. Takatsu, K. Inagaki, K. Chiba, High sensitive elemental analysis of single yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry using a high efficiency cell introduction system, *Anal. Sci.* 29 (2013) 597–603. <https://doi.org/10.2116/analsci.29.597>.
- [62] R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K.L. LeBlanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: analytical strategies based on ICP-TQ-MS, *Analyst* 145 (2020) 1457–1465. <https://doi.org/10.1039/C9AN01565E>.
- [63] J. Shi, X. Ji, Q. Wu, H. Liu, G. Qu, Y. Yin, L. Hu, G. Jiang, Tracking mercury in individual *Tetrahymena* using a capillary single-cell inductively coupled plasma mass spectrometry online system, *Anal. Chem.* 92 (1) (2020) 622–627. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03719>.
- [64] X. Wei, X. Zhang, R. Guo, M.L. Chen, T. Yang, Z.R. Xu, J.H. Wang, A spiral-helix (3D) tubing array that ensures ultrahigh-throughput single-cell sampling, *Anal. Chem.* 91 (2019) 15826–15832. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04122>.
- [65] Y. Cao, J. Feng, L. Tang, C. Yu, G. Mo, B. Deng, A highly efficient introduction system for single cell ICP-MS and its application to detection of copper in single human red blood cells, *Talanta* 206 (2020) 120174. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120174>.
- [66] S.C. Bendall, E.F. Simonds, P. Qiu, E.A.D. Amir, P.O. Krutzik, R. Finck, R.V. Bruggner, R. Melamed, A. Trejo, O.I. Ornatsky, R.S. Balderas, S.K. Plevritis, K. Sachs, D. Pe'er, S.D. Tanner, G.P. Nolan, Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum (80-), *Science* 332 (2011) 687–696. <https://doi.org/10.1126/science.1198704>.
- [67] D.R. Bandura, V.I. Baranov, O.I. Ornatsky, A. Antonov, R. Kinach, X. Lou, S. Pavlov, S. Vorobiev, J.E. Dick, S.D. Tanner, Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6813–6822. <https://doi.org/10.1021/ac901049w>.
- [68] K.R. Atkuri, J.C. Stevens, H. Neubert, Mass cytometry: a highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development, *Drug Metab. Dispos.* 43 (2015) 227–233. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060798>.
- [69] C.C. García, A. Murtazin, S. Groh, V. Horvatic, K. Niemax, Characterization of single Au and SiO<sub>2</sub> nano- and microparticles by ICP-OES using monodisperse droplets of standard solutions for calibration, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 645–653. <https://doi.org/10.1039/b921041e>.
- [70] S. Gschwind, L. Flamigni, J. Koch, O. Borovinskaya, S. Groh, K. Niemax, D. Günther, Capabilities of inductively coupled plasma mass spectrometry for the detection of nanoparticles carried by monodisperse microdroplets, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 1166–1174. <https://doi.org/10.1039/c0ja00249f>.
- [71] K. Shigetani, H. Traub, U. Panne, A. Okino, L. Rottmann, N. Jakubowski, Application of a micro-droplet generator for an ICP-sector field mass spectrometer – optimization and analytical characterization, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 646–656. <https://doi.org/10.1039/c2ja30207a>.
- [72] Y. Ishihara, M. Aida, A. Nomura, H. Miyahara, A. Hokura, A. Okino, Development of desolvation system for single-cell analysis using droplet injection inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, *Anal. Sci.* 31 (2015) 781–785. <https://doi.org/10.2116/analsci.31.781>.
- [73] M. He, B. Chen, H. Wang, B. Hu, Microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry for trace elements and their species analysis in cells, *Appl. Spectrosc. Rev.* 54 (2019) 250–263. <https://doi.org/10.1080/05704928.2019.1565864>.
- [74] P.E. Verboket, O. Borovinskaya, N. Meyer, D. Günther, P.S. Dittrich, A new microfluidics-based droplet dispenser for ICPMS, *Anal. Chem.* 86 (2014) 6012–6018. <https://doi.org/10.1021/ac501149a>.
- [75] H. Wang, B. Chen, M. He, X. Li, P. Chen, B. Hu, Study on uptake of gold nanoparticles by single cells using droplet microfluidic chip-inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 200 (2019) 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.075>.
- [76] X. Yu, B. Chen, M. He, H. Wang, B. Hu, 3D droplet-based microfluidic device easily assembled from commercially available modules online Coupled with ICPMS for determination of silver in single cell, *Anal. Chem.* 91 (2019) 2869–2875. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04844>.
- [77] N. Jakubowski, T. Prohaska, F. Vanhaecke, P.H. Roos, T. Lindemann, Inductively coupled plasma- and glow discharge plasma-sector field mass spectrometry: Part II. Applications, *J. Anal. At. Spectrom.* 26 (2011) 727–757. <https://doi.org/10.1039/c0ja00007h>.
- [78] P. Shaw, A. Donard, Nano-particle analysis using dwell times between 10 μs and 70 μs with an upper counting limit of greater than 3 × 10<sup>7</sup> cps and a gold nanoparticle detection limit of less than 10 nm diameter, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, Royal Society of Chemistry, 2016, pp. 1234–1242. <https://doi.org/10.1039/c6ja00047a>.
- [79] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, B. Hattendorf, Characterization of a New ICP-TOFMS Instrument with Continuous and Discrete Introduction of Solutions †, 2017, pp. 548–561. <https://doi.org/10.1039/C6JA00400H>.
- [80] J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1143–1155. <https://doi.org/10.1039/c2ja30073g>.
- [81] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1252–1257. <https://doi.org/10.1039/c4ja00097h>.
- [82] M.D. Montaña, H.R. Badiei, S. Bazargan, J.F. Ranville, Improvements in the detection and characterization of engineered nanoparticles using spICP-MS with microsecond dwell times, *Environ. Sci. Nano.* 1 (2014) 338–346. <https://doi.org/10.1039/c4en00058g>.
- [83] I. Abad-Álvarez, E. Peña-Vázquez, E. Bolea, P. Bermejo-Barrera, J.R. Castillo, F. Laborda, Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 5089–5097. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9515-y>.
- [84] F. Laborda, E. Bolea, J. Jiménez-Lamana, Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2270–2278. <https://doi.org/10.1021/ac402980q>.
- [85] D. Mozhayeva, C. Engelhard, A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry – a step towards an ideal method for nanomaterial characterization, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 1740–1783. <https://doi.org/10.1039/c9ja00206e>.
- [86] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, in: *J. Anal. At. Spectrom.*, Royal Society of Chemistry, 2014, pp. 1252–1257. <https://doi.org/10.1039/c4ja00097h>.
- [87] L. Hendriks, A. Gundlach-Graham, B. Hattendorf, D. Günther, Characterization of a new ICP-TOFMS instrument with continuous and discrete introduction of solutions, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 548–561. <https://doi.org/10.1039/c6ja00400h>.
- [88] M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández-García, P. García Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, D.J. Kutscher, Towards automated routine analysis of the distribution of trace elements in single cells using ICP-MS, *Curr. Trends Mass Spectrom.* 18 (2020) 6–10.
- [89] H. Wang, M. Wang, B. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, W. Feng, Interrogating the variation of element masses and distribution patterns in single cells using ICP-MS with a high efficiency cell introduction system, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 1415–1423. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0075-y>.
- [90] C.N. Tsang, K.S. Ho, H. Sun, W.T. Chan, Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single helicobacter pylori cells, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 7355–7357. <https://doi.org/10.1021/ja2013278>.
- [91] Y. Zhou, H. Li, H. Sun, Cytotoxicity of arsenic trioxide in single leukemia cells by time-resolved ICP-MS together with lanthanide tags, *Chem. Commun.* 53 (2017) 2970–2973. <https://doi.org/10.1039/c7cc00143f>.
- [92] Y. Zhou, H. Wang, E. Tse, H. Li, H. Sun, Cell cycle-dependent uptake and cytotoxicity of arsenic-based drugs in single leukemia cells, *Anal. Chem.* 90 (2018) 10465–10471. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02444>.
- [93] H. Wang, B. Chen, M. He, B. Hu, A facile droplet-chip-time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry online system for determination of zinc in single cell, *Anal. Chem.* 89 (2017) 4931–4938. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00134>.
- [94] Y. Liang, Q. Liu, Y. Zhou, S. Chen, L. Yang, M. Zhu, Q. Wang, Counting and recognizing single bacterial cells by a lanthanide-encoding inductively coupled plasma mass spectrometric approach, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8341–8349. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01130>.
- [95] Y. Zhang, N. Zabinyakov, D. Majonis, A. Bouzekri, O. Ornatsky, V. Baranov, M.A. Winnik, Tantalum oxide nanoparticle-based mass tag for mass

- cytometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 5741–5749. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04970>.
- [96] B. Bodenmiller, E.R. Zunder, R. Finck, T.J. Chen, E.S. Savig, R.V. Bruggner, E.F. Simonds, S.C. Bendall, K. Sachs, P.O. Krutzik, G.P. Nolan, Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators, *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 858–867. <https://doi.org/10.1038/nbt.2317>.
- [97] D. Majonis, I. Herrera, O. Ornatsky, M. Schulze, X. Lou, M. Soleimani, M. Nitz, M.A. Winnik, Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8961–8969. <https://doi.org/10.1021/ac101901x>.
- [98] E.W. Newell, N. Sigal, S.C. Bendall, G.P. Nolan, M.M. Davis, Cytometry by time-of-flight shows Combinatorial cytokine expression and virus-specific cell Niches within a continuum of CD8 + T cell phenotypes, *Immunity* 36 (2012) 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.002>.
- [99] Y.S.S. Yang, P.U. Atukorale, K.D. Moynihan, A. Bekdemir, K. Rakhra, L. Tang, F. Stellacci, D.J. Irvine, High-throughput quantitation of inorganic nanoparticle biodistribution at the single-cell level using mass cytometry, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms14069>.
- [100] Q. Chang, O.I. Ornatsky, C.J. Koch, N. Chaudary, D.T. Marie-Egyptienne, R.P. Hill, S.D. Tanner, D.W. Hedley, Single-cell measurement of the uptake, intratumoral distribution and cell cycle effects of cisplatin using mass cytometry, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 1202–1209. <https://doi.org/10.1002/ijc.29074>.

## SHORT COMMUNICATION

# Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism

E Cuyàs<sup>1,2,12</sup>, S Fernández-Arroyo<sup>3,4,12</sup>, S Verdura<sup>1,2,12</sup>, RÁ-F García<sup>5</sup>, J Stursa<sup>6,7</sup>, L Werner<sup>6,7</sup>, E Blanco-González<sup>5</sup>, M Montes-Bayón<sup>5</sup>, J Joven<sup>3,4</sup>, B Viollet<sup>8,9,10</sup>, J Neuzil<sup>6,11</sup> and JA Menendez<sup>1,2</sup>

The anti-diabetic biguanide metformin may exert health-promoting effects via metabolic regulation of the epigenome. Here we show that metformin promotes global DNA methylation in non-cancerous, cancer-prone and metastatic cancer cells by decreasing *S*-adenosylhomocysteine (SAH), a strong feedback inhibitor of *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent DNA methyltransferases, while promoting the accumulation of SAM, the universal methyl donor for cellular methylation. Using metformin and a mitochondria/complex I (mCI)-targeted analog of metformin (norMitoMet) in experimental pairs of wild-type and AMP-activated protein kinase (AMPK)-, serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2)- and mCI-null cells, we provide evidence that metformin increases the SAM:SAH ratio-related methylation capacity by targeting the coupling between serine mitochondrial one-carbon flux and CI activity. By increasing the contribution of one-carbon units to the SAM from folate stores while decreasing SAH in response to AMPK-sensed energetic crisis, metformin can operate as a metabolo-epigenetic regulator capable of reprogramming one of the key conduits linking cellular metabolism to the DNA methylation machinery.

*Oncogene* advance online publication, 23 October 2017; doi:10.1038/onc.2017.367

## INTRODUCTION

There is consensus within the aging and cancer research fields that the anti-diabetic biguanide metformin exerts multiple health-promoting effects by targeting core nutrient/energy-sensing metabolic axes such as insulin/insulin-like growth factor-I and AMPK/mammalian (or mechanistic) target of rapamycin.<sup>1,2</sup> Because an increasing body of evidence supports the exquisite responsiveness of the epigenetic regulatory machinery to metabolic cues,<sup>3,4</sup> an alternative but not mutually exclusive mechanism of action of metformin might involve metabolic regulation of the epigenome.

Metformin has recently been shown to induce genome-wide alterations in the DNA methylome of cancer cells by positively modulating the activity of *S*-adenosylhomocysteine (SAH) hydrolase.<sup>5</sup> This ability to indirectly activate the sole mammalian enzyme capable of hydrolyzing SAH,<sup>6</sup> a potent feedback inhibitor of *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferases,<sup>7</sup> may represent an unrecognized mechanism whereby metformin-induced DNA methylation epigenetically delays or reverses the hallmarks of aging or age-related diseases including cancer. However, its ability to decrease intracellular levels of SAH, a biomarker for cellular methylation, has not been demonstrated. Moreover, the capacity of metformin to alter the DNA methylome of non-cancerous, cancer-prone and metastatic cancer cells remains unknown. Additionally, the key metabolic route coupling a primary target of metformin, complex I (CI) of the mitochondrial respiratory chain,<sup>8,9</sup> to the DNA methylation epigenetic machinery has not been fully elucidated.

## RESULTS

Metformin increases the SAM:SAH ratio-related methylation capacity and promotes global DNA methylation

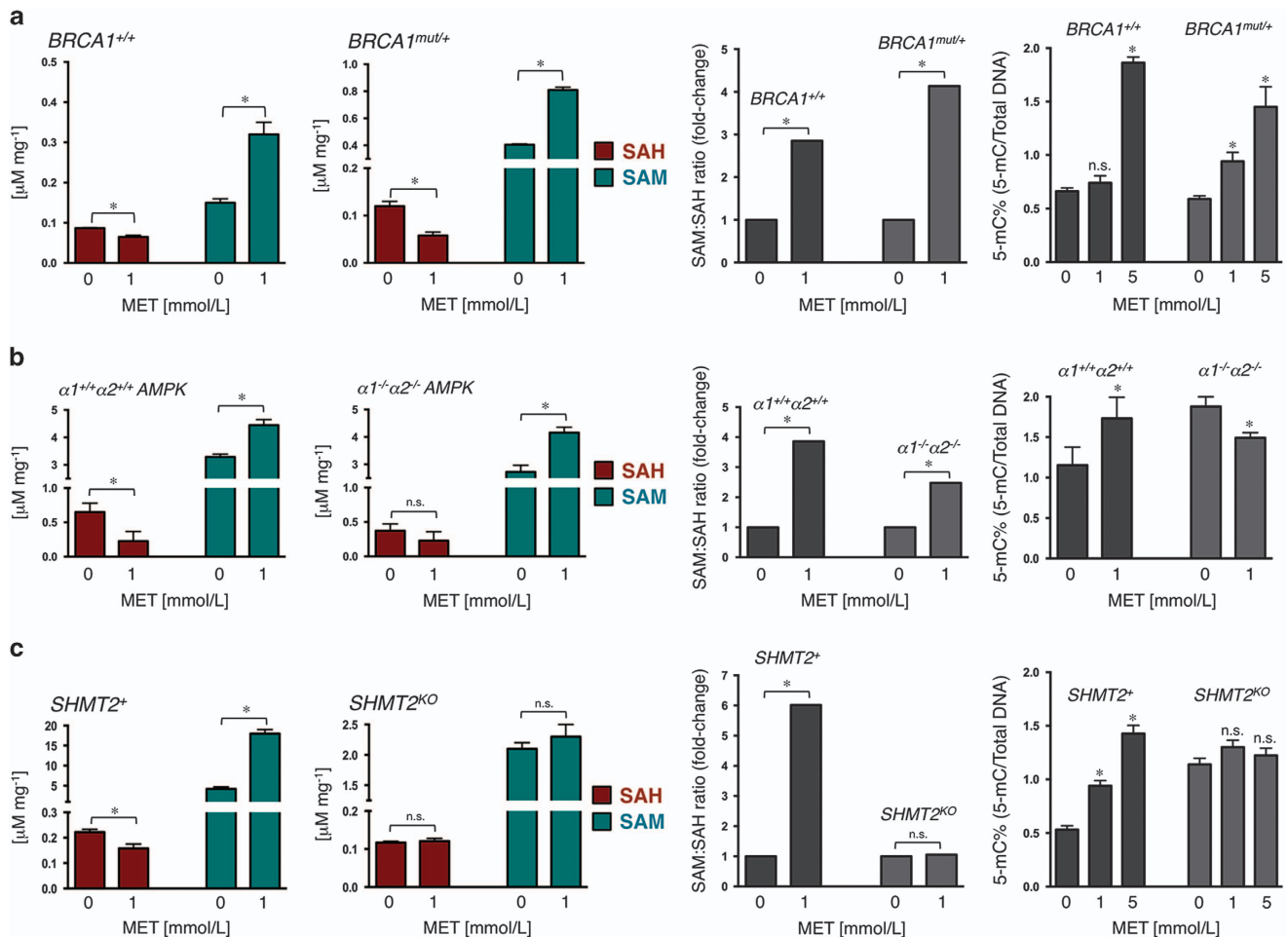
We utilized a genetically defined system of cell-type-specific cancer predisposition to question the impact of metformin on the SAH-related capacity of cells to alter DNA methylation. Using isogenic pairs of non-malignant MCF10A human breast epithelial cells with a knock-in of the *185delAG* mutation in *BRCA1* resulting in genomic instability,<sup>10–13</sup> we employed ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to an electrospray ionization source and a triple-quadrupole mass spectrometer (UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS) to quantitatively measure SAH levels<sup>14</sup> after short-course (2 days) metformin treatment. Metformin treatment significantly decreased SAH levels both in *BRCA1*<sup>+/+</sup> parental and in *BRCA1*<sup>mut/+</sup> haploinsufficient cells (Figure 1a, left), which is consistent with its ability to increase SAH hydrolase activity.<sup>5</sup> The decrease of SAH in both cell lines was accompanied by a significant increase in the accumulation of SAM, the universal methyl donor for cellular methylation of proteins and DNA (Figure 1a, left). Accordingly, the SAM:SAH ratio was significantly higher in metformin-treated *BRCA1*<sup>+/+</sup> and *BRCA1*<sup>mut/+</sup> cells (Figure 1a, right). Both an increase in SAH and a decrease in the SAM:SAH ratio are known to inhibit transmethylation reactions. Therefore, an increase in the SAM:SAH ratio might predict an increased methylation capacity only when associated with a significant decrease in SAH,<sup>7</sup> a metabolic phenotype that was

<sup>1</sup>ProCURE (Program Against Cancer Therapeutic Resistance), Metabolism & Cancer Group, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain; <sup>2</sup>Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Catalonia, Spain; <sup>3</sup>Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; <sup>4</sup>The Campus of International Excellence Southern Catalonia, Tarragona, Spain; <sup>5</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain; <sup>6</sup>Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic; <sup>7</sup>Institute of Biotechnology, Czech Academy of Sciences, Prague-West, Czech Republic; <sup>8</sup>INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France; <sup>9</sup>CNRS UMR 8104, Paris, France; <sup>10</sup>Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France and <sup>11</sup>School of Medical Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia. Correspondence: Dr JA Menendez, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Edifici M2, Parc Hospitalari Martí i Julià, Salt, Girona E-17190, Spain.

E-mail: jmenendez@iconcologia.net or jmenendez@idibgi.org

<sup>12</sup>These authors contributed equally to this work.

Received 20 November 2016; revised 15 August 2017; accepted 16 August 2017



**Figure 1.** Metformin regulates the SAM:SAH ratio-related DNA methylation capacity in an AMPK- and SHMT2-dependent manner. Concentrations of SAH and SAM ( $\mu\text{M mg protein}^{-1}$ ) in  $BRCA1^{+/+}/BRCA1^{185delAG/+}$  MCF10A breast epithelial cells (a),  $AMPK \alpha1^{+/+}\alpha2^{+/+}/AMPK \alpha1^{-/-}\alpha2^{-/-}$  MEFs (b) and  $SHMT2^{+}/SHMT2^{KO}$  HAP1 cancer cells (c) cultured in the absence or presence of 1 mmol/l metformin (MET) for 2 days was determined by UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS. The 5-mC content (%) was evaluated using the MethylFlash Methylated DNA 5-mC quantification kit. Metabolomic data are expressed as mean (columns)  $\pm$  s.d. (bars) ( $n=3$  independent experiments performed in triplicate). %5-mC data are expressed as mean (columns)  $\pm$  s.d. (bars) ( $n=3$  independent experiments performed in triplicate). \* $P < 0.05$  relative to untreated control cells. NS, non-significant differences.

evident in the presence of metformin. Using a 5-methylcytosine (5-mC) quantification assay to evaluate global DNA methylation, we confirmed that the ability of metformin to increase the cellular methylation capacity likewise translated into a significant increase in the 5-mC content of DNA (up to 2.5- to 3-fold) in  $BRCA1^{+/+}$  and  $BRCA1^{mut/+}$  cells (Figure 1a, right).

#### Metformin promotes methylation of LINE-1 retrotransposons

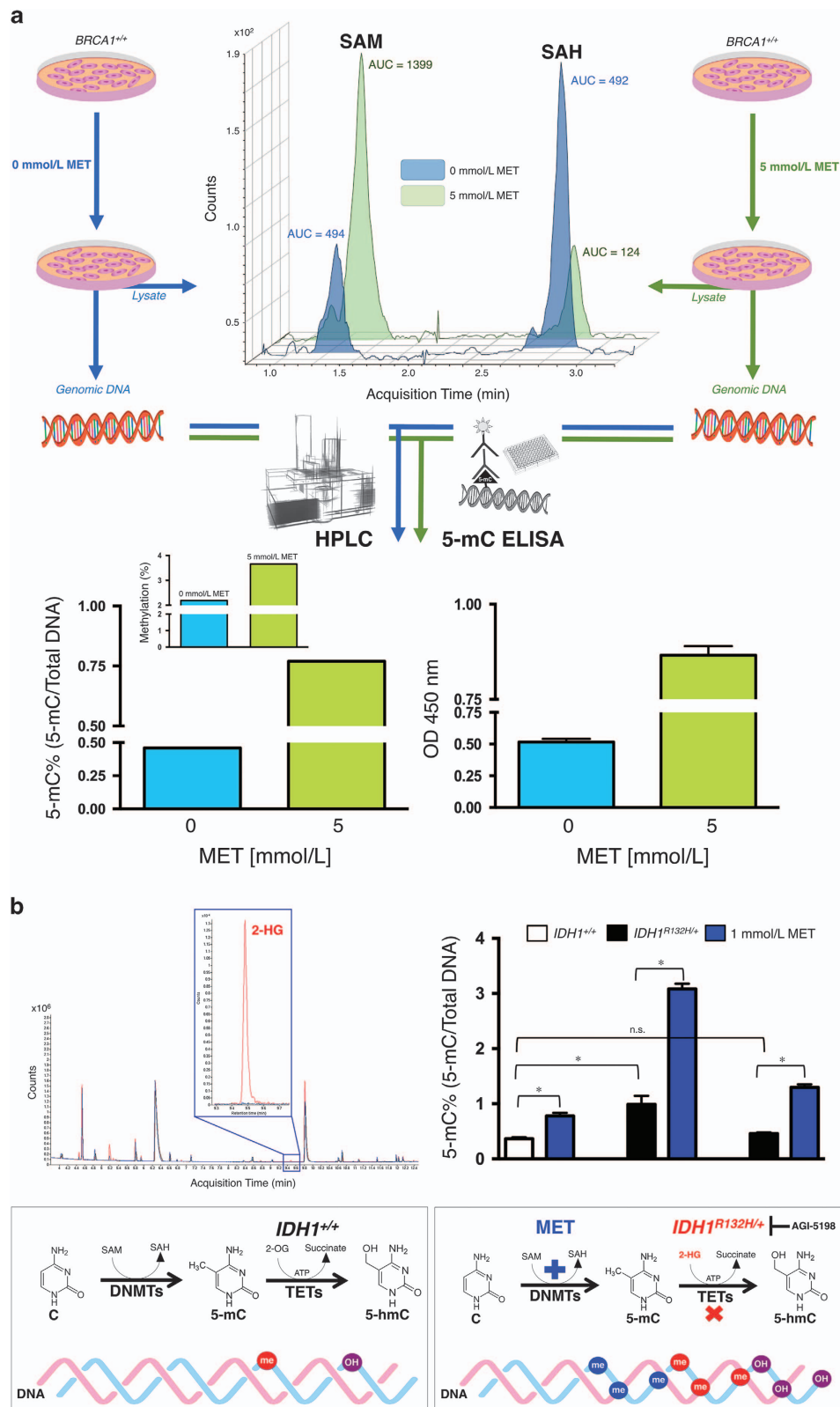
Approximately 45% of the mammalian genome consists of endogenous transposable elements such as LINE-1, which exhibit methylation-regulated motility. Since LINE-1 elements are widely distributed in the genome and are typically heavily methylated in the majority of normal tissues, their methylation status is generally regarded as a proxy for global DNA methylation.<sup>15–18</sup> We therefore analyzed LINE-1 methylation to confirm the ability of metformin to promote global DNA methylation. Using a global DNA methylation assay-LINE-1, we evaluated whether baseline methylation of LINE-1 in  $BRCA1^{+/+}$  cells was altered after 2- or 10-day metformin treatment. The coefficient of LINE-1 5-mC was significantly increased following 2-day treatment, with no further increase at 10 days (Supplementary Figure S1A). We then assessed whether  $BRCA1$  haploinsufficiency was accompanied by reduced LINE-1

methylation. The coefficient of LINE-1 5-mC was significantly lower in cancer-prone  $BRCA1^{mut/+}$  cells than in  $BRCA1^{+/+}$  cells. Remarkably, 2-day metformin treatment fully reversed LINE-1 hypomethylation in  $BRCA1^{mut/+}$  cells. Moreover, the coefficients of LINE-1 5-mC in metformin-treated  $BRCA1^{mut/+}$  cells were even higher than those of similarly treated  $BRCA1^{+/+}$  cells (Supplementary Figure S1A).

The ability of metformin to impact LINE-1 methylation was investigated in breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary human mammary epithelial cells via the overexpression *hTERT*, *SV40 T/t* and *H-RasV12* (HMLER cells). Experimental induction of epithelial-to-mesenchymal transition by shRNAi of *CDH1* (E-cadherin)<sup>19,20</sup> dramatically reduced the coefficient of LINE-1 5-mC in cancer stem-like HMLER<sup>shEcad</sup> cells relative to isogenic HMLER<sup>shCtrl</sup> cells. Conversely, 2-day metformin treatment promoted a significant increase in the coefficient of LINE-1 5-mC content in HMLER<sup>shCtrl</sup> cells (Supplementary Figure S1B). Thus, cancer stemness-promoting epithelial-to-mesenchymal transition<sup>19,20</sup> and cancer stemness-inhibiting metformin<sup>21–23</sup> have opposing effects on the methylation status of LINE-1 occurring upon *Ras*-driven transformation of human mammary epithelial cells (Supplementary Figure S1B).

Metformin-induced upregulation of the SAM:SAH ratio augments the global content of 5-mC in genomic DNA  
The above-mentioned findings support the notion that metformin promotes DNA methyltransferase (DNMT)-dependent DNA methylation, which makes use of the methyl groups donated by SAM in

an SAH-dependent manner. However, it should be acknowledged that analytical dimensions such as the high level of inter- and intra-assay variability of the enzyme-linked immunosorbent assay-based assays employed to identify large changes in global DNA methylation and the baseline variation of the levels of SAM/SAH



and 5-mC content across experimental conditions (that is, independent groups of biological replicates are separately employed to technically measure either SAM/SAH metabolites or global DNA methylation) might preclude accurate establishment of a causal relationship between metformin-induced augmentation of the SAM/SAH ratio and a consequent increased content of 5-mC in the genomic DNA of the very same cell. To definitely establish both the accuracy of metformin-induced global DNA methylation established by enzyme-linked immunosorbent assay-based approaches and its correspondence with metformin-induced alteration in the methylation intermediates SAM and SAH, genomic DNA was isolated from nuclei of the same MCF10A *BRCA1*<sup>+/+</sup> cells from which cell lysates were obtained to quantitatively measure the concentrations of SAM and SAH metabolites simultaneously (Figure 2a). The application in parallel of high-performance liquid chromatography (HPLC) using conventional ultraviolet (UV) absorbance detection at 270 nm and the enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology confirmed the metformin's ability to significantly increase (50–70%) the amount of 5-mC in the genomic DNA extracted from the same set of cells in which UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS-based quantification of SAM and SAH metabolites clearly exposed the metformin's ability to augment the amount of the DNMT substrate SAM while simultaneously decreasing the amount of the DNMT inhibitor SAH (Figure 2a).

Metformin enhances global DNA methylation irrespective of the cancer cell methylator phenotype

Not all types of cancers exhibit global DNA hypomethylation; several tumors overproduce oncometabolites such as 2-hydroxyglutarate (2-HG), which can inhibit Ten-Eleven Translocation methylcytosine hydroxylases, provoking a DNA hypermethylation phenotype.<sup>24</sup> To test whether metformin could alter the DNA methylome against the background of an existing DNA hypermethylation signature, we utilized isogenic models of the metastatic colon cancer HCT116 cell line with an intact machinery to generate physiologically relevant methylation patterns,<sup>25</sup> in which one wild-type (WT) allele of isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) was substituted with the *IDH1*<sup>R132H</sup> allele that can generate 2-HG (Figure 2b). Metformin treatment (2 days) increased the baseline 5-mC content of DNA in *IDH1*<sup>+/+</sup> HCT116 parental cells ~2 fold (Figure 2b). Whereas overproduction of 2-HG likewise promoted the development of global DNA hypermethylation in heterozygous *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells, as shown by a ~3-fold increase in the 5-mC content in DNA, the ability of metformin to promote genome-wide increases in DNA methylation remained unaffected by the pre-existing, 2-HG-related hypermethylation phenotype. Indeed, metformin-treated *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells exhibited a ~3-fold enhancement in 5-mC content (that is, *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells cultured with metformin increased their overall 5-mC content in DNA by >8-fold compared with the baseline levels measured in *IDH1*<sup>+/+</sup> parental cells; Figure 2b), likely reflecting a reduced capacity to block global methylation upon inhibition of Ten-Eleven Translocation enzymes by 2-HG. To confirm that metformin could promote

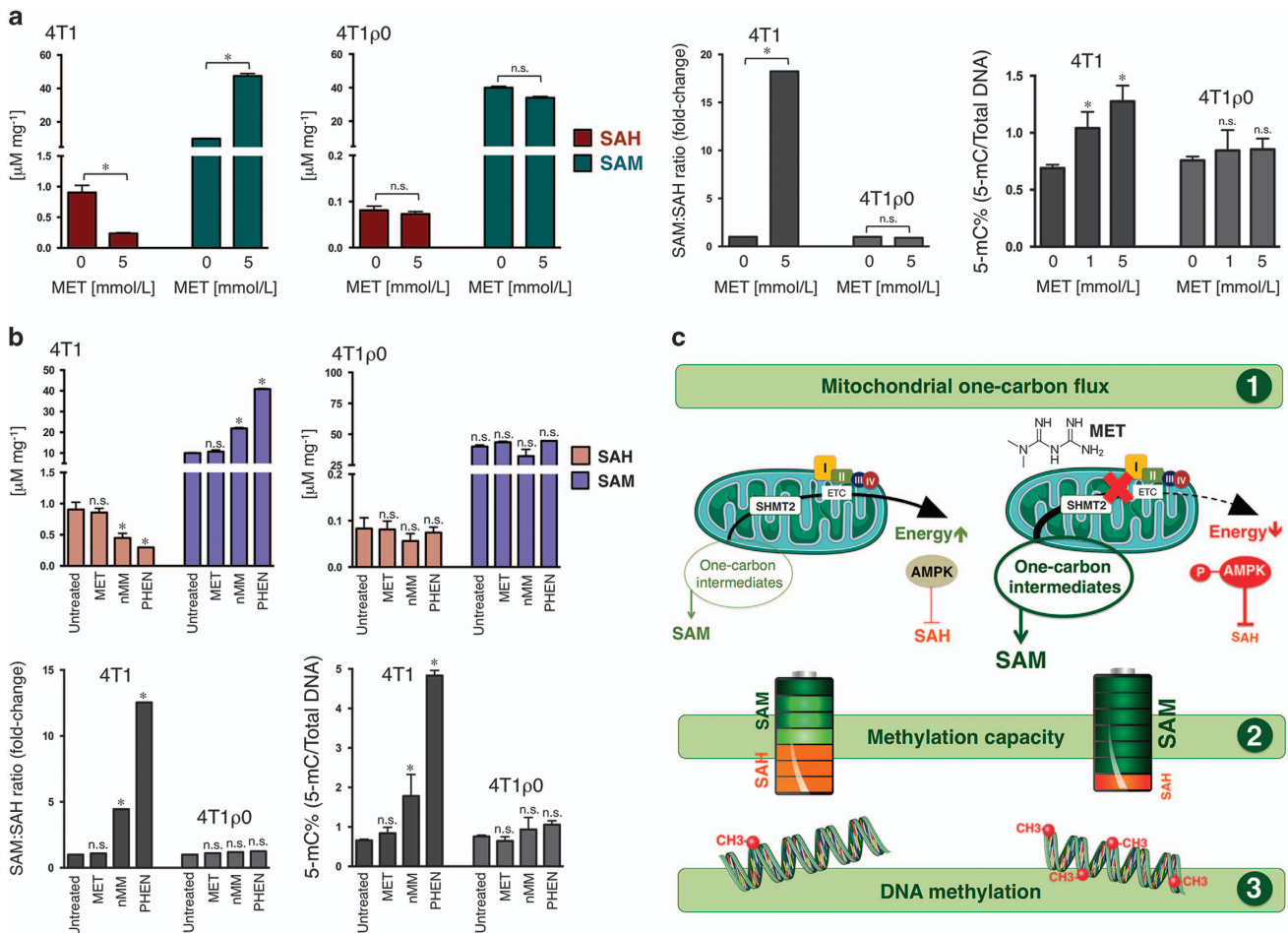
*de novo* DNA methylation irrespective of the 2HG-impeded Ten-Eleven Translocation activity, *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells were treated with the selective R132H *IDH1* inhibitor AGI-5198 at concentrations sufficient to fully suppress 2-HG to WT levels for up to 2 months.<sup>26</sup> Exposure of AGI-treated (2-HG-depleted) *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells to metformin resulted in a ~3-fold increase in 5-mC content (Figure 2b).

Metformin regulates SAH but not SAM in an AMPK-dependent manner

The ability of metformin to enhance DNA methylation irrespective of the genetic methylator phenotype in tumor cells strongly supports its probable role as a *bona fide* metabolo-epigenetic modifier. We therefore explored the molecular basis underlying the ability of metformin to regulate the contribution of methyl units to DNA methylation variation. Because the energy sensor AMPK has consistently been linked to the metabolic effects of metformin,<sup>27–29</sup> we assessed its role in determining the ability of metformin to modify SAM:SAH ratio-related DNA methylation. We used an isogenic pair of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient for AMPK *a1* and *a2* catalytic subunits (*a1*<sup>-/-</sup>*a2*<sup>-/-</sup>), and therefore lacking functional AMPK signaling. We observed that lower SAH levels and a significantly increased SAM:SAH ratio in *a1*<sup>-/-</sup>*a2*<sup>-/-</sup> MEFs likewise resulted in a higher DNA 5-mC content (~1.5-fold) compared with the baseline levels of parental MEFs (Figure 1b). The ability of metformin to decrease SAH levels in *a1*<sup>-/-</sup>*a2*<sup>-/-</sup> MEFs was effectively prevented, which is consistent with its reported capacity to increase SAH hydrolase activity in an AMPK-dependent manner.<sup>1</sup> By contrast, AMPK deficiency failed to impact the ability of metformin to augment SAM levels (Figure 1b). Thus, although the net effect of metformin was to promote a similar enhancement of the methylation capacity (SAM:SAH ratio) both in WT and *a1*<sup>-/-</sup>*a2*<sup>-/-</sup> MEFs, it failed to further increase the global DNA hypermethylation phenotype promoted by the loss of both catalytic AMPK isoforms.

The uncoupling that occurs between enhanced SAM:SAH ratio and unresponsive DNA methylation capacity in metformin-treated *a1*<sup>-/-</sup>*a2*<sup>-/-</sup> MEFs might reflect that metformin-driven amplification of the SAM:SAH ratio increases DNA methylation only when it can lower the levels of the DNMT inhibitor SAH via the AMPK/S-adenosylhomocysteine hydrolase axis.<sup>1</sup> We hypothesized that in the absence of changes to the SAM concentration, the ability of metformin to modulate global DNA methylation should rely on its capacity to downregulate the DNMT inhibitor SAH in an AMPK-dependent manner. To definitely corroborate that the ability of metformin to decrease SAH levels is due to mCI inhibition-related activation of AMPK, we decided to compare the SAH/DNA methylation effects of an ineffective concentration of metformin with those promoted by two different metformin analogs: the mitochondria-targeted norMitoMet (nMM),<sup>30</sup> a metformin derivative tagged with triphenylphosphonium, which maximizes metformin activity by sending it to the subcellular site of CI, the interface of the mitochondrial inner membrane and the matrix; and the non-targeted phenethylbiguanide (phenformin; PHEN), a

**Figure 2.** (a) Metformin-increased SAM:SAH methylation index associates with increased 5-mC content in genomic DNA. Top: Multiple Reaction Monitoring (MRM) chromatograms using the transitions *m/z* 399 → 250 for SAM and *m/z* 385 → 13 for SAH in MCF10A *BRCA1*<sup>+/+</sup> cells cultured in the absence or presence of 5 mmol/l MET. Bottom: Genomic DNAs (from the very same MCF10A *BRCA1*<sup>+/+</sup> cells in which the LC-MS/MS chromatograms of SAM and SAH were carried out in the top panel) were split into two aliquots to conduct HPLC-UV (left) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based (right) measurements of the 5-mC content simultaneously. Figure shows representative findings from *n* = 2 independent experiments performed in duplicate. (b) Metformin augments *de novo* DNA methylation in cancer cells presenting a DNA demethylase-related hypermethylation phenotype. Left: Base-peak chromatograms of extracts from *IDH1*<sup>+/+</sup> cells (black line), *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells (red line) and *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells treated with 40 μmol/l AGI-5198 for 2 days (blue line). A combined mass spectrum of the region where the oncometabolite 2-HG was eluted (*m/z* 349.1317) is shown in the inset.<sup>26</sup> Right: The 5-mC content (%) of HCT116 *IDH1*<sup>+/+</sup> and HCT116 *IDH1*<sup>R132H/+</sup> cells cultured in the absence or presence of MET (and/or AGI-5198) was evaluated using the MethylFlash Methylated DNA 5-mC quantification kit in accordance with the manufacturer's instructions. \**P* < 0.05.



**Figure 3.** Metformin regulates the SAM:SAH ratio-related DNA methylation in a mitochondrial complex I-dependent manner. Concentrations of SAH and SAM ( $\mu\text{M mg}^{-1}$ ) in the CI-containing 4T1/CI-depleted 4T1p0 cells cultured in the absence or presence of either 5 mmol/l metformin (MET) (a) or 100  $\mu\text{mol/l}$  MET, NorMitoMet (NMM) or phenformin (PHEN) (b) for 2 days were determined by UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS.<sup>14</sup> The 5-mC content (%) was evaluated using the MethylFlash methylated DNA 5-mC quantification kit in accordance with the manufacturer's instructions. Metabolomic data are expressed as mean (columns)  $\pm$  s.d. (bars) ( $n=3$  independent experiments performed in quintuplicate). % 5-mC data are expressed as mean (columns)  $\pm$  s.d. (bars) ( $n=3$  independent experiments performed in triplicate). \* $P < 0.05$  relative to untreated control cells. NS, non-significant differences. (c) A mitochondria-centered working model of MET-regulated global DNA methylation. MET increases the SAM:SAH ratio-related methylation capacity by targeting the coupling between serine mitochondrial one-carbon flux and CI activity. MET reprograms the carbon flow to the DNA methylation epigenetic machinery by increasing the contribution of one-carbon units to the SAM from the SHMT2-related folate stores while decreasing SAH in response to AMPK-sensed energetic crisis.

metformin analog that behaves as a better CI inhibitor and AMPK activator because of its greater hydrophobicity.<sup>31</sup> We observed a direct correlation between the ability of metformin, nMM, and PHEN to activate AMPK, decrease SAH levels and promote global DNA methylation in AMPK-containing but not in AMPK-deficient MEFs (Supplementary Figure S1C).

Metformin targets the link between one-carbon metabolism and the SAM:SAH ratio-related capacity of DNA methylation That metformin could regulate SAH but not SAM in an AMPK-dependent manner strongly suggests that it might directly impact mitochondrial one-carbon metabolism, the major metabolic supply route of methyl groups that are required for DNA methylation.<sup>32–35</sup> As serine one-carbon metabolism into the folate pool participates in the control of the intracellular levels of SAM, we predicted that the capacity of metformin to modify SAM:SAH ratio-related DNA methylation should be significantly altered by impeding the normal functioning of mitochondria as the primary source of one-carbon units.

To evaluate whether the serine mitochondrial one-carbon flux might play a role in the ability of metformin to promote global DNA methylation via SAM, we choose ready-made HAP1 cells<sup>36,37</sup> edited by CRISPR/Cas9 to obtain a knockout (KO) derivative harboring a 2-bp deletion in exon 2 in the *SHMT2* gene. *SHMT2* functions to generate one-carbon units from serine in mitochondria, which are then exported into the cytosol as formate to support one-carbon metabolism.<sup>32–35</sup> We confirmed that metformin-treated HAP1 parental cells had decreased levels of SAH and a striking accumulation of SAM (Figure 1c, left). This dramatic increase in the SAM:SAH ratio-related methylation capacity was accompanied by a marked increase in global 5-mC in DNA (Figure 1c, right) as well as in the 5-mC content associated with LINE-1 repeats (Supplementary Figure S1B). Remarkably, *SHMT2* KO cells were completely refractory to the regulatory action of metformin on the SAH and SAM levels, and consequently its ability to enhance SAM:SAH ratio-related DNA methylation was blunted (Figure 1c, left). Accordingly, both the global 5-mC content of genomic DNA (Figure 1c, right) and the LINE-1-associated 5-mC content (Supplementary Figure S1B) remained unaltered in metformin-treated *SHMT2* KO cells.

Metformin regulation of the SAM:SAH ratio/DNA methylation is coupled to mitochondrial complex I activity

The inability of *SHMT2* KO cells to modify not only SAM but also SAH levels in response to metformin strongly suggested that metformin might interfere with the recently recognized contribution of serine mitochondrial one-carbon flux to energy generation by coupling cytosolic one-carbon release to CI activity.<sup>34</sup> We therefore predicted that the ability of metformin to modify SAM:SAH ratio-related DNA methylation should involve its primary molecular target, CI, and that a more efficient mitochondrial delivery of metformin to CI should promote a greater increase in SAM:SAH ratio-related methylation.

We evaluated the ability of metformin to regulate SAM and SAH as well as global DNA methylation in a subline of metastatic 4T1 mammary carcinoma cells depleted of mitochondrial DNA ( $\rho^0$  cells).<sup>38</sup> Using 4T1 parental cells, we reconfirmed the apparently universal capacity of metformin to significantly decrease SAH levels (Figure 3a, left) irrespective of the cellular model employed (non-cancerous, cancer-prone, and metastatic cancer cells). As expected, the metformin-provoked increase in SAM resulted in a dramatic increase in SAM:SAH ratio-related methylation, which was accompanied by a significant increase in global 5-mC content in the genomic DNA of 4T1 cells (Figure 3a, right). By contrast, CI-deficient  $\rho^0$  cells were almost completely refractory to the regulatory action of metformin on SAH and SAM levels and, consequently, its ability to enhance SAM:SAH ratio-related methylation was prevented (Figure 3a, left). Accordingly, the global 5-mC content of genomic DNA was unaltered in metformin-treated  $\rho^0$  cells (Figure 3a, right). A similar *on-off* response in terms of CI-dependent regulation of the SAM:SAH ratio and global DNA methylation was also observed with the mitochondria-targeted nMM<sup>30,39</sup> and the non-targeted PHEN,<sup>31</sup> used at a concentration that was ineffective for metformin (Figure 3b). Thus, whereas nMM and PHEN dramatically augmented the 5-mC content by two- to five-fold, respectively, in mitochondria-replete cells, this capacity was blunted in  $\rho^0$  cells. Remarkably, whereas nMM and PHEN failed to modulate SAM levels in nontransformed fibroblasts (data not shown), they could promote a significant accumulation of SAM in 4T1 metastatic cells (Figure 3b), likely reflecting an inherent dependency of tumor cells to an overactive coupling of the mitochondrial one-carbon flux with CI activity.

## DISCUSSION

There is an urgent need to elucidate the mechanism(s) through which metformin-driven metabolic rewiring might directly or indirectly translate into regulatory epigenetics. Our results showing the robust capacity of metformin to decrease intracellular SAH, a strong feedback inhibitor of SAM-dependent methyltransferases including DNMTs, lend mechanistic support to the recent finding that metformin alters DNA methylation genome-wide by indirectly activating SAH hydrolase in an AMPK-dependent manner.<sup>5</sup>

Although we should emphasize that further studies are required to understand the ultimate molecular determinants causing a large variation of SAM, SAH and 5-mC across the different cell models employed in our study (for example, culturing conditions affecting baseline SAM:SAH ratios, differential baseline contribution of methionine versus serine metabolism, baseline expression levels of either folate-cycle enzymes (SHMT/MTHFD/MTHFR) or *N*-methyltransferase—NNMT, a cytosolic enzyme that catalyzes the transfer of the methyl group from SAM to nicotinamide, generating SAH as a product<sup>40</sup>) and their causal relationship with *de novo* DNA methylation and its turnover, it is noteworthy that metformin-promoted global DNA methylation appear to operate

regardless of the SAM/SAH/5-mC metabolo-epigenetic landscape at baseline; accordingly, metformin-induced global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism is not restricted to primary cancer cells since it also occurs in non-cancerous fibroblasts, cancer-prone breast epithelial cells and metastatic cancer cells. We confirm that metformin can regulate/influence the DNA methylome not only by promoting site-specific hypermethylation at certain tumor-promoting loci,<sup>5</sup> but also by enhancing global DNA methylation including in LINE-1 retrotransposon sites. Because methylation of LINE-1 is also maintained by DNMTs,<sup>16–18</sup> the ability of metformin to relieve the SAH-driven prevention of DNMT-mediated DNA methylation might provide a common regulatory axis of global and gene-specific methylation changes. While our findings confirm the role of AMPK in the capacity of metformin to decrease SAH levels, they also raise the interesting possibility that loss of AMPK by itself contributes to DNA methylation<sup>41</sup> independently of, or in addition to, the ability of metformin to activate the energy-sensing function of AMPK. More work is needed to determine whether specific AMPK catalytic isoenzymes might independently mediate global DNA methylation in the presence of metformin and/or whether the direction of metformin-mediated DNA methylation change might depend upon AMPK-regulated pre-existing DNA methylation levels. Although phenformin elicited the strongest augmentation of the phosphorylated/total-AMPK ratio, it was that such pharmacological activation of AMPK was accompanied by a striking reduction of total-AMPK. Although our findings agree with previous research similarly revealing such phenformin-induced downregulation of total-AMPK,<sup>42–44</sup> one should acknowledge that many other studies did not show any change in total-AMPK in response to phenformin.<sup>43–45</sup> Further assessment of this discrepancy is required to clarify the mechanisms involved, including a previously suggested compartment-specific (nuclear versus cytoplasmic) effects of phenformin on phospho-active AMPK vs total-AMPK<sup>42</sup> or phenformin-induced degradation of AMPK specific subunits.<sup>46,47</sup>

Our findings agree with and mechanistically extend recent studies showing that the capacity of cancer cells to adaptively utilize mitochondrial substrates such as serine might dictate the individual response of tumors to biguanides such as metformin.<sup>48–50</sup> Because metformin has been shown to promote the accumulation of tetrahydrofolate forms carrying activated one-carbon units, which can be critical to boost the level of SAM and SAM-related methylation,<sup>51,52</sup> studies are ongoing in our laboratory to uncover whether the coupling between metformin-targeted mitochondria and changes to global and regional DNA methylation patterns might relate to its unforeseen ability to directly inhibit enzymes required for one-carbon metabolism regardless of serine origin such as SHMT2 and MTHF enzymes.<sup>53,54</sup> Nevertheless, our findings showing that loss of either *SHMT2* or CI phenocopy each other in preventing an increase in SAM:SAH ratio-related DNA methylation, strongly suggest that metformin acts on the same pathway that allows the folate cycle to operate as an alternative route of serine metabolism, in which one-carbon release is coupled to CI activity to generate energy.<sup>34</sup> Metformin appears to reprogram the store methylation units and their channeling to affect the methylation status of DNA by increasing the contribution of one-carbon units to the SAM from folate stores while decreasing SAH in response to AMPK-sensed energetic crisis (Figure 3c). The metformin's capacity to target the dual anabolic/catabolic nature of the serine mitochondrial one-carbon/CI flux and influence over DNA methylation patterns could represent an unforeseen dimension of metformin and mitochondria-targeted metformin derivatives to modulate the cancer epigenome for therapeutic benefit.



## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines

MCF10A cell line with heterozygous knock-in of a 2-bp deletion of *BRCA1* resulting in a premature termination codon at position 39 (Cat# HD 101-018), HCT116 cell line with heterozygous knock-in of *IDH1* dominant-negative (R132H) point mutation (Cat# HD 104-013) and HAP1 cell line edited by CRISPR/Cas to contain a 2-bp deletion in a coding exon of *SHMT2* (Cat# HZGHC001954c006) were obtained from Horizon Discovery Ltd., Cambridge, UK. SV40 T-antigen-immortalized *ampk*<sup>+/+</sup> and *ampk*<sup>-/-</sup> MEFs, the latter bearing a double knockout of the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  subunits of AMPK, were generated as described previously.<sup>55</sup> For the preparation of  $\rho_0$  cells, 4T1 parental tumor cell line was cultured for 10–12 weeks in low-dose EtBr (50–100 ng/ml) supplemented with 1 mmol/l pyruvate and 50  $\mu$ g/ml uridine followed by transfer to medium lacking EtBr as described previously.<sup>38</sup> All cell lines were free of *Mycoplasma* contamination and were not re-authenticated.

### Metabolomic analyses

Targeted measurements of the metabolites SAH and SAM were performed by employing a previously described quantitative method based on ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to an electrospray ionization source and a triple-quadrupole mass spectrometer (UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS).<sup>14</sup> Raw data were processed and compounds were detected and quantified using the Qualitative and Quantitative Analysis B.06.00 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), respectively.

### Global DNA methylation

The MethylFlash Methylated DNA 5-mC quantification (Cat# P-1034; Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA) and Global DNA Methylation LINE-1 (Cat# 55017; Active Motif Inc., Carlsbad, CA, USA) kits were employed in accordance with the manufacturer's instructions. Enzymatic hydrolysis of DNA samples and high-pressure liquid chromatography using conventional UV absorbance detection at 270 nm (HPLC-UV) analyses to determine the 5-mC content in genomic DNA samples were performed as described previously.<sup>56</sup>

### AMPK activation

The activation of phosphorylation and total expression of AMPK was assessed using phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) (40H9) rabbit mAb (Cat#2535) and AMPK $\alpha$  (D5A2) rabbit mAb (Cat#5831) purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). Immunoreactive bands on membranes were scanned and quantified using ImageJ software.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using XLSTAT 2010 (Addinsoft). For all experiments, at least three independent experiments were performed with  $n \geq 3$  replicate samples per experiment. No statistical method was used to predetermine sample size. Investigators were not blinded to data allocation. Experiments were not randomized. Data are presented as mean  $\pm$  s.d. Results from targeted metabolomics were compared using Kruskal–Wallis tests with Dunn's correction. Comparisons of means of  $\geq 3$  groups were performed by ANOVA, and the existence of individual differences, in case of significant F values at ANOVA, were tested by Scheffé's multiple contrasts. *P*-values  $< 0.05$  were considered to be statistically significant (denoted as \*). All statistical tests were two-sided.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2016-80639-P), Plan Nacional de I+D+I, Spain and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (Grant 2014 SGR229), Department d'Economia i Coneixement, Catalonia, Spain, to Javier A Menendez and grants from the Czech Science Foundation (16-12816S) to Jan Stursa and Lukas Werner and the Czech Health Research Council (16-31704A) to Jiri Neuzil. Elisabet Cuyàs is supported by a Sara Borrell post-doctoral contract CD15/00033 from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Spain, The Metabolism and Cancer laboratory is supported by an unrestricted grant from the

Armangué family (Girona, Catalonia). This work is in memory of Joan Armangué who passed away after his brave fight against cancer in November 2016.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JAM conceived the idea, directed the project and wrote the manuscript. EC, SF-A, SV, RA-FG, MM-B and EB-G conducted metabolomic, ELISA/HPLC-based DNA methylation and western blot experiments, and analyzed the data. JS and LW provided essential reagents. JN and BV provided essential reagents, intellectual insights and critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- 1 Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a Tool to target aging. *Cell Metab* 2016; **23**: 1060–1065.
- 2 López-Otín C, Galluzzi L, Freije JM, Madeo F, Kroemer G. Metabolic control of longevity. *Cell* 2016; **166**: 802–821.
- 3 Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, Michelakis ED. Metabolic control of epigenetics in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**: 694–707.
- 4 Sharma U, Rando OJ. Metabolic inputs into the epigenome. *Cell Metab* 2017; **25**: 544–558.
- 5 Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A *et al*. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene* 2017; **36**: 2345–2354.
- 6 Zhou J, Yang L, Zhong T, Mueller M, Men Y, Zhang N *et al*. H19 lncRNA alters DNA methylation genome wide by regulating S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Nat Commun* 2015; **6**: 10221.
- 7 Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD *et al*. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr* 2001; **131**: 2811–2818.
- 8 Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000; **348**: 607–614.
- 9 Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E *et al*. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife* 2014; **3**: e02242.
- 10 Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S *et al*. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene *BRCA1* leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 17773–17778.
- 11 Menendez JA, Folguera-Blasco N, Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Joven J, Alarcón T. Accelerated geronogenesis in hereditary breast-ovarian cancer syndrome. *Oncotarget* 2016; **7**: 11959–11971.
- 12 Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Alarcón T, Lupu R, Joven J, Menendez JA. Germline *BRCA1* mutation reprograms breast epithelial cell metabolism towards mitochondrial-dependent biosynthesis: evidence for metformin-based 'starvation' strategies in *BRCA1* carriers. *Oncotarget* 2016; **7**: 52974–52992.
- 13 Sedic M, Skibinski A, Brown N, Gallardo M, Mulligan P, Martinez P *et al*. Haploinsufficiency for *BRCA1* leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence. *Nat Commun* 2015; **6**: 7505.
- 14 Fernández-Arroyo S, Cuyàs E, Bosch-Barrera J, Alarcón T, Joven J, Menendez JA. Activation of the methylation cycle in cells reprogrammed into a stem cell-like state. *Oncoscience* 2016; **2**: 958–967.
- 15 De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J *et al*. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 2013; **12**: 247–256.
- 16 Miosse IR, Koturbash I. The Fine LINE: methylation drawing the cancer landscape. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 131547.
- 17 Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clin Epigenet* 2011; **2**: 315–330.
- 18 Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv* 2016; **2**: e1600584.
- 19 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al*. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; **133**: 704–715.
- 20 Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA *et al*. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; **138**: 645–659.
- 21 Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Cufí S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle* 2010; **9**: 3807–3814.

- 22 Cuyàs E, Corominas-Faja B, Menendez JA. The nutritional phenome of EMT-induced cancer stem-like cells. *Oncotarget* 2014; **5**: 3970–3982.
- 23 Banerjee P, Surendran H, Chowdhury DR, Prabhakar K, Pal R. Metformin mediated reversal of epithelial to mesenchymal transition is triggered by epigenetic changes in E-cadherin promoter. *J Mol Med (Berl)* 2016; **94**: 1397–1409.
- 24 Yang M, Soga T, Pollard PJ. Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest* 2013; **123**: 3652–3658.
- 25 Duncan CG, Barwick BG, Jin G, Rago C, Kapoor-Vazirani P, Powell DR et al. A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res* 2012; **22**: 2339–2355.
- 26 Menendez JA, Corominas-Faja B, Cuyàs E, García MG, Fernández-Arroyo S, Fernández AF et al. Oncometabolic nuclear reprogramming of cancer stemness. *Stem Cell Rep* 2016; **6**: 273–283.
- 27 Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)* 2012; **122**: 253–270.
- 28 Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab* 2014; **20**: 953–966.
- 29 Pollak M. Potential applications for biguanides in oncology. *J Clin Invest* 2013; **123**: 3693–3700.
- 30 Boukalova S, Stursa J, Werner L, Ezrova Z, Cerny J, Bezawork-Geleta A et al. Mitochondrial targeting of metformin enhances its activity against pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2016; **15**: 2875–2886.
- 31 Bridges HR, Sirviö VA, Agip AN, Hirst J. Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase. *BMC Biol* 2016; **14**: 65.
- 32 Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol* 2016; **214**: 249–257.
- 33 Meiser J, Vazquez A. Give it or take it: the flux of one-carbon in cancer cells. *FEBS J* 2016; **283**: 3695–3704.
- 34 Meiser J, Tumanov S, Maddocks O, Labuschagne CF, Athineos D, Van Den Broek N et al. Serine one-carbon catabolism with formate overflow. *Sci Adv* 2016; **2**: e1601273.
- 35 Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**: 572–583.
- 36 Kotecki M, Reddy PS, Cochran BH. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res* 1999; **252**: 273–280.
- 37 Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp BV, Kralovics R et al. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res* 2014; **24**: 2059–2065.
- 38 Tan AS, Baty JW, Dong LF, Bezawork-Geleta A, Endaya B, Goodwin J et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab* 2015; **21**: 81–94.
- 39 Cheng G, Zielonka J, Ouari O, Lopez M, McAllister D, Boyle K et al. Mitochondria-targeted analogues of metformin exhibit enhanced antiproliferative and radiosensitizing effects in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2016; **76**: 3904–1395.
- 40 Ulanovskaya OA, Zuhl AM, Cravatt BF. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 300–306.
- 41 Yang Q, Liang X, Sun X, Zhang L, Fu X, Rogers CJ et al. AMPK/α-ketoglutarate axis dynamically mediates DNA demethylation in the Prdm16 promoter and brown adipogenesis. *Cell Metab* 2016; **24**: 542–554.
- 42 Kodiha M, Ho-Wo-Cheong D, Stochaj U. Pharmacological AMP-kinase activators have compartment-specific effects on cell physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; **301**: C1307–C1315.
- 43 Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 2013; **494**: 256–260.
- 44 Talarico G, Orecchioni S, Dallaglio K, Reggiani F, Mancuso P, Calleri A et al. . Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Sci Rep* 2016; **6**: 18673.
- 45 Huang X, Wullschlegler S, Shpiro N, McGuire VA, Sakamoto K, Woods YL et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem J* 2008; **412**: 211–221.
- 46 Houde VP, Ritoro MS, Gourlay R, Varghese J, Davies P, Shpiro N et al. Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. *Biochem J* 2014; **458**: 41–56.
- 47 Ross FA, Jensen TE, Hardie DG. Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochem J* 2016; **473**: 189–199.
- 48 Gravel SP, Hulea L, Toban N, Birman E, Blouin MJ, Zakikhani M et al. Serine deprivation enhances antineoplastic activity of biguanides. *Cancer Res* 2014; **74**: 7521–7533.
- 49 Liu X, Romero IL, Litchfield LM, Lengyel E, Locasale JW. Metformin targets central carbon metabolism and reveals mitochondrial requirements in human cancers. *Cell Metab* 2016; **24**: 728–739.
- 50 Maddocks ODK, Athineos D, Cheung EC, Lee P, Zhang T, van den Broek NJF et al. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 2017; **544**: 372–376. .
- 51 Corominas-Faja B, Quirantes-Piné R, Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martín A, Cufí S, Martín-Castillo B et al. Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging (Albany NY)* 2012; **4**: 480–498.
- 52 Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cochemé HM, Noori T et al. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell* 2013; **153**: 228–239.
- 53 Newman AC, Maddocks ODK. One-carbon metabolism in cancer. *Br J Cancer* 2017; **116**: 1499–1504.
- 54 Newman AC, Maddocks ODK. Serine and functional metabolites in cancer. *Trends Cell Biol* 2017; **27**: 645–657.
- 55 Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J et al. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 5336–5347.
- 56 Iglesias T, Espina M, Montes-Bayón M, Sierra LM, Blanco-González E. Anion exchange chromatography for the determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine: application to cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines. *Anal Bioanal Chem* 2015; **407**: 2423–2431.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

## ICP - Mass Spectrometry

## Authors:

Michail-Ioannis Chronakis

Emmanuil Mavrakis

Spiros A. Pergantis

University of Crete  
Greece

Roberto R. Álvarez-Fernández García

University of Oviedo  
Spain

Chady Stephan

PerkinElmer Inc.  
Woodbridge, ON, Canada

## Monitoring the Fate of Silver Nanoparticles in Seawater Using Single Particle ICP-MS

demonstrated tremendous potential for the measurement and characterization of metal-containing nanoparticles (NPs) in a wide range of sample types, including biological, environmental and food samples. One of the most challenging matrices is seawater due to its high salt content, which causes severe difficulties when analyzed for NPs due to matrix suppression and cone clogging. However, even though sample dilution prior to analysis would be a straightforward way to overcome these difficulties, we have decided to avoid it because it may cause NP transformation due to changes in the ionic strength and/or the organic content of the seawater matrix. Instead, we are using a sample introduction system that can perform such a dilution only milliseconds before the sample is nebulized into the ICP-MS. In addition, it is imperative that the SP-ICP-MS system used for monitoring NPs in seawater has appropriate characteristics that provide the required analytical performance, including:

- A sample introduction system that allows for the continuous and high-throughput introduction of undiluted seawater into the ICP-MS;
- An ICP-MS quadrupole mass analyzer and detector system that can operate under extremely short dwell times ( $\mu\text{s}$ ) with zero settling time;
- Data processing software that can automatically process single particle data in near real time.

### Introduction

Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry (SP-ICP-MS) is an analytical technique that has

The work presented here demonstrates the ability to measure and characterize silver (Ag) nanoparticles in seawater samples taken from tanks that are part of a large-scale seawater mesocosm experiment. The main challenge, apart from the seawater matrix, was the time-sensitive nature of the sample analysis. Ag nanoparticles will transform quickly in seawater, so samples must be analyzed immediately upon arrival in the laboratory, without prior dilution. Being able to process the acquired SP data in almost real time was vital for monitoring the progress of the overall seawater mesocosm experiment and for taking corrective action rapidly when required.

## Experimental

### Mesocosm Experiment

Samples were collected from a mesocosm experiment similar to one previously described.<sup>1</sup> In brief, six mesocosm tanks were each filled with 3000 L of seawater. Three tanks served as controls, whereas the other three tanks were each spiked daily with Ag NPs at 50 ng/L Ag. The 60 nm Ag NP material used here was coated with branched polyethylenimine (BPEI). Seawater samples were taken in the morning from each tank, just before the daily addition of “fresh” Ag NP suspensions, for ten consecutive days. Samples were then transferred to the laboratory for immediate SP-ICP-MS analysis.

More specifically, every morning 50 mL of seawater was collected from each mesocosm tank using silicone tubing, permanently placed in the center of each tank 1 to 1.5 m beneath the water surface. A large-volume syringe was used to create light suction and thus transfer seawater via this tubing into sampling tubes. The samples were transferred to the laboratory for immediate analyses. Subsequently to the sampling, a Ag NP suspension (1 L of approximately 150 µg/L Ag, depending on the daily volume of each mesocosm tank) was added daily to each of the three tanks by releasing it onto the seawater surface of the mesocosm tank. Finally, the seawater content of each tank was gently mixed using a dedicated paddle for each tank.

### Instrumental Conditions

A modified version of the sample introduction system already described was used in this study (Figure 1).<sup>2</sup> The modification involved using a syringe pump with a 500 µL glass syringe, thus avoiding the need to use a sample injection loop, which in some cases could cause NP contamination. The modified sample introduction system proved to be extremely efficient, stable, versatile and easy to clean, showing both its improved robustness and viability for continuous use for high throughput NP determination in seawater samples. Approximately 200 µL of each seawater sample were taken up in a glass syringe and analyzed. The syringe pump delivered the sample at a flow rate of 20 µL/min. Samples were diluted 40x online using a T-piece at the tip of the pneumatic nebulizer, so essentially the sample is analyzed immediately giving no time for Ag NP transformation to occur, as the mixing due to dilution lasts for approximately 200 ms prior to nebulization.

All analyses were executed on a NexION® ICP-MS, using the conditions given in Table 1. A dwell time of 75 µs was used. Data acquisition and analysis were performed using the Syngistix™ Nano Application software module.

Table 1. NexION ICP-MS Instrumental Parameters for the Determination of Ag NPs in Seawater.

Parameter	Value
Sample delivery rate via syringe pump	20 µL/min
Deionized water makeup rate via peristaltic pump	800 µL/min
Nebulizer	Glass Concentric MEINHARD® Type C modified with the insertion of a fused silica capillary (100 µm id, 200 µm od) via the central nebulizer channel (for details, see Figure 1)
Spray chamber	Glass Cyclonic
RF power	1600 W
Analyte	<sup>107</sup> Ag
Analysis time	2 x 3 min
Dwell time	75 µsec

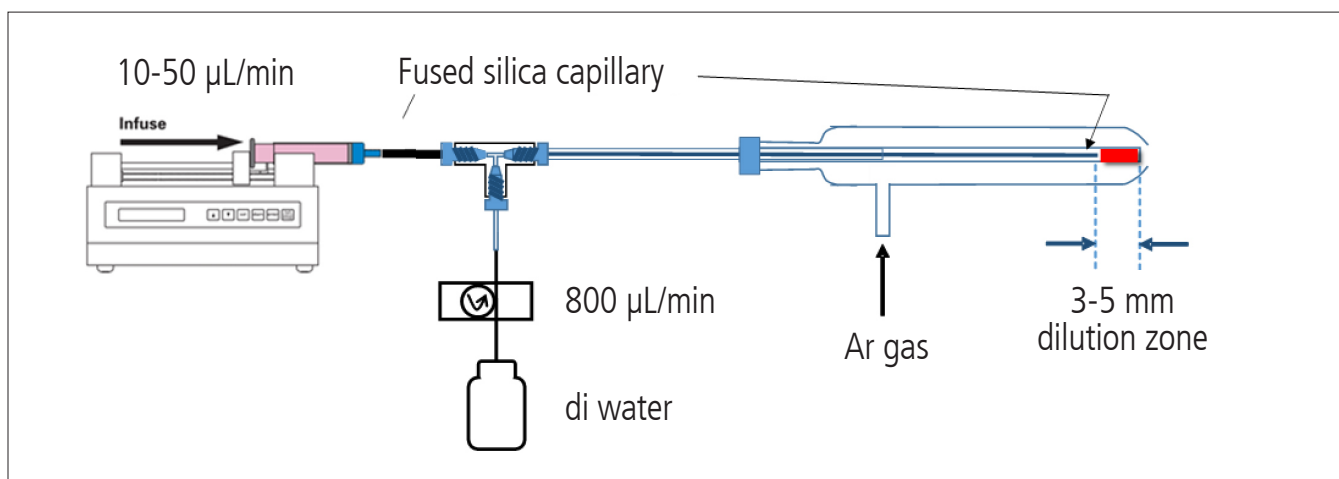


Figure 1. Sample introduction system used for the analysis of Ag NPs in seawater.

## Samples and Standards

Seawater samples were taken daily from the mesocosm tanks and immediately transferred to the laboratory for analysis (20-30 min travel time). Samples were not filtered or diluted prior to analysis using SP-ICP-MS.

Ag NPs coated with branched polyethylenimine (BPEI) were used throughout this study, both for spiking the mesocosm seawater and for preparing NP standards. Ag BPEI NP standards were made from a control seawater solution into which 100 ng of 60 nm Ag (Ag BPEI) NPs per L were added (this corresponds to approximately 42000 Ag BPEI NPs per mL). This standard was analyzed immediately in order to avoid the occurrence of NP dissolution (Figure 2) and was used both to calibrate for Ag NP size and to determine the transport efficiency (TE) in combination with the counting approach.

## Results and Discussion

The results presented in this application note correspond to the analysis of samples taken from a seawater mesocosm tank in which Ag BPEI NPs were introduced in the morning on a daily basis for a total of 10 days. More specifically, samples were taken daily just prior to the spiking of “fresh” Ag NP suspensions. The amount of Ag added as Ag NPs in each spiking session gave the tank an additional 50 ng/L Ag each day for a total of 10 days, thus a total Ag concentration of 500 ng/L throughout the experiment.

Figures 3 A-C show the size (diameter) distributions for the Ag NPs determined in the tank on day 0 + 2 hours, on day 5 and on day 10, as determined using the SP-ICP-MS setup shown in Figure 1. It is proposed that the Ag NPs gradually dissolve, as shown by the appearance of smaller-sized Ag NPs over time. However, the fact that “fresh” Ag NP suspensions are added daily contributes to the broadening of the NP size distribution towards higher sizes. Thus, much broader size distributions are observed the longer the NPs are present in the seawater and spiking continues.

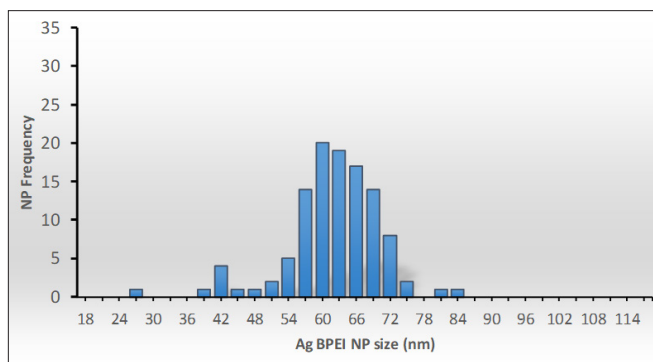


Figure 2. Ag BPEI NPs analyzed immediately after being added to control seawater to make a 100 ng/L Ag containing suspension. This suspension, made daily and immediately prior to sample analysis, was used as a particle calibration standard in the seawater matrix.

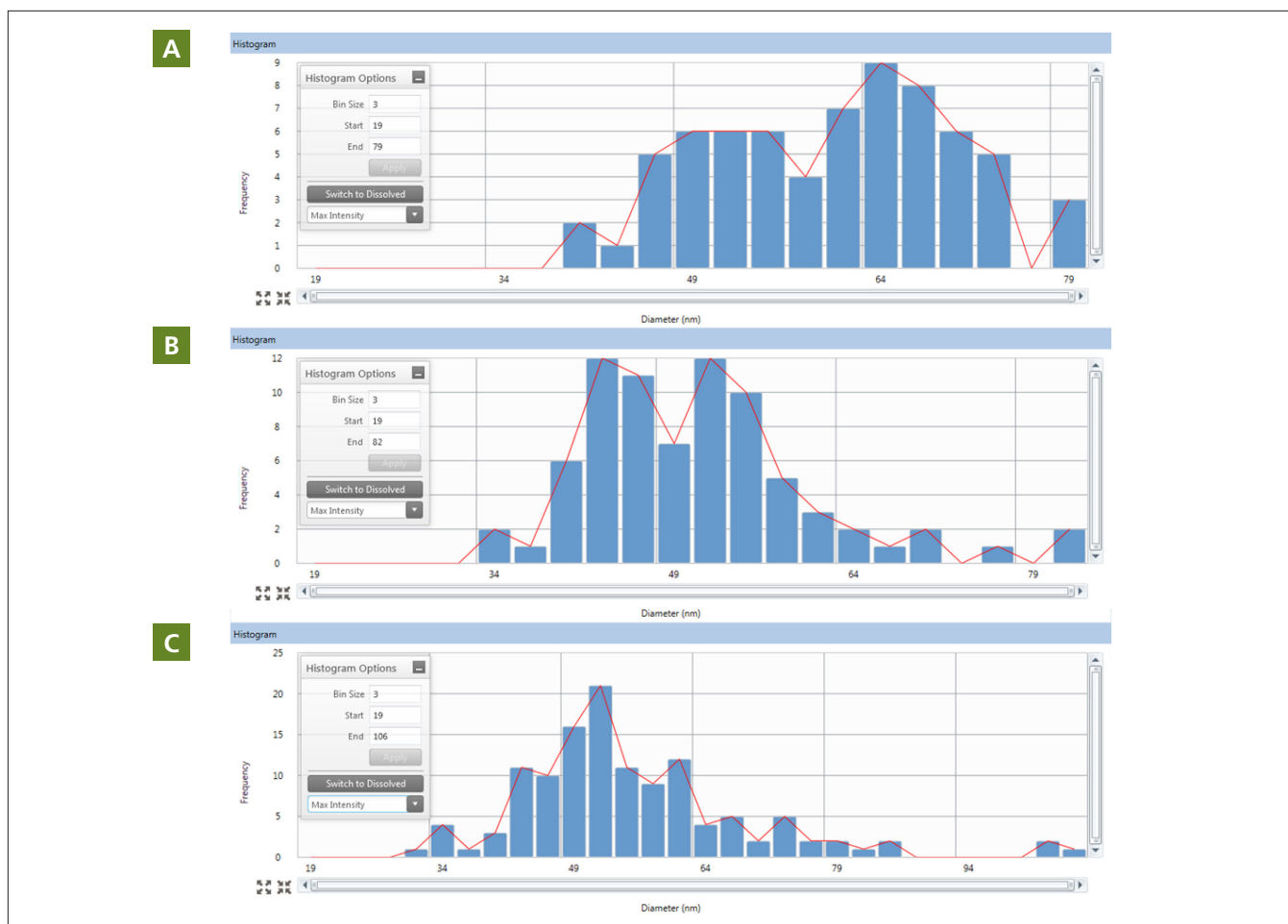


Figure 3. Ag NP size distributions as determined using SP-ICP-MS samples taken on day 0 + 2 hours (top-A), day 5 (center-B) and day 10 (bottom-C).

The dissolved Ag (i.e. Ag<sup>+</sup>) content of the samples was also determined during the SP-ICP-MS analysis. As expected, the dissolved Ag content increases over the mesocosm experiment's duration (Figure 4, dotted grey line). The system's Ag mass balance could be examined using SP-ICP-MS. It was observed that the total Ag mass (blue line) corresponding to the sum of the detected Ag NP (yellow dotted line) and the mass corresponding to the dissolved Ag (grey line) was in good agreement with the total Ag spiked into the mesocosm tank as Ag NPs (orange double line). This shows that the analytical system used was capable of accounting for almost all of the Ag mass added to the seawater mesocosm tanks, even though it had partially transformed into dissolved Ag.

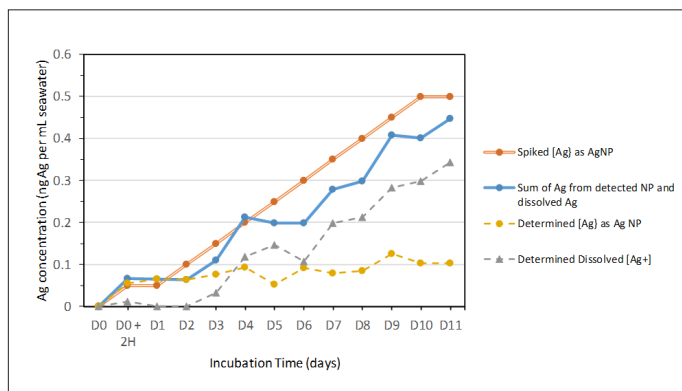


Figure 4. Mass balance diagram showing the levels of Ag spiked daily as Ag NPs, as well as the determined Ag corresponding to Ag NPs (yellow dotted line) and to dissolved Ag<sup>+</sup> (grey dotted line). Finally, the sum of the latter two (NP Ag plus dissolved Ag - blue line) are compared to the daily Ag spike levels (orange double line).

The unique capabilities of SP-ICP-MS also allowed for the determination of Ag NP number concentrations (Figure 5), which seemed to exhibit a net increase up to day 10. This was the result of daily replenishment as new Ag BPEI NPs were added daily at a rate greater than that of their dissolution.

Finally, it is worth stressing the tremendous stability and rapid computing power of this system. The complete mesocosm experiment, conducted for 11 days (and not explained in full detail in this application note), required the analysis of nine samples per day, analyzed three times each, plus the calibration standards (particle standard in seawater, as well as dissolved Ag standard in seawater). All data processing was provided in almost real time, and seawater samples could be analyzed continuously throughout the day without any signal reduction. Monitoring the results in such an automated fashion was vital for successfully conducting this type of seawater experiment, in collaboration with an interdisciplinary team of marine biologists and chemists.

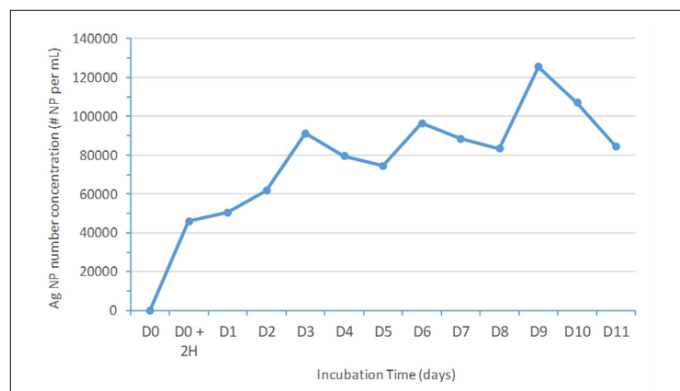


Figure 5. Ag NP number concentration variation with incubation time. On a daily basis, approximately 42000 Ag BPEI NP per mL with a diameter of 60 nm were added from day zero (D0) until day 10 (D10).

## Conclusion

Recent advances in ICP-MS instrumentation and software have improved our ability to conduct single particle analysis even in very difficult matrices such as seawater, allowing for such large-scale experiments which would have been extremely difficult using manual data processing. In contrast, present capabilities offered by PerkinElmer in the form of single particle analysis software (Syngistix Nano Application module) allow for almost real-time data analysis, which is vital for conducting such a large-scale incubation experiment in which "fresh" Ag NPs are added daily.

## References

1. Tsiola, A.; Toncelli, C.; Fodelianakis, S.; Michoud, G.; Bucheli, T. D.; Gavriilidou, A.; Pitta, P. (2018). Low-dose addition of silver nanoparticles stresses marine plankton communities. *Environmental Science: Nano*, 5(8), 1965–1980. <https://doi.org/10.1039/c8en00195b>
2. Toncelli, C.; Mylona, K.; Tsapakis, M.; Pergantis, S. A. (2016). Flow injection with on-line dilution and single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry for monitoring silver nanoparticles in seawater and in marine microorganisms. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(7), 1430–1439. <https://doi.org/10.1039/c6ja00011h>

*Current Trends in*

# MASS Spectrometry

March 2020

## Articles

### **Towards Automated Routine Analysis of the Distribution of Trace Elements in Single Cells Using ICP-MS**

**6****M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, and D.J. Kutscher**

Analysis of the compositional variation in living cells is essential for understanding biological processes. Single-cell elemental analysis by triple-quadrupole ICP-MS is emerging as a selective, highly sensitive, and potentially high-throughput technique for the study of constitutive elements, and uptake of metalloids (or metal-containing nanomaterials) in single cells.

### **Rapid Quantitation of PFAS in Non-Potable Waters**

**11****Ruth Marfil-Vega and Brahm Prakash**

The presence of per- and polyfluoralkyl substances (PFAS) in water is an important health and environmental concern. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) has been established as the most suitable technology for monitoring these substances. A method is described, using EPA 8327, for PFAS analysis in groundwater, surface water, and wastewater.

### **Affinity Selection-Mass Spectrometry: Defining the Bioactive Compounds in Complex Mixtures of Natural Products and Combinatorial Libraries**

**18****Richard B. van Breemen**

Drug discovery using high-throughput screening of discreet compounds, and the discovery of natural products with pharmacological mechanisms of action, rely on bioassay-guided fractionation analysis. Recent applications of affinity selection–mass spectrometry (AS-MS) are useful for exploring the discovery of ligands to membrane-bound proteins and RNA targets.

### **GC×GC–TOF-MS and Comprehensive Fingerprinting of Volatiles in Food: Capturing the Signature of Quality**

**26****Federico Stilo, Erica Liberto, Carlo Bicchi, Stephen E. Reichenbach, and Chiara Cordero**

Food quality differences are dependent on botanical and geographical origins of primary food ingredients as well as storage and handling. Quality assessment for food materials, including cocoa and olive oil, is demonstrated by applying two-dimensional gas chromatography (GC×GC) combined with time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) and pattern recognition.

## Departments

**Products . . . . . 33**

**Cover** image courtesy of Oleksii Sergieiev/stock.adobe.com.

# Towards Automated Routine Analysis of the Distribution of Trace Elements in Single Cells Using ICP-MS

Cell-to-cell variability is known to be of crucial importance to understand different biological processes. Studying the individual variations of, for example, trace elements in cell populations can be carried out only by means of single cell analysis techniques, and, for this aim, single cell elemental analysis by ICP-MS is emerging as a selective, highly sensitive, and potentially high-throughput technique. The study of constitutive elements, and uptake of metallodrugs (or metal-containing nanomaterials), are of special interest and importance. In this work, a highly efficient sample introduction system and a triple-quadrupole (TQ) ICP-MS, in combination with a dedicated microflow autosampler, was used for single cell analysis. This setup enables the transport of intact single cells to the inductively coupled plasma used as an ion source, with transport efficiencies over 50% for different cell lines. The analysis of single cells using an element selective detection system, such as an ICP-MS, allows one to study the elemental content of both intrinsic and exogenous elements. For some of the intrinsic elements, such as phosphorus, typically occurring spectral interferences need to be removed by using a triple-quadrupole based ICP-MS system. The strategy to analyze concentration distributions at single cell level will be presented for yeast cells. The selected combination of instruments enables fully automated, unattended, and potentially high-throughput analysis of single cells.

**M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, P. García-Cancela, M. Montes-Bayón, J. Bettmer, and D.J. Kutscher**

**T**he analysis of elements in biological systems has a long tradition, due to its importance for the understanding of their functions. Because of the increasing sensitivity of modern analytical techniques like inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), the determination of various elements in small individual objects like cells, called single cell analysis, is now possible. This significant improvement can provide insights into the biological variation of the elemental composition within a cell population. Other important information can be gathered for the cellular uptake of nanomaterials or pharmaceutical drugs.

Single cell ICP-MS usually refers to the introduction of a cell suspension via a nebulization system, although laser ablation

might be considered useful for this purpose as well. Similar to single-particle ICP-MS developed by Degueldre and associates in 2003, the concept of single cell ICP-MS is based on introducing a diluted cell suspension into the ionization source in combination with short integration times (between  $\mu\text{s}$  and a few ms) on the detector side (1). Once a cell enters the ionization source, it produces a plume of ions that can be registered at the detector as a short signal of approximately 500  $\mu\text{s}$  duration. The signal intensity for a certain isotope is related to the corresponding elemental mass within the cell and the frequency of signals (usually called *events*) correlates to the cell number concentration in the suspension. It was first shown by Li and colleagues, and forms the concep-



tual basis of recent approaches (2). Most critical of such a system is the sample introduction through nebulization. First, it requires the transport of intact cells until they reach the plasma, and, second, the transport efficiency should be as high as possible. Recent developments presented combinations of nebulizers and spray chambers that permit high efficiencies of up to 100% (3–5). In this work, we will present a highly efficient sample introduction system, and a triple- quadrupole (TQ) ICP-MS in combination with a dedicated microflow autosampler. Transport efficiencies will be illustrated on several examples. Finally, we will demonstrate the application to the analysis of yeast samples, in order to demonstrate the intracellular incorporation of elements by the commercial producer.

## Experimental

### Instrumentation

For all ICP-MS measurements, an iCAP TQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific) was used. For measurements of phosphorus, selenium, and chromium, TQ-O<sub>2</sub> mode was selected (mass shift from <sup>31</sup>P<sup>+</sup> to <sup>31</sup>P<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>80</sup>Se<sup>+</sup> to <sup>80</sup>Se<sup>16</sup>O<sup>+</sup> and <sup>52</sup>Cr<sup>+</sup> to <sup>52</sup>Cr<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, respectively, after reaction with oxygen in the reaction cell). For single cell measurements, the instrument was fitted to the high sensitivity single-cell sample introduction system for ICP-MS (Glass Expansion). The data were acquired using time-resolved analysis mode at a dwell time of 5 ms. All ICP-TQ-MS parameters are summarized in Table I.

Samples and rinsing solutions were introduced into the plasma at a flow rate of 10 µL/min, using the MVX-7100 µL workstation (Teledyne CETAC Technologies). This autosampler system is connected to the iCAP TQ through a trigger cable, which allows the unsupervised analysis of sample sequences. This system also offers the possibility of diluting and mixing the samples before the injection. Briefly, the workstation allows to place the samples in a cooled holder, where they are aspirated through an inert sample probe. Only the measured sample volume needs to be taken, because the sample is then brought to the injection loop. After settling the sample volume into the loop, a carrier flow pushes it to the sample introduction system. The carrier flow is also used as

washing solution, and, therefore, 2% nitric acid is used for this purpose. All internal parts of the autosampler are inert and metal-free. One sample can be analyzed in a total time of less than 7 min, with an effective measurement time of up to 3 min.

### Preparation of Cell Samples

Lyophilized yeast samples were resuspended in water, washed twice by centrifugation, and diluted to a final concentration of around 50,000 yeast cells per mL in water (determined by flow

cytometry). Similarly, the other cell lines (A2780 and GM04312) were washed with a TBS solution, and finally diluted to approximately 25,000 cells per mL.

### Data Treatment

As previously reported (4,6), each data set was averaged, and the data points higher than three or five standard deviations over the mean were considered as cell or particle events. This procedure was iterated, after removal of the events, until no new data points above the threshold were de-

## SMART LABS CHOOSE ON-SITE GAS GENERATION



## H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> AND ZERO AIR ON-DEMAND

- Consistent Purity
- Consistent Pressure
- Proven Safe
- Cost Effective
- Eliminates Cylinder Storage and Delivery Issues



Pittcon • March 3-5 • Chicago, IL  
ACS Spring • March 22-26 • Philadelphia, PA

**PROTON**<sup>®</sup>  
ON SITE

+1.203.949.8697  
www.ProtonOnSite.com

Table I: Instrumental ICP-MS parameters for single cell analysis	
ICP-MS Parameters	Parameter Value
Instrument	iCAP TQ ICP-MS
RF Power (W)	1250
Plasma gas flow rate (L/min)	14.0
Auxiliary flow rate (L/min)	0.8
Carrier gas flow rate (L/min)	0.5
O <sub>2</sub> Cell gas flow rate (mL/min)	0.3
Nebulizer and spray chamber	High sensitivity single-cell sample introduction system
Sheath gas flow rate (L/min)	0.31
Sample introduction	MXV-7100 workstation
Data Acquisition Parameters	
Data acquisition mode	Time-resolved analysis
Sample flow rate (μL/min)	10
Dwell time (ms)	5
Run time (s)	120 - 180
Isotopes monitored	<sup>31</sup> P+ <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>80</sup> Se+ <sup>80</sup> Se <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>52</sup> Cr+ <sup>52</sup> Cr <sup>16</sup> O <sup>+</sup>

Table II: Obtained transport efficiencies for different cell lines	
Cell Line (Cell Number Concentration, per mL)	Transport Efficiency (%)
A2780 (25,000)	50 - 58
GM04312 (25,000)	85 - 95
Yeast cells (50,000)	62 - 69

tected. All single-cell or particle signals higher than three standard deviations above their mean were discarded as multiple-cell or particle events.

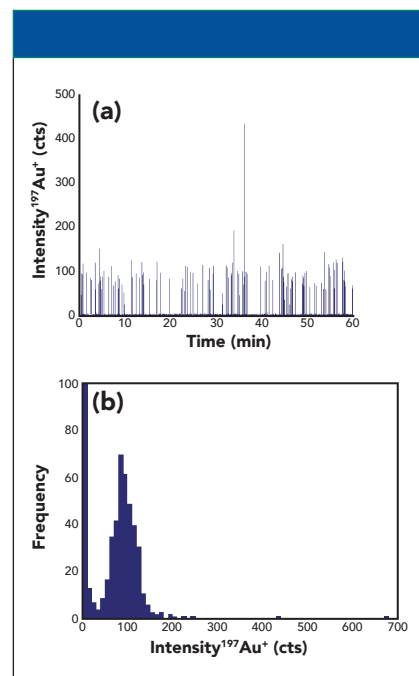
## Results and Discussion

### Transport Efficiency of the Sample Introduction System

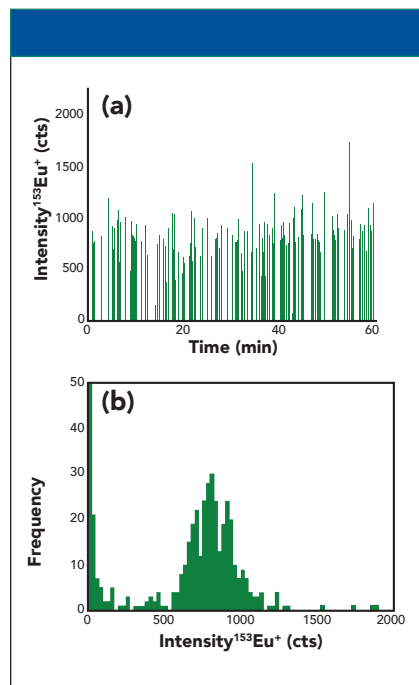
The transport efficiency of the liquid elemental standards for mass determination was calculated using the 30 nm gold nanoparticles reference material NIST 8012, as previously reported (4). A typical measurement of gold nanoparticles and its corresponding histogram is shown in Figure 1. The average signal was  $99 \pm 10$  counts per nanoparticle, and 124 nanoparticles per minute were detected. The transport efficiency was calculated by dividing the number of detected particles by the number of particles in the suspension, which was calculated using the certified values of gold concentration and particle size. The transport efficiency calculated in this manner resulted to be 55% for 30 nm gold nanoparticles.

In order to mimic the transport efficiency of cells (an important factor for the determination of the cell number concentration), europium-loaded calibration beads (Fluidigm) were used. This calibration standard contains  $3.3 \times 10^5$  natural isotopic europium-loaded polystyrene beads per mL, with a particle size of 3 μm. These particles are better comparable to cells in terms of particle size and matrix composition than gold nanoparticles. After 10 times dilution in water, a typical measurement of polystyrene calibration beads and its corresponding histogram is shown in Figure 2. In this case, 174 particles per minute were detected, with an average intensity of  $818 \pm 101$  counts per particle. The transport efficiency was 51% for the calibration beads, showing that there is no significant change in the transport efficiency when calculated with gold nanoparticles or polystyrene beads.

For the determination of the cell transport efficiency, the strategy applied was initially to determine the cell number concentration of the suspension by



**Figure 1:** (a) Time-resolved signal and (b) histogram for the measurement of a suspension of 24000 particles per mL of the 30 nm gold nanoparticle standard NIST 8012.



**Figure 2:** (a) Time-resolved signal and (b) histogram for the measurement of a 33000 beads per mL suspension of polystyrene calibration beads loaded with Eu.

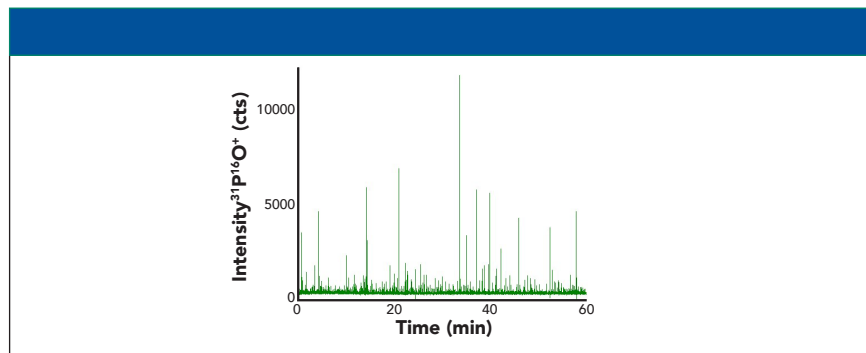
flow cytometry (4). This determination served as a reference for the following single cell ICP-MS experiments. In a recent work, we suggested, either after the uptake of a non-toxic terbium-con-

taining complex or the detection of the constitutive element iron, for counting cell events by ICP-MS (4). Since the ICP-TQ-MS offers the sensitive detection of other constitutive elements like phosphorous, we figured out that this element was better suited as a general ICP-MS cell marker. Due to its ubiquitous presence in biological systems (in form of DNA, RNA, phosphate, phospholipids, and so forth), the detection of  $^{31}\text{P}^+$  with a mass shift to  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  after reaction with oxygen turned out to be a good indicator for the presence and number of cells. Figure 3 shows a typical example of the time-resolved analysis of GM04312 cells in the single cell mode. Cell events could be clearly distinguished from the background using the criteria mentioned in paragraph “data treatment.” The number of detected cell events was then set into relation to the theoretically expected cell number, as obtained from the flow cytometric experiments, and the resulting ratios were equal to the transport efficiencies.

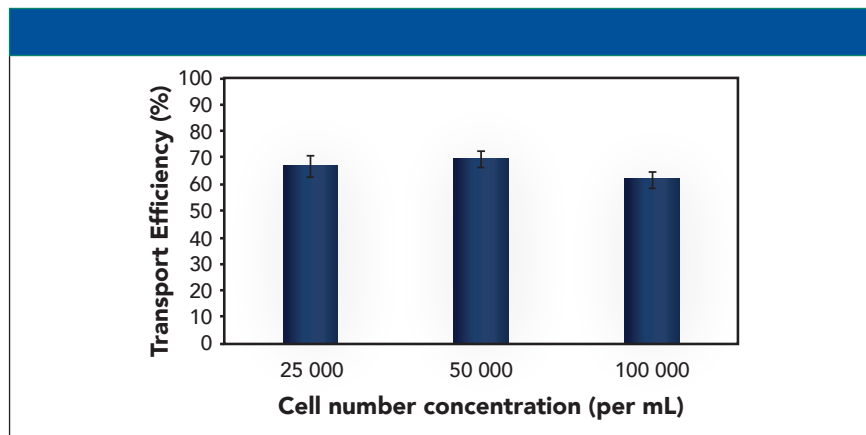
The different cell lines showed the transport efficiencies, as summarized in Table II. Differences between the cell types could be observed, and might be explainable by the differing cell shapes, robustness, and sizes. The day-to-day variations were in the order of 5% absolute, and the transport efficiency was virtually independent from the introduced cell number concentration (Figure 4). Initial experiments on the effect of cell sedimentation showed that any influence was negligible up to 30 min analysis time. In any case, the sample introduction system used offers in principle a resuspending step. Quantification of different elements in individual cells was carried out after external calibration using single elemental standards, and the required transport efficiency for the aqueous standard was obtained by correlating it to a standard of gold nanoparticles (NIST 6012 or NIST 6013) (4,7).

#### Analysis of Commercially Available Yeast Samples

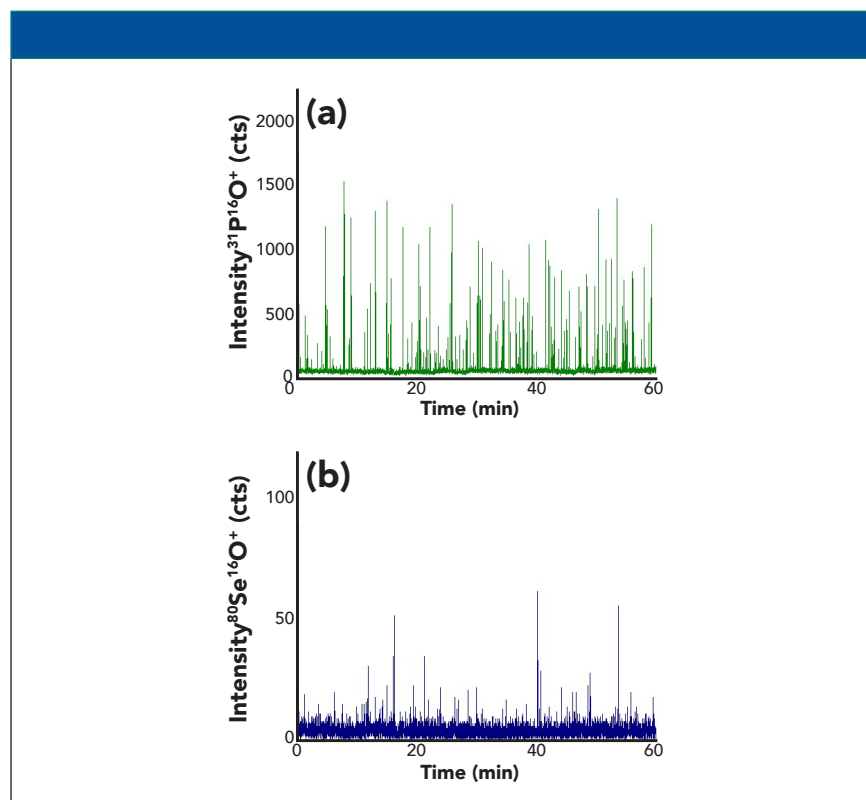
Nutritional yeast is sold commercially as a food product, but yeast with added elements like selenium, calcium, chromium, and others can be found in various pharmacies as food supplement products. They should support the supply of essen-



**Figure 3:** Time-resolved signal of phosphorus for the measurement of a 25,000 GM04312 cells per mL.



**Figure 4:** Transport efficiency of yeast cells in function of the cell number concentration.



**Figure 5:** (a) Time-resolved signal of phosphorus and (b) selenium for the measurement of a selenized yeast sample.

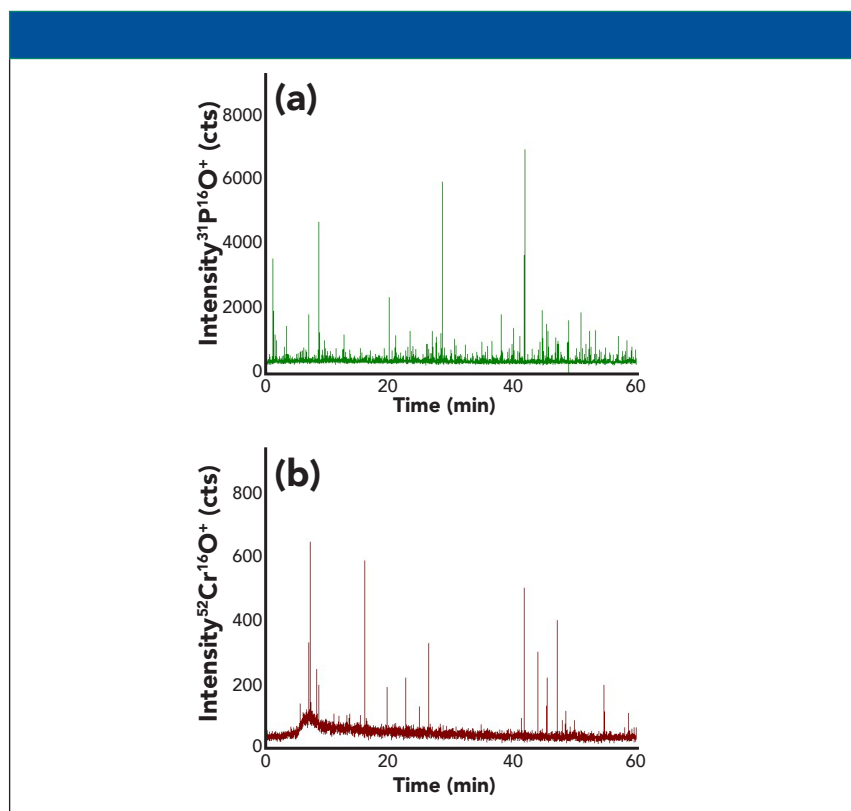
tial elements to the human body in case of deficiency. The control of quality of these products is essential, and here we applied the single cell ICP-MS approach to investigate the cellular incorporation of the added elements. As examples, the results on commercially available yeast products enriched in selenium and chromium are shown.

The strategy was to determine the total number of cells by measuring phosphorus and then compare it with the number of cell events in which the sought elements were detectable (7). In order to discriminate between cell events and background signals, the procedure as described in the paragraph *data treatment* was followed.

Typical time-resolved measurements for the elements phosphorus and selenium are shown in Figure 5. Phosphorus again served as a cell marker, and the resulting ratio between cell events containing selenium and the number of cells detected by monitoring phosphorus resulted in 62%. That means that only two-thirds of the yeast cells incorporated selenium, at least above the detection limit for selenium (0.16 fg per cell [7]). The detected amounts of selenium per cell were between 0.5 and 30 fg. It can be concluded that an active cell incorporation occurred during the production of the so-called “selenized yeast.”

In the case of the yeast enriched with chromium, the same strategy was followed. Figure 6 reflects the observations for monitoring phosphorus and chromium in the single cell mode. It becomes clearly visible that much less cell events were observable for the chromium trace. Furthermore, the background signals were relatively high, indicating the presence of dissolved chromium in the cell suspension, even after the applied washing steps. These findings showed that either the yeast cells were not actively incorporating chromium, or the cells were just mixed with an unknown chromium species.

In any case, these preliminary results demonstrate that single cell ICP-TQ-MS can deliver important information in the control of yeast-based products enriched with elements. Apart from quantitative data, it can provide a fast tool to distinguish between incorporated and extracellular elements, as shown on the example of chromium. Finally, it might be generally useful for controlling the production of commercial products based on yeast.



**Figure 6:** (a) Time-resolved signal of phosphorus and (b) chromium for the measurement of a yeast sample enriched in chromium.

## Conclusions

The analysis of the content of trace elements at an individual cell level is possible using single cell ICP-MS with a dedicated sample introduction system. The technique allows to screen a high number of individual cells in a short period of time, so that excellent counting statistics are achieved, allowing a true overview on whether a given element is distributed homogeneously within cell population, included in the cells or not, or evaluation of differences in intake or metabolism under certain conditions. Furthermore, accurate quantification of the amount of metal per cell is possible after calibration. This information can be valuable in a variety of applications, such as structural biology, clinical research, and biotechnology.

## References

- (1) C. Degueldre and P.-Y. Favarger, *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **217**, 137–142 (2003).
- (2) F. Li, D.W. Armstrong, and R.S. Houk, *Anal. Chem.* **77**, 1407–1413 (2005).
- (3) H. Wang, M. Wang, B. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, and W. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 1415–1423 (2017).

- (4) M. Corte-Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco, J. Bettmer, and M. Montes-Bayón, *Anal. Chem.* **89**, 11491–11497 (2017).
- (5) P.E. Verboket, O. Borovinskaya, N. Meyer, D. Günther, and P.S. Dittrich, *Anal. Chem.* **86**, 6012–6018 (2014).
- (6) M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-González, J. Bettmer, and M. Montes-Bayón, *Anal. Chem.* **91**, 15532–15538 (2019).
- (7) R. Álvarez-Fernández García, M. Corte-Rodríguez, M. Macke, K.L. LeBlanc, Z. Mester, M. Montes-Bayón, and J. Bettmer, *Analyst*, (2020) DOI: 10.1039/C9AN01565E

**M. Corte-Rodríguez** is with the Institute for Analytical Chemistry at the University of Vienna, in Vienna, Austria. **R. Álvarez-Fernández García**, **P. García-Cancela**, **M. Montes-Bayón**, and **J. Bettmero** are with the Department of Physical and Analytical Chemistry at the University of Oviedo, in Oviedo, Spain. **D.J. Kutscher** is with Thermo Fisher Scientific, in Bremen, Germany. Direct correspondence to: daniel.kutscher@thermofisher.com



