

ANÁLISIS ELEMENTAL EN CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ICP-MS: POSIBILIDADES Y RETOS ACTUALES.

M. Corte Rodríguez, R. Álvarez-Fernández García, E. Blanco González, J. Bettmer y M. Montes Bayón.

Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.

1. ANÁLISIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES: ¿CÓMO Y PARA QUÉ?

En los últimos años, el análisis de pequeños “objetos” individuales se ha convertido en una herramienta que ha ampliado los límites, no solo de la Química Analítica, sino también en campos tan diversos como la Nanotecnología, la Biología, la Medicina, la Ecología o la Biotecnología. Estos “objetos”, siempre en la escala de tamaños micrométricos o inferiores, incluyen células de diferentes tipos, partículas e, incluso, nanopartículas. Todas ellas, tradicionalmente, se habían analizado de forma global, pero, tras superar los desafíos instrumentales que supone el análisis de estos objetos diminutos, la comunidad científica ha descubierto el valor de la información que se puede extraer al observar las diferencias entre la composición de cada uno de estos objetos, frente a la que se puede obtener al observar la población como un conjunto.

Tradicionalmente, el análisis de células individuales en suspensión se ha llevado a cabo mediante la técnica de citometría de flujo, en la que las células, alineadas y de una en una, se hacen atravesar uno o varios haces de luz láser. La radiación emitida, dispersada, reflejada o transmitida por cada célula es después registrada mediante detectores de longitudes de onda específicas situados en diferentes posiciones. Este tipo de instrumentación combinada con el empleo de moléculas de afinidad (anticuerpos) conjugadas con moléculas fluorescentes y que permiten estudiar la expresión de proteínas y marcadores, tanto de membrana como intracelulares, ha convertido a la citometría de flujo en una técnica imprescindible para la clasificación y el estudio de poblaciones celulares en campos como la Medicina y la Biología en base a la expresión de biomoléculas específicas.

Sin embargo, respecto al análisis del contenido elemental en células, la mayoría de los estudios se han llevado a cabo mediante procedimientos en los que un gran número de células (del orden de varios millones) se somete a una digestión ácida, para medir la masa del elemento en la disolución resultante mediante técnicas muy sensibles, como suelen ser la fuente de plasma por acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) o mediante espectrometría de masas (ICP-MS). El contenido de los elementos se normaliza después respecto a la biomasa de partida, bien sea mediante el número de células analizadas, el contenido proteico de las mismas o masa seca. De esta forma, se puede estimar el contenido

elemental de cada célula asumiendo que todas tienen la misma cantidad del elemento medido. Sin embargo, se sabe que existe una heterogeneidad en el contenido elemental, incluso dentro de un mismo cultivo isogénico. Por ello, hace unos años que el análisis elemental de células individuales surgió con el objetivo de estudiar las variaciones célula a célula y, para ello, gracias a su elevada sensibilidad, el uso del ICP-MS (single cell ICP-MS, SC-ICP-MS) se ha convertido en la técnica de referencia.

2. RETOS ASOCIADOS AL ANÁLISIS ELEMENTAL EN CÉLULAS INDIVIDUALES

Los principales retos analíticos a los que se enfrenta el análisis elemental de células individuales mediante SC-ICP-MS son la sensibilidad y la eficiencia de transporte. Si bien la sensibilidad del ICP-MS es extremadamente alta, pudiendo alcanzar niveles por debajo de los $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ para determinados elementos, la masa de algunos elementos en una célula individual puede situarse en niveles cercanos o por debajo del límite de detección de la técnica. Por otro lado, la eficiencia de transporte, que se define como el porcentaje de células detectables del número total de células introducidas, es, con los sistemas de introducción de muestra tradicionales, muy baja, con valores por debajo del 5%, lo que lleva a la pérdida de una gran parte de células, en ocasiones, muy valiosas, y que puede dar lugar a un sesgo en la determinación. Por ello, se están desarrollando sistemas específicos de introducción de muestra para el análisis de células individuales, que proporcionan eficiencias de transporte muy superiores que pueden llegar al 100%.

Por otro lado, la técnica de SC-ICP-MS se basa en la premisa de que la probabilidad de que dos células lleguen al detector dentro de un mismo tiempo de integración sea mínima. Es decir, que cada señal detectada corresponda a una sola célula. Para ello, deben utilizarse tiempos de integración de la señal muy cortos (por debajo de los 10 ms) y suspensiones de células diluidas que minimicen la posibilidad de que dos células lleguen próximas en el tiempo al plasma. De esta forma, cuando una célula llega al plasma, se genera una nube de iones que genera una señal transitoria muy corta en el detector, que se denomina evento (Figura 1). Siguiendo los mismos principios que en el análisis de partículas individuales (single particle ICP-MS, SP-ICP-MS), la frecuencia de los eventos es proporcional a la concentración de células en la suspensión (con la eficiencia de transporte como constante de

proporcionalidad); la intensidad de cada evento es proporcional a la masa del elemento en la célula; y la intensidad de la señal continua de fondo es proporcional a la concentración del elemento en disolución. Así, cuanto más se diluyen las muestras, la señal de fondo del elemento también disminuye, mientras que la intensidad de los eventos se mantiene constante, aumentando, en consecuencia, la relación señal-ruido.

Otro reto importante de este tipo de medidas es que, debido a la necesidad de utilizar tiempos de integración muy cortos, el análisis simultáneo de varios elementos o isótopos no es posible con analizadores de masas de tipo secuencial (cuadruolos, sectores de campo eléctrico/magnético) y la única posibilidad de analizar diferentes isótopos simultáneamente es mediante la utilización de analizadores de masas de tiempo de vuelo (ICP-TOF-MS).

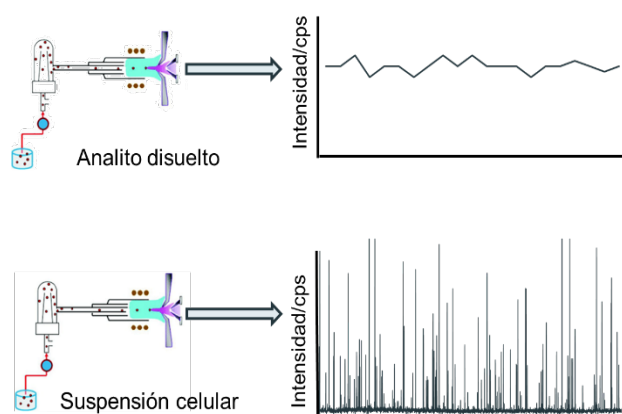


Figura 1. Señal obtenida en continuo en el ICP-MS cuando se introducen: A) disoluciones homogéneas, B) suspensiones celulares.

A pesar de los retos pendientes, hoy en día ya existen numerosas aplicaciones de la técnica SC-ICP-MS. En este artículo se resumirán algunas de las principales aportaciones de nuestro grupo de investigación al campo del análisis elemental de células individuales mediante SC-ICP-MS en distintos campos, desde la biotecnología a la biomedicina. Para ello, se han evaluado diferentes tipos de sistemas de introducción de muestras y estudiado diferentes modelos celulares en una variedad de aplicaciones.

3. PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA

Instrumentación.

Para llevar a cabo el análisis de células individuales en nuestro grupo de investigación se utilizó un equipo ICP-MS de triple cuadrupolo iCAP TQ ICP-MS (Thermo Fisher Scientific). Las medidas de fósforo, selenio y cromo se llevaron a cabo en el modo TQ-O₂, aprovechando los desplazamientos de masa $^{31}\text{P}^+ > ^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$, $^{80}\text{Se}^+ > ^{80}\text{Se}^{16}\text{O}^+$ y $^{52}\text{Cr}^+ > ^{52}\text{Cr}^{16}\text{O}^+$, tras reaccionar con oxígeno en la celda de reacción. La

adquisición de datos se realizó con un tiempo de integración de 5 ms.

Como se ha comentado, los sistemas de introducción de muestras son un punto crítico para el análisis de células individuales, dado que afectan a su eficiencia de transporte. La primera publicación referente a SC-ICP-MS de nuestro grupo de investigación presentaba el diseño de un sistema que consistía en un nebulizador EnyaMist de microflujos acoplado a una cámara de nebulización cilíndrica de consumo total de diseño propio[1]. Con este sistema, se consiguió una eficiencia de transporte de las células de un 25%, que correspondía a una de las más altas eficiencias logradas hasta la fecha para sistemas de nebulización neumática, comprobando, además, mediante microscopía, que la integridad de las células se mantenía tras la nebulización.

Más adelante, pasamos a evaluar otro sistema de introducción de muestras basado en un nebulizador modificado de alta eficacia (HPCN) con un capilar interno de 110 μm y una cámara de nebulización de consumo total que incorpora un flujo de argón tangencial[2] que evita la deposición de las células en las paredes internas de la cámara, mejorando su eficiencia de transporte (Figura 2). En este caso, la eficiencia de transporte aumentó hasta el 95% en algunas células tumorales, y hasta el 70% en levaduras.

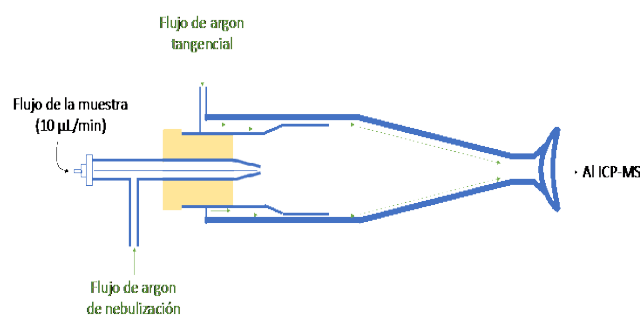


Figura 2. Esquema del sistema de introducción de muestra empleado.

Cuantificación.

Para cuantificar la masa del analito en cada célula individual, se construyó una recta de calibración externa con disoluciones patrón del analito. En este caso, se utilizó la eficiencia de transporte calculada a partir de un material de referencia certificado consistente en una suspensión de nanopartículas de oro de 30 nm producido por el NIST (NIST 8012), dado que su pequeño tamaño hace que se comporten de una forma más comparable al patrón elemental en disolución.

Cálculo de eficiencia de transporte.

Para calcular la eficiencia de transporte de las células, se determinó la densidad celular (células/mL) mediante citometría de flujo para compararla con el número de eventos detectados mediante SC-ICP-MS. Esto se puede

llevar a cabo, bien mediante el tratamiento de las células con un compuesto no tóxico que se incorpore en todas ellas, como sugerimos en un trabajo mediante un complejo de terbio[1], o bien mediante la detección de elementos naturalmente presentes en las células. En este segundo caso, se utilizó el fósforo, que está presente en todas las células en una cantidad relativamente constante y alta, formando parte del ADN y ARN, iones fosfato, fosfolípidos, ATP, etc., y este elemento puede ser medido con una alta sensibilidad en el equipo de triple cuadrupolo utilizado.

Tratamiento de muestra y procesamiento de los datos.

Las muestras se trataron de acuerdo a su naturaleza y el fin del análisis. Las muestras liofilizadas de levaduras se suspendieron en agua desionizada, se lavaron dos veces por centrifugación y se diluyeron a una concentración final de unas 50000 células/mL en agua. Las células humanas de cáncer de ovario (A2780 y A2780cis) se lavaron con un tampón de fosfatos (PBS) y se diluyeron a unas 25000 células/mL en una disolución al 10% de metanol en agua (necesario para el correcto funcionamiento del nebulizador EnyaMist). Las células humanas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7, sobre las que se realizó un marcaje con un anticuerpo, se fijaron con paraformaldehído (PFA, 4%) antes de la incubación con el anticuerpo marcado con neodimio. Tras el marcaje, se lavaron 3 veces con el tampón TBS (Tris-buffered saline) y, finalmente, se diluyeron en agua desionizada a una concentración de unas 50000 células/mL.

Cada muestra se midió durante un tiempo de 3 minutos. Para diferenciar los eventos del fondo, la señal durante los 3 minutos fue promediada, y se seleccionaron los eventos con una intensidad mayor que N veces la desviación estándar más la media de las señales (N=3 o 5, en función del ruido del fondo). Tras extraer los eventos detectados del conjunto de datos, este cálculo se repitió en un procedimiento iterativo las veces necesarias hasta que no se pudieron detectar nuevos eventos que cumplieran estos criterios.

4. APLICACIONES

Análisis de la incorporación de metalofármacos: cisplatino.

En 2017 se publicó el artículo en el que se muestran los resultados de la aplicación de SC-ICP-MS al análisis de la incorporación del fármaco antitumoral cisplatino a distintas concentraciones en una pareja de líneas celulares de carcinoma ovárico humano, siendo una de las líneas sensible a cisplatino (A2780) y la otra resistente al mismo (A2780cis) [1]. Para ello, se diseñó un sistema de introducción de muestras que consistía en un nebulizador EnyaMist de microflujos acoplado a una cámara de nebulización cilíndrica de consumo total de diseño propio.

Su aplicación al análisis de la pareja de líneas celulares sensible/resistente al cisplatino permitió demostrar que

los resultados a nivel de las células individuales eran consistentes con los obtenidos de manera global, obteniendo contenidos de platino significativamente superiores en las células sensibles que en las resistentes. Asimismo, se observó un aumento significativo en la incorporación del fármaco al aumentar la dosis de exposición, particularmente en la línea sensible. Sin embargo, el estudio a nivel de células individuales permitió conocer que la heterogeneidad en la incorporación del cisplatino era mayor, en todas las concentraciones estudiadas, para la línea sensible, mostrando la resistente una mayor homogeneidad entre células.

Este sistema, desarrollado y caracterizado enteramente en nuestro grupo, se aplicó también al análisis de la incorporación de cobre en esporas individuales de la bacteria de gran importancia biotecnológica *Streptomyces coelicolor* en el marco de un estudio del cobre como modulador de la germinación, el desarrollo y el metabolismo de dicha bacteria [3]. A pesar de su pequeño tamaño (1-2 μm), la alta robustez mecánica y estabilidad química de estas esporas permitió obtener elevadas eficiencias de transporte (hasta 70-80%) y validar los resultados con los obtenidos mediante análisis total.

Análisis de levaduras enriquecidas.

Las levaduras constan de una pared celular formada por polisacáridos, proteínas y lípidos, que les confiere una especial resistencia mecánica y química frente a cambios de pH o fuerza iónica. Esto las hace especialmente adecuadas para su análisis mediante SC-ICP-MS. El uso de levaduras enriquecidas en selenio como complemento alimentario mejora la suplementación de este elemento, ya que permite incorporarlo como especies fácilmente asimilables, como la selenometionina. Pero para ello, el selenio debe haber sido asimilado por las levaduras vivas, incorporado y bio-transformado. Tanto para la detección de falsificaciones, como para el control analítico del proceso biotecnológico, la técnica de SC-ICP-MS tiene la utilidad, como se ha mencionado, de permitir diferenciar el selenio disuelto del que está incorporado en las células de levadura.

Recientemente [4], se ha utilizado el sistema de introducción de muestras basado en el nebulizador HPCN de alta eficacia (Figura 2) para estudiar la presencia de selenio en levaduras selenizadas y, en combinación con otras técnicas (p.ej. HPLC-ICP-MS y microscopía electrónica), se pudo determinar que el selenio intracelular se encuentra, entre otras, en forma nanoparticulada. Mediante el análisis por SC/SP-ICP-MS antes y después de la lisis de las levaduras, se pudo confirmar la presencia de selenio dentro de las células y si este se encontraba en forma nanoparticulada.

Asimismo, mediante la comparación del número de eventos detectados a través la medida de fósforo y los que se detectan con el selenio, se obtuvo un porcentaje de enriquecimiento de alrededor del 60% (ver Figura

3). Es decir, casi dos terceras partes de las células de levadura estaban enriquecidas en selenio en una muestra comercial de levaduras selenizadas.

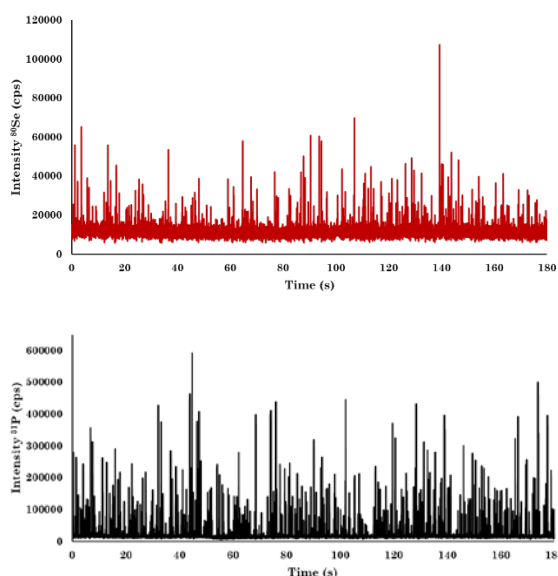


Figura 3. Eventos registrados para levaduras selenizadas (A) de Se y (B) de P.

Análisis de la expresión de biomarcadores.

Además del contenido elemental, la expresión de biomarcadores en células individuales se ha llevado a cabo de manera cuantitativa utilizando sistemas de introducción de muestras similares al de la Figura 2 y procedimientos de marcaje con anticuerpos. En particular, se ha desarrollado una estrategia que permite cuantificar el número de receptores de transferrina (TfR1) en células individuales [5]. La transferrina es la principal proteína de transporte de hierro en el organismo, y para su entrada en la célula son necesarios estos receptores. Células con mayores requerimientos de hierro, como son células tumorales, tienen una expresión más elevada de TfR1. Basándose en la citometría de masas, se utilizó un anticuerpo anti-TfR1 marcado con Nd mediante el polímero comercial Maxpar® para detectar el receptor en las células. Previamente, se caracterizó el anticuerpo marcado mediante HPLC y en un ensayo ELISA comercial, para obtener la estequiometría Nd-anticuerpo y, de esta forma, poder cuantificar el número de anticuerpos por célula y, por tanto, el número de TfR1 presentes en cada célula individual. Al comparar la expresión de TfR1 en células individuales de dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231 Y MCF-7), se observó una mayor expresión de este receptor en la línea MDA-MB-231, que es la que muestra un fenotipo más maligno y de mayor proliferación, teniendo por lo tanto requerimientos más altos de nutrientes. Esta diferencia se aprecia en el diagrama de la Figura 4.

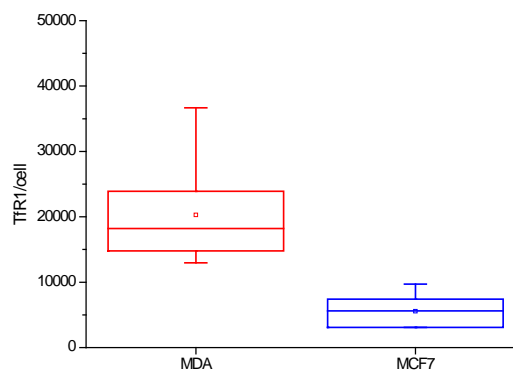


Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes que muestra la diferencia en la expresión de TfR1 en células individuales entre la línea celular MDA-MB-231 (rojo) y MCF-7 (azul).

5. CONCLUSIONES Y FUTURO

Parece claro que los resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de la medida del contenido elemental en células individuales para muy distintas aplicaciones. Desde las etapas de control en procesos biotecnológicos hasta la monitorización del empleo de metalodrogas o de elementos traza que controlan procesos celulares críticos. La optimización de los sistemas de introducción de muestras para maximizar el transporte de las células intactas, así como la posibilidad de medir varios elementos de manera simultánea han de ser las áreas de investigación en este campo durante los próximos años que posee, claramente, un carácter multidisciplinar.

6. REFERENCIAS

- [1] 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.*, vol. 89, pp. 11491-11497, 2017.
- [2] A. S. Groombridge *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.*, vol. 29, pp. 597-603, 2013.
- [3] N. González-Quiñónez *et al.*, "Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 4214, 2019.
- [4] R. Álvarez-Fernández García *et al.*, "Addressing the presence of biogenic selenium nanoparticles in yeast cells: analytical strategies based on ICP-TQ-MS," *Analyst*, vol. 145, no. 4, pp. 1457-1465, 2020.
- [5] M. Corte-Rodríguez, E. Blanco-González, J. Bettmer, and M. Montes-Bayón, "Quantitative Analysis of Transferrin Receptor 1 (TfR1) in Individual Breast Cancer Cells by Means of Labeled Antibodies and Elemental (ICP-MS) Detection," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 24, pp. 15532-15538, 2019.