

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo y aplicación de estrategias (bio)analíticas para la
evaluación de la toxicidad asociada a nanopartículas de plata en
modelos *in-vitro* e *in-vivo***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA

POR

María Nieves Fernández Muñiz

Directores

José Luis Luque García

María Riansares Muñoz Olivas

Madrid 2022

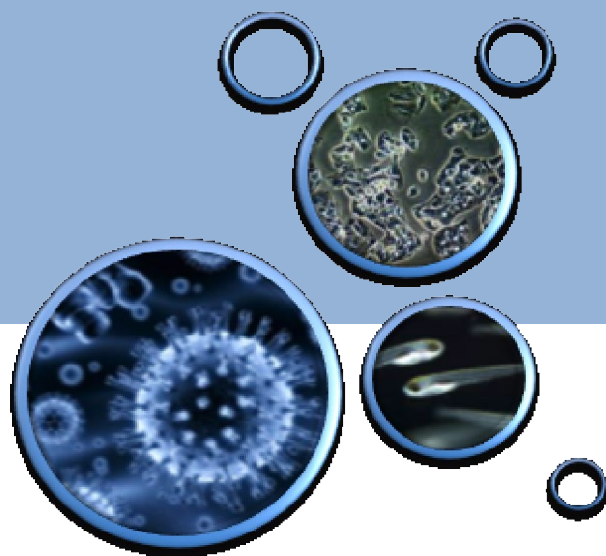


Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

TESIS DOCTORAL

María Nieves Fernández Muñiz

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS (BIO) ANALÍTICAS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN-VITRO E IN-VIVO**



Directores:

José Luis Luque García

María Riansares Muñoz Olivas

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS (BIO) ANALÍTICAS PARA LA
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD ASOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN
MODELOS IN-VITRO E IN-VIVO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Nieves Fernández Muñiz

Directores

José Luis Luque García
María Riansares Muñoz Olivas

Madrid, 2022

A MIS PADRES Y HERMANO

Agradecimientos

Ha sido un camino largo, gratificante y difícil a la vez, en muchas ocasiones incluso pensé que imposible pero al final todo llega a su fin y por supuesto, todo esto no sería posible sin la ayuda y colaboración de mucha gente. En primer lugar, me gustaría agradecerle a la Profesora Carmen Cámara. Gracias por acogerme y darme la oportunidad de trabajar en este grupo de investigación, del cual, he aprendido tanto. En segundo lugar, quería darle las gracias, especialmente, a mis directores de tesis, el Doctor Jose Luis Luque García por permitir adentrarme en el mundo de la proteómica pero sobre todo por guiarme durante todo este proceso y ser un ejemplo a seguir en el campo de la Investigación, y a la Doctora Riansares Muñoz Olivas por confiar siempre en mí y ser un gran apoyo tanto a nivel profesional como personal a lo largo de todos estos años. Os estaré, a los dos, siempre infinitamente agradecida por todo. Evidentemente, no me puedo olvidar del resto de componentes del grupo que, en mayor o menor medida, me han enseñado y han aportado su granito de arena para que este trabajo viese la luz: Yolanda, Milagros, Mariluz, M^a Eugenia, Conchita, Noelia, Daniel, Estefanía. En especial, a Fernando por las horas y horas que has pasado conmigo ayudándome. A Jon, porque eres de las personas más polifacéticas que conozco, gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado. A Teresa, porque has sido como una “mami” para mí. Gracias por nuestras sesiones de terapia, risas y cotilleos en vuestro despacho, por tus mensajes recordándome que no me olvidase de la tesis y gracias también por los buenos consejos que me has dado siempre.

Naturalmente, esto no sería lo mismo sin mis compañeros, de quienes he aprendido muchísimo tanto dentro como fuera del laboratorio. En primer lugar me gustaría agradecer al grupo de proteómica: Pablo, Héctor, Carlos, Javi García, Javi Espadas, Guille, Laura, Nerea. En especial a Estefi, gracias por ayudarme tanto en tantas ocasiones. A Sandra, porque has sido un gran apoyo para mí, solo puedo decirte que gracias infinitas por todo. Por ayudarme, por la paciencia que has tenido conmigo, por ser una fantástica compañera, por enseñarme a “bailar” sevillanas, dejarme esos increíbles vestidos y poder sentirme una más en la feria Cordobesa, por nuestras risas y complicidad en el laboratorio, por mil momentos vividos. A los químicos Vicente y Diego, porque junto con Sandra he pasado muy buenos momentos. Gracias chicos, por haberme integrado en el grupo como una más, sacarme una sonrisa en muchos momentos de estrés, por las cañas de los jueves, por lo bien que lo pasamos en Córdoba y por las visitas de media mañana o media tarde que siempre se agradecen.

A mis compañeras de analítica: Raquel, María Sánchez, Noe. En especial a Sonia, muchas gracias por introducirme en el “mundo láser” que tantos quebraderos de cabeza y alegrías nos ha dado. Ha sido un placer compartir esta experiencia contigo. A María Palomo, gracias por compartir conmigo muchos momentos: por nuestros desayunos, nuestras risas, nuestras noches de postureo y porque contigo me he dado cuenta de que nunca te puedes fiar de las primeras impresiones. A mi compi de “zulo”, Irene. Maja eres una de las personas mas alegres que conozco, siempre con esa sonrisa que tanto te caracteriza. Gracias por ayudarme a integrarme en el grupo y hacerme sentir como una más desde el primer momento. A Ana, porque has sido como mi hermana mayor. He tenido la suerte de compartir contigo muchísimos momentos tanto dentro como fuera de la uni. Muchas gracias por tus maravillosos consejos, por estar siempre ahí, por ser un hombro donde llorar

muchas veces y donde reír otras tantas, por animarme siempre a no tirar la toalla y por hacerme entender que todo llega, sólo es cuestión de ser persistente y no rendirse nunca.

Gracias también a las nuevas generaciones con las que he tenido la suerte de estar en mi último año de tesis y que hicieron que mi última etapa fuese mucho más amena: David, Elena, Bea. A Esther, porque gracias a ti descubrí el mundo del baile latino que taaanto me gusta ejej. Gracias por esas fantásticas clases de baile y por ser una persona estupenda. Y en especial a Gus, fuiste una de las personas más importantes para mí en toda esta experiencia a pesar del poco tiempo que coincidimos, pero como yo siempre digo lo que importa no es la cantidad sino la calidad. Muchas gracias por nuestros desayunos de media mañana, los McFlurry tamaño XL/cañas de los jueves, nuestros audios infinitos hasta las mil, nuestras noches de fiesta y locura, nuestros cotilleos, en fin...GRACIAS por ser el mejor confidente, compañero y amigo que podía tener allí.

Y ya para terminar quería darle las gracias de todo corazón a todos mis amigos y a toda mi familia por su apoyo incondicional. En especial, quería agradecerle a mis padres por confiar siempre en mí, por no dejarme bajo ningún concepto tirar la toalla, por apoyarme y no dudar en ningún momento de que yo podía con esto y con más y por enseñarme que en esta vida sólo tú con tu esfuerzo y voluntad podrás lograr todas tus metas.

GRACIAS a todos/as de corazón.

La elaboración de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca de personal investigador (FPI) asociado al proyecto CTQ2011-28328-C02-01 proporcionada por el Ministerio de Economía y Competitividad.

Lista de abreviaturas

AB.9	Células de fibroblasto de cola de pez cebra
Abs	Absorbancia
Ag	Plata
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AF	Ácido fórmico
AgNPs	Nanopartículas de plata
AgNP10	Nanopartículas de plata de 10nm
AgNP60	Nanopartículas de plata de 60nm
ANOVA	Análisis estadístico de la varianza de un factor
APEX	Expresión de proteína absoluta
AQUA	Cuantificación absoluta
Ar	Argón
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CRM	Certified Reference Material
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenilindol
DIGE	Differential in-gel electrophoresis
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	1,4-ditiotreitol
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
emPAI	Exponentially modified protein abundance index
ESI	Ionización por electrospray
FBS	Suero fetal bovino
FFF	Fraccionamiento de campo de flujo
GO	Gene Ontology
GSH	Glutación
GTP	Guanosín trifosfato

HaCaT	Queratinocitos humanos
HDC	Cromatografía hidrodinámica
Hek293	Células embrionarias de riñón humano
He	Helio
HeLa	Células de carcinoma de cuello uterino humano
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
Hp _f	Horas post fertilización
Hos	Células de osteosarcoma humano
ICP	Plasma de acoplamiento Inductivo
ID ₅₀	Concentración de la sustancia tóxica a la cual el 50% de las células no se multiplica
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
IT	Trampa iónica
iTRAQ	Isobaric tags for relative and absolute quantification
LA	Ablación Láser
LC	Cromatografía de líquidos
LC50	Concentración letal media
LOD	Límite de detección
LTQ	Espectrómetro de masas con trampa lineal en 2D
Lys	Lisina
MALDI	Ionización y desorción mediante láser asistida por matriz
MeOH	Metanol
MMS	Matrix matched standards
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
m/z	Relación masa-carga de un ión
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
nanoESI	Nanoelectrospray
NCBI _{nr}	National Center for Biotechnology Information
NPs	Nanopartículas
NSAF	Factor de abundancia espectral normalizado
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PAI	Protein Abundance Index
PBS	Disolución reguladora fosfato salino

PI	Patrón interno
PSA	Persulfato de amonio
Q	Cuadrupolo
QQQ	Triple cuadrupolo
TOF	Aanalizador de tiempo de vuelo
REACH	Regulación europea de sustancias químicas
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Desviación estándar relativa
R _{SILAC}	Cociente SILAC
R _{super-SILAC}	Cociente super-SILAC
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEC	Cromatografía por exclusión de tamaños
SILAC	Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SIMS	Espectrometría de masas de ión secundario
SIN	Índice espectral normalizado
S/N	Relación señal-ruido
SXRF	Fluorescencia de rayos X con radiación de sincotróon
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametiletilendiamina
US	Ultrasonidos
ZF4	Células de fibroblasto de embrión de pez cebra
β-ME	Beta mercapto etanol

ÍNDICE

Índice de figuras	X
Índice de tablas	XVI
RESUMEN	XIX
SUMMARY	XXIII
I. INTRODUCCIÓN.....	I
I.1. NANOPARTÍCULAS DE PLATA	5
I.1.1.Características y aplicaciones.....	5
I.1.2 Métodos de síntesis y rutas de exposición	8
I.1.3. Propiedades físico-químicas	11
I.1.4 Relevancia de los estudios de toxicidad en sistemas in vitro e in vivo de las AgNPs en el contexto actual	13
I.2. PROTEÓMICA CUANTITATIVA	20
I.2.1. Empleo en estudios toxicológicos	21
I.2.2.Estrategias SILAC y super-SILAC.....	21
I.3. LA-ICP-MS COMO TÉCNICA DE IMAGEN Y SEMI-CUANTIFICACIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN TEJIDOS BIOLÓGICOS.....	27
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
III.1 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA.....	37
III.2 CULTIVO CELULAR.....	38
III.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	39
III.4 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR.....	39
III.4.a Internalización de las AgNPs por TEM.....	39
III.4.b Internalización de las AgNPs por ICP-MS.....	40
III.5. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS).....	41
III.6 PROTEÓMICA CUANTITATIVA	42
III.6.a. Estrategia SILAC	42
III.6.b. Estrategia superSILAC	46
III.7. EXPOSICIÓN DE LAS LARVAS DE PEZ CEBRA A LA MEZCLA DE METALES Y A AgNPS. ANÁLISIS POR LA-ICP-MS.....	48
III.7.a. Calibración del equipo LA-ICP-MS.....	49
III.7.b. Preparación de los estándares en gelatina y fijación de las larvas para la ablación láser.....	50

III.7.c.. Cuantificación de metales y AgNPs en los estándares de gelatina por ICP-MS	51
III.7.d. Determinación de AgNPs en larvas de pez cebra por ICP-MS	51
III.7.e. Evaluación del efecto matriz de las larvas en su análisis por LA-ICP-MS.....	51
III.7.f. Proceso de semi-cuantificación de los metales y AgNPs por LA-ICP-MS.....	52
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
IV.1 ESTUDIO DE LOS MECANISMOS BIOMOLECULARES IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DE LAS AgNPs EN UN SISTEMA IN VITRO MEDIANTE PROTEÓMICA CUANTITATIVA	55
IV.1.1 Caracterización de las AgNPs empleadas	55
IV.1.2 Viabilidad celular	60
IV.1.3. Internalización celular	63
IV.1.4 Mecanismos moleculares implicados en la toxicidad inducida por AgNPs en células HepG2.....	65
IV.1.5 Efecto de las AgNP10 en proteínas de núcleo y mecanismos relacionados con la síntesis y estabilidad del ADN	75
IV.2 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA BASADA EN LA-ICP-MS PARA EL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE METALES EN LARVAS DE PEZ CEBRA	81
IV.2.1. Verificación del equipo LA-ICP-MS.....	82
IV.2.2. Optimización de los parámetros experimentales del acoplamiento LA-ICP-MS.....	83
IV.2.3. Estrategias de calibración utilizando gelatina de pescado como matriz biológica	88
IV.2.4. Estudio de estabilidad en un tiempo prolongado	95
IV.2.5. Evaluación de la eficiencia del transporte en LA-ICP-MS.....	96
IV.2.6. Cálculo de los límites de detección del sistema LA-ICP-MS.....	99
IV.2.7. Distribución de los elementos Ag, Cd y Hg en las larvas de pez cebra.....	99
IV.2.8. Semi-cuantificación de Ag, Cd y Hg en larvas de pez cebra mediante LA-ICP-MS	104
IV.3. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE LAS AgNP10 y AgNP60 EN UN SISTEMA IN VIVO (LARVAS DE PEZ CEBRA)	107
IV.3.1. Estudio de la distribución y semi-cuantificación de AgNP10 y AgNP60 en larvas de pez cebra.....	107
IV.3.2. Evaluación de la expresión diferencial de proteínas en larvas de pez cebra expuestas a AgNPs.....	113
V. CONCLUSIONES	125
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
ANEXO A. TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS	163

A.1 METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LAS AgNPS	165
A.2. METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS TRAS LA EXPOSICIÓN A AgNPS	175
A2.1 Viabilidad celular.....	175
A2.2 Proteómica cuantitativa	175
ANEXO B. APORTACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.....	187
B. 1 Comunicaciones a congresos	189
B. 2 Otros artículos científicos.....	190

Índice de figuras

Figura I.1. Rango de dimensiones en el que se encuentran las nanopartículas.....	3
Figura I.2. Fuentes de liberación de nanopartículas en el medio ambiente.....	4
Figura I.3. Principales aplicaciones de las AgNPs.....	7
Figura I.4. Efectos de las AgNPs en función del tamaño.....	12
Figura I.5. Posibles mecanismos causados por la toxicidad de las AgNPs según diferentes estudios	14
Figura I.6. Organismos modelo más utilizados para estudios <i>in vivo</i> a la exposición a AgNPs.....	17
Figura I.7. Ejemplar de pez cebra	18
Figura I.8. Esquema general de las etapas del procedimiento de la estrategia SILAC.....	23
Figura I.9. Esquema de la metodología SILAC (A) y super-SILAC (B).....	27
Figura III.1. Procedimiento experimental empleado para la determinación de AgNPs internalizadas en células HepG2 por ICP-MS	41
Figura III.2. Esquema de la estrategia super-SILAC empleada para evaluar el efecto de las AgNPs en larvas de pez cebra.....	46
Figura III.3. Gelatina depositada en pocillos fijados en una cinta adhesiva de doble cara	50
Figura IV.1. Caracterización de A) AgNP10 B) AgNP60 (A1 y A2): TEM; (B1 y B2): EDS.....	55
Figura IV.2. Optimización del pH en suspensiones de: A) AgNP10 B) AgNP60. [Ag]=500µg.L ⁻¹ ..	56
Figura IV.3. Fractogramas obtenidos en agua Milli-Q a pH 8: A) AgNP10 y B) AgNP60. [Ag]=500 µg.L ⁻¹	57
Figura IV.4. Optimización de la temperatura en suspensiones de: A) AgNP10 B) AgNP60. [Ag]=500µg.L ⁻¹	57

Figura IV.5. Fractogramas obtenidos para A) AgNP10; B) AgNP60, utilizando A1 y B1) baño de ultrasonidos; A2 y B2) sonda de ultrasonidos. [Ag] = 500 mg.L ⁻¹	58
Figura IV.6. Fractogramas obtenidos para A) AgNP10; B) AgNP60 en medio celular DMEM. [Ag]= 5 mg.L ⁻¹	59
Figura IV.7. Imágenes obtenidas por TEM de células HepG2 en medio celular expuestas a A1) AgNP10 0h, A2) AgNP10 72h, B1) AgNP60 0h y B2) AgNP60 72h. [Ag]= 5 mg.L ⁻¹	60
Figura IV.8. Análisis composicional por EDS de células HepG2 en medio celular expuestas a: A1) AgNP10 0h, A2) AgNP10 72h, B1) AgNP60 0h y B2) AgNP60 72h.....	60
Figura IV.9. Viabilidad de diferentes líneas celulares tras su exposición a diferentes concentraciones de A) AgNP10; B) AgNP6 durante 72 h.....	61
Figura IV.10. Viabilidad celular (HepG2) tras la exposición a diferentes concentraciones de AgNP10, AgNP60 y citrato durante 72h..	62
Figura IV.11. Viabilidad celular HepG2 tras la exposición a diferentes concentraciones de AgNP10, AgNP60 y Ag ⁺ durante 72h.....	63
Figura IV.12. Micrográficas TEM de secciones ultrafinas de células HepG2 tratadas con: (A-C) AgNP10; (D-F) AgNP60. [Ag]= 5 mg.L ⁻¹	64
Figura IV.13. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas en células HepG2 expuestas a A) AgNP10; B) AgNP60.....	66
Figura IV.14. Funciones biológicas de las proteínas alteradas en células HepG2 expuestas a AgNP10 y AgNP60 utilizando la base de datos Gene Ontology.....	69
Figura IV.15. Esquema del mecanismo molecular asociado a la toxicidad de AgNP10 en células HepG2.....	74
Figura IV.16. Esquema del mecanismo molecular asociado a la toxicidad de AgNP60 en células HepG2.....	75
Figura IV.17. Funciones biológicas de las proteínas nucleares alteradas en células HepG2 expuestas a AgNP10 (Gene Ontology Database).....	77
Figura IV.18. Pocillos sobre cinta adhesiva empleados para las medidas mediante LA-ICP-MS.....	84

Figura IV.19. Representación gráfica de los RSD de los isótopos ^{107}Ag , ^{111}Cd y ^{202}Hg para muestras depositadas en pocillos o directamente en el portamuestras. $[\text{Ag, Cd, Hg}]=50 \mu\text{g.L}^{-1}$	84
Figura IV.20. Representación gráfica de los isótopos A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg sobre gelatina depositada sobre pocillos utilizando un tamaño de cráter y velocidad de ablación de $50 \mu\text{m/s}$ (color azul) y $25 \mu\text{m/s}$ (color rojo). Frecuencia de ablación: 20Hz. $[\text{Ag, Cd, Hg}]=50 \mu\text{g.L}^{-1}$	85
Figura IV.21. Evaluación del efecto Marangoni. Sensibilidad (cps) en dos muestras de gelatina de pescado. A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg	86
Figura IV.22. Sensibilidad (cps) en dos matrices distintas (gelatina de pescado y CRM BCR664. A) ^{111}Cd , B) ^{206}Pb	87
Figura IV.23. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.....	88
Figura IV.24. Rectas de calibrado de patrón interno (In como PI) de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.....	90
Figura IV.25. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.....	91
Figura IV.26. Rectas de calibrado interno (Au metalizado como PI) de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes	91
Figura IV.27. Señales (cps) de ^{197}Au (III) en gelatina. A) $[\text{Au}] = 250 \mu\text{g.L}^{-1}$; B) $250 \mu\text{g.L}^{-1}$; C) $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$	93
Figura IV.28. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.....	94
Figura IV.29. Rectas de calibrado de patrón interno (^{197}Au (III) en disolución) interno de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes	94
Figura IV.30. Comparación de la estabilidad de la señal para A) ^{107}Ag ; B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg con y sin Au (III) como PI. $[\text{Ag, Cd, Hg}] = 250 \mu\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Au}] = 1 \text{ mg}^{-1}$. El “eje X” corresponde al número de líneas ablacionadas. El “eje Y izquierdo” a los valores de intensidad sin normalizar y el “eje	

Y derecho" a los valores normalizados con la señal del Au (III).....	96
Figura IV.31. Correlación entre las señales obtenidas por ICP-MS tras la digestión ácida y las señales obtenidas por LA-ICP-MS. A) ^{107}Ag ; B) ^{111}Cd and C) ^{202}Hg . Las señales han sido normalizadas con la señal obtenida para ^{197}Au signal; $[\text{Au III}] = 1 \text{ mg L}^{-1}$	98
Figura IV.32. Fotografía de la disposición de la larva en el interior de la cámara de ablación (izquierda) y distribución espacial del ^{111}Cd en la larva (derecha).....	100
Figura IV.33. Fotografía de la disposición de la larva en el interior de la cámara de ablación (izquierda) y distribución espacial del ^{202}Hg en la larva (derecha).....	101
Figura IV.34. A) Fotografía de la disposición de una larva, B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva tras ser expuesta durante 48h $[\text{Ag}] = 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. C) Imagen de una larva control para ^{107}Ag tras ser expuesta al medio sin metales. Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.....	102
Figura IV.35. A) Fotografía de la disposición de una larva, B) distribución espacial de ^{111}Cd en una larva tras ser expuesta durante 48h $[\text{Cd}] = 10 \text{ mg.L}^{-1}$. c) Imagen de una larva control para el ^{111}Cd . Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.....	102
Figura IV.36. a) Fotografía de la disposición de una larva, b) distribución espacial de ^{202}Hg en una larva tras ser expuesta durante 48h $[\text{Hg}] = 25 \text{ mg.L}^{-1}$. c) Imagen de una larva control para el ^{202}Hg . Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.....	103
Figura IV.37. Análisis ANOVA. Influencia del efecto matriz en muestras de gelatina y larva sin y con patrón interno Au(III). A) Ag, B) Cd and C) Hg. $[\text{Ag}, \text{Cd}, \text{Hg}] = 50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Au}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$. La señales corresponden a cuentas por segundo dividido por un factor 1000.....	105
Figura IV.38. Rectas de calibrado de AgNPs de 10nm en dos días diferentes A) externo y B) interno con PI Au (III) = 1 mg.L^{-1}	108
Figura IV.39. Rectas de calibrado de AgNPs de 60nm en dos días diferentes A) externo y B) interno con PI Au (III) = 1 mg.L^{-1}	108
Figura IV.40. Correlación entre las señales obtenidas por ICP-MS tras la digestión ácida y las señales obtenidas por LA-ICP-MS. A) AgNP10; B) AgNP60. PI: $[\text{Au III}] = 1 \text{ mg L}^{-1}$	109

Figura IV.41 A) Fotografía de la disposición de una larva de pez cebra en el interior de la cámara de ablación; B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva tras ser expuesta a 1mg. L^{-1} AgNP10. c) Imagen de una larva expuesta a un medio libre de Ag. Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.....	110
Figura IV.42 a) Fotografía de la disposición de una larva de pez cebra en el interior de la cámara de ablación; B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva tras ser expuesta a 1mg. L^{-1} AgNP60. c) Imagen de una larva expuesta a un medio libre de Ag. Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.....	111
Figura IV.43. Análisis ANOVA. Influencia del efecto matriz en gelatina (calibrante) y la muestra de larva sin y con patrón interno. A) AgNPs 10nm, B) AgNPs 60nm. La señales corresponden a cuentas por segundo dividido por un factor de 1000. $[\text{Au(III)}] = 1\text{mg.L}^{-1}$	112
Figura IV.44. Fotografías de los geles SDS-PAGE para separar las proteínas extraídas de larvas de pez cebra mediante las diferentes condiciones experimentales evaluadas. A) Disrupción de la muestra; B) Efecto del tampón de lisis; C) Precipitación de proteínas.....	115
Figura IV.45. Esquema del procedimiento de extracción de proteínas de las larvas de pez cebra.....	116
Figura IV.46. Funciones biológicas de las proteínas alteradas en larvas de pez cebra expuestas a AgNP10 y AgNP60 utilizando la base de datos Gene Ontology.....	119
Figura IV.47. Mecanismos de toxicidad implicados en la toxicidad provocada por A) AgNP10 y B) AgNP60 en larvas de pez cebra	123
Figura A.1. Esquema de los componentes del canal del AF4 y de las etapas de análisis.....	167
Figura A.2. Componentes del equipo ICP-MS.....	171
Figura A.3. Esquema de un equipo LA-ICP-MS.....	173
Figura A.4. Condiciones ideales para el análisis por LA-ICP-MS.....	174

Figura A.5. Esquemas de trabajo en las diferentes metodologías de proteómica cuantitativa. Los cuadros naranjas y azules representan distintas condiciones experimentales. Las líneas discontinuas indican el tratamiento de muestra independiente y las líneas continuas la mezcla de las dos muestras.....	177
Figura A.6. Marcaje metabólico y preparación de muestra.....	179
Figura A.7. Esquema de un montaje SDS-page.....	180
Figura A.8. Esquema de funcionamiento de la fuente de ionización en un espectrómetro de masas. A) MALDI, B) ESI.....	182
Figura A.9. Esquema de distintos analizadores de masas. A) Cuadroupolo; B) Trampa de iones,C) Tiempo de vuelo; ,D) Orbitrap.....	185

Índice de tablas

Tabla I.1. Estudios toxicológicos <i>in vitro</i> recientes sobre células HepG2 expuestas a AgNPs de diferentes tamaños, concentraciones y tiempos de exposición	16
Tabla I.2. Estudios toxicológicos <i>in vivo</i> de las AgNPs en pez cebra.....	20
Tabla III.1. Condiciones AF4 para la caracterización de las AgNPs.....	38
Tabla III.2. Condiciones empleadas en las determinaciones por ICP-MS.....	42
Tabla III.3. Condiciones experimentales del LA-ICP-MS.....	49
Tabla IV.1. Balance de masas de la concentración de Ag encontrada en las células HepG2 (n =5). [Ag]= 5 mg.L ⁻¹	65
Tabla IV.2. Proteínas alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP10.....	66
Tabla IV.3. Proteínas alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP60.....	67
Tabla IV.4 Proteínas nucleares alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP10.....	76
Tabla IV.5. Análisis por LA-ICP-MS del CRM (BCR664) para los isótopos ¹¹¹ Cd y ²⁰⁶ Pb.....	82
Tabla IV.6. Análisis estadístico de las pendientes de las rectas de calibración externa y de patrón interno (con Au metalizado como PI) en dos diferentes días (P≥ 0.05).....	92
Tabla IV.7. Análisis estadístico de las pendientes de las rectas de calibración externa y de patrón interno (Au (III) como PI) en dos diferentes días (P≥ 0.05).....	95
Tabla IV.8. Condiciones finales de ablación de las larvas de pez cebra para realizar el mapeo.....	101

Tabla IV.9. Concentraciones de Ag, Cd y Hg encontradas por LA-ICP-MS en larvas de pez cebra expuestas los metales Ag, Cd y Hg (n=3, larvas individuales) comparado a los valores medidos por ICP-MS tras una digestión previa (n=3, grupos de 15 larvas).....	105
Tabla IV.10. Media de las concentraciones de AgNP10 y AgNP60 encontradas en tres grupos de 15 larvas (ng.g ⁻¹) y en el medio (µg.L ⁻¹) medido por ICP-MS tras a digestión ácida.....	112
Tabla IV.11. Proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras su exposición a AgNP10.....	117
Tabla IV.12. Proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras su exposición a AgNP60.....	118

RESUMEN

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE ESTRATEGIAS (BIO)ANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD ASOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MODELOS IN-VITRO E IN-VIVO

En la actualidad, las AgNPs, debido a su fuerte actividad antimicrobiana, se utilizan en una gran variedad de productos de consumo, así como en aplicaciones biomédicas, lo que provoca que tanto los seres humanos como el medio ambiente estén cada vez más expuestos a estas nanopartículas. Concretamente, el tamaño de las AgNPs es una de las propiedades más importantes y un factor crítico en lo que se refiere a toxicidad. Por esta razón, la presente Tesis Doctoral ha evaluado mediante el desarrollo y aplicación de diferentes estrategias analíticas y proteómicas la posible toxicidad de estas AgNPs dependiendo de su tamaño. Para ello, se ha empleado un modelo *in vitro* (células HepG2) y un modelo *in vivo* (larva de pez cebra).

En el campo toxicológico la proteómica en combinación con la espectrometría de masas juega un papel fundamental ya que permite identificar y cuantificar una gran cantidad de proteínas en muestras biológicas complejas. Por esta razón, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral consiste en diseñar un estudio proteómico para estudiar la toxicidad de las AgNPs y ver cómo esta difiere según el tamaño de nanopartícula empleado. En primer lugar, se han llevado a cabo varios ensayos de caracterización, viabilidad e internalización celular. A continuación, se han implementado con éxito 2 estrategias de proteómica cuantitativa: SILAC y super-SILAC, en células HepG2 y en larvas de pez cebra, respectivamente, permitiendo así elucidar los mecanismos de toxicidad de dichas nanopartículas de forma diferencial. Los resultados obtenidos demuestran que el tamaño de las AgNPs puede inducir la activación de mecanismos biomoleculares únicos y, por lo tanto, efectos específicos que no serían activados por las mismas AgNPs de tamaño de partícula diferente. Asimismo, se confirma que las AgNP10, debido a su pequeño tamaño, son capaces de internalizar en el núcleo, producir estrés nucleolar y daño al ADN y, como consecuencia, activar mecanismos de reparación del ADN dañado. Con respecto al modelo *in vivo*, las proteínas alteradas fueron mayoritariamente estructurales en ambos casos, lo que justifica alteraciones morfológicas e histológicas observadas durante el desarrollo embrionario y celular de las larvas expuestas a las AgNPs. Al igual que en el modelo *in vitro*, la alteración observada fue más acusada cuando se expusieron las larvas a las AgNPs de menor tamaño, corroborando así su mayor toxicidad. En este sentido, mientras que en larvas expuestas a AgNP10 se encontraron ciertas proteínas relacionadas con apoptosis y con la alteración del ciclo celular, en larvas expuestas a AgNP60 se reflejó en mayor medida la alteración de proteínas relacionadas con el daño mitocondrial e inducción de hipoxia, lo que a

su vez estaría relacionado con la generación de ROS y, en última instancia, la muerte celular. Para complementar los estudios proteómicos realizados en el sistema *in vivo*, resultó interesante conocer la diferente distribución de las AgNPs en función de su tamaño en las larvas de pez cebra ya que puede aportar información adicional sobre sus mecanismos de toxicidad. Una de las técnicas más reconocidas, a día de hoy, para el estudio de la distribución elemental es la técnica LA-ICP-MS. La obtención de imágenes por dicha técnica resulta de gran interés para el análisis de muestras sólidas en una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, debido a la escasez de materiales de referencia certificados en muestras biológicas se hace difícil poder desarrollar una estrategia de cuantificación completamente fiable. Además, durante el proceso de ablación puede haber variabilidad de la señal debido a la influencia de diversos factores entre los que destaca el efecto de fraccionamiento, por lo que se hace imprescindible utilizar un patrón interno adecuado para la normalización de la señal. De esta forma, el siguiente objetivo propuesto en la presente Tesis Doctoral consiste en estudiar la acumulación y distribución de las AgNPs en las larvas en función de su tamaño de partícula mediante LA-ICP-MS para lo que fue necesario previamente desarrollar un método de calibración y semi-cuantificación, el cual, se basó en la utilización de una gelatina de pescado como matriz similar a la muestra de interés enriquecida con Au (III) en disolución como patrón interno. El estudio se hizo utilizando larvas de pez cebra expuestas a Ag, Cd y Hg. Para ello, se optimizaron los parámetros más habituales de esta técnica. A continuación, se hizo un estudio de distribución de los tres metales en la muestra de interés mediante la obtención de imágenes aplicando los parámetros anteriormente optimizados. Finalmente, se aplicó el método de semi-cuantificación desarrollado al estudio de distribución de las AgNPs en las larvas. Las imágenes obtenidas mostraron una mayor acumulación de las AgNPs más pequeñas a lo largo de todo el cuerpo de la larva mientras que las de mayor tamaño se acumularon en mucha menor medida y sólo en el área de la cabeza, confirmando así que el patrón de distribución era diferente según el tamaño de las nanopartículas. La mayor acumulación de las AgNP10 en las larvas concuerda también con los estudios proteómicos realizados en los cuales se demostró una mayor alteración proteica en las larvas expuestas a AgNP10, debido posiblemente a una mayor acumulación de las mismas. De esta forma, tendría sentido pensar que las AgNP10 producen una mayor toxicidad en el organismo al igual que ocurría en las células.

En conclusión, en la presente Tesis Doctoral se han empleado estrategias de proteómica y otras herramientas bioanalíticas en combinación con técnicas analíticas y todas ellas confirman la idea planteada en estudios previos de que el tamaño de partícula es un factor clave a tener en cuenta no sólo desde un punto de vista toxicológico sino también para posibles aplicaciones biomédicas.

SUMMARY

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF (BIO)ANALYTICAL STRATEGIES FOR TOXICITY ASSESSMENT ASSOCIATED TO SILVER NANOPARTICLES BOTH IN VITRO AND IN VIVO MODELS

Nowadays, AgNPs, due to their strong antimicrobial activity, are used in a wide variety of consumer products, as well as in biomedical applications, which causes both humans and the environment to be increasingly exposed to these nanoparticles. Specifically, the size of AgNPs is one of the most important properties and a critical factor in terms of toxicity. For that reason, the present Thesis focuses on the development and application of different analytical and proteomic strategies to show the potential toxicity of AgNPs, depending on their size. *In vitro* (HepG2 cells) and *in vivo* (zebrafish larvae) models have been employed for that purpose.

Proteomics in combination with mass spectrometry plays a fundamental role in toxicological studies since it allows to identify and quantify a high amount of proteins in complex biological samples. For this reason, one of the main goals of this Thesis is to design a proteomic methodology to find out AgNPs toxicity and how it differs according to their size. Firstly, several characterization, viability and cellular internalization assays have been carried out. Subsequently, two strategies of quantitative proteomics, SILAC and super-SILAC, have been successfully implemented in HepG2 cells and in zebrafish larvae, by allowing the mechanisms of toxicity of such nanoparticles to be elucidated and their main differences. Results demonstrated a particular size of AgNPs may induce activation of unique biomolecular mechanisms which might not be activated by AgNPs of different size. Likewise, it is confirmed that AgNP10 are capable of internalizing in the nucleus, producing nuclear stress and DNA damage and, as a consequence, activate damaged DNA repair mechanisms. Regarding the *in vivo* model, structural proteins were mostly altered in both cases, which justifies morphological and histological alterations during the embryonic and cellular development of the larvae exposed to AgNPs, as well as the correct functioning of their organs in formation. Alterations when larvae were exposed to AgNP10, were more pronounced than exposition to AgNP60, corroborating their greater toxicity. In other cases, the alterations occur in different ways, as it happened in the *in vitro* system. As for AgNP10, certain proteins related to apoptosis or alteration of the cell cycle were found, exposition to AgNP60 led to the alteration of proteins in which mitochondrial damage is confirmed, generating hypoxia state, inducing ROS generation and finally leading to cell death.

In order to complement the proteomic studies carried out in the *in vivo* system, it was interesting to know the different distribution of AgNPs depending on their size in zebrafish larvae as it can provide additional information on their toxicity mechanisms. One of the most recognized techniques, at the present time, for the study of elemental distribution is the LA-ICP-MS technique. Imaging by this technique is interesting for the analysis of solid samples in a wide variety of applications. However, due to the lack of certified reference materials, it is difficult to develop a reliable quantification strategy. In addition, during the ablation process there may be variability of the signal due to the influence of several factors such as the fractionation effect, so it is essential to use an adequate internal standard for signal normalization. In this way, the next objective in this Thesis, is to look at the accumulation and distribution of AgNPs in zebra fish larvae as a function of their particle size using LA-ICP-MS. The first step was to develop a calibration and semi-quantification method, which was based on the use of a fish gelatin as a similar matrix to the sample enriched with Au (III) in solution as internal standard. The study was performed using zebrafish larvae exposed to Ag, Cd and Hg by optimizing the main parameters of this technique. Next, a distribution study of the three metals in the sample was made by obtaining images applying the previously optimized parameters. Finally, the semi-quantification method developed was applied to the study of the distribution of AgNPs in the larvae. The images obtained showed a greater accumulation of AgNP10 throughout the entire body of the larva, while AgNP60 accumulated to a much lesser extent and only in the head area, confirming that the distribution pattern was different according to the nanoparticles size. The greater accumulation of AgNP10 in the larvae is also in agreement with the proteomic studies carried out, in which, a greater protein alteration was demonstrated possibly due to a greater accumulation. In this way, it would make sense to think that AgNP10 produce a higher toxicity in the organism in the same way as occurred in cells.

In conclusion, in the present Doctoral Thesis, proteomics strategies and other bioanalytical tools have been used in combination with analytical techniques and all of them support the idea raised in previous studies, size is a crucial factor to take into account, not only from a toxicity point of view, but also for the potential biomedical applications of NPs.

I. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, una buena parte de la investigación en ciencia y tecnología se ha centrado en la fabricación de estructuras atómicas y materiales a escala nanométrica, lo que comúnmente se conoce como “Nanotecnología” (Savage *et al.*, 2007). La European Chemicals Agency (ECHA) (<https://echa.europa.eu/es/regulations/nanomaterials>) define los nanomateriales como aquellos materiales tanto de origen natural como de fabricación industrial, formados por partículas, individuales o agregados, los cuales presentan una o más dimensiones espaciales en una escala comprendida entre 1 y 100 nm.

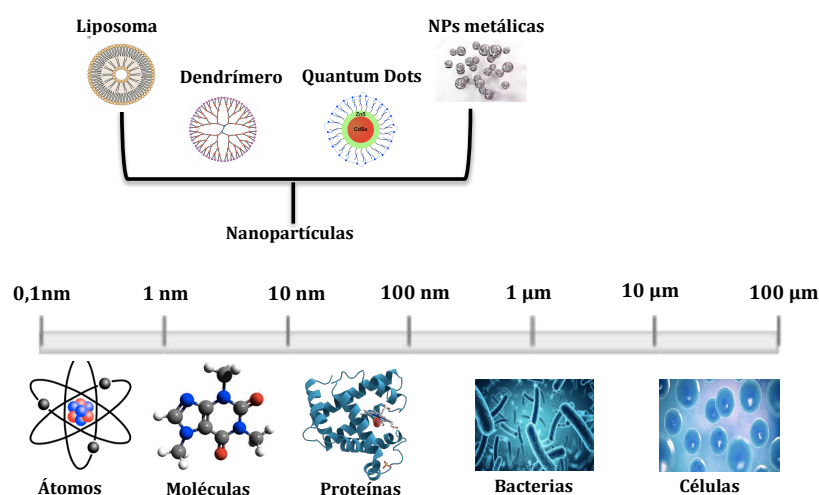


Figura I.1: Rango de dimensiones en el que se encuentran las nanopartículas.

Esta nueva ciencia multidisciplinar proporciona productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición (Medina *et al.*, 2007). Científicos y tecnólogos han centrado su atención en ellas debido a estas propiedades únicas y a su uso potencial en muchas áreas. Si se compara el tamaño de las nanopartículas (NPs) vemos que se encuentran justo por encima del nivel atómico-molecular, y son incluso más pequeñas que algunos organismos vivos (**Figura I.1**).

Las propiedades de las NPs pueden diferir de sus homólogos de mayor escala y son capaces de inducir actividad biológica adicional, pues, a menor tamaño, mayor es el área superficial y la reactividad, lo que les confiere en algunos casos un mayor potencial tóxico, y es precisamente esto lo que sugiere que tales NPs puedan afectar a la salud de los seres humanos y organismos en general.

Las fuentes de NPs pueden ser clasificadas en naturales o antropogénicas (**Figura I.2**). Las de origen natural se producen debido a sucesos naturales, como erupciones volcánicas o incendios forestales. Las de origen antropogénico se generan durante algunos procesos industriales o actividades humanas diarias; por ejemplo, en los procesos de combustión de gasolina o diésel ya que a través de los tubos de escapes de los vehículos a motor se arroja a la atmósfera una gran cantidad de ellas.

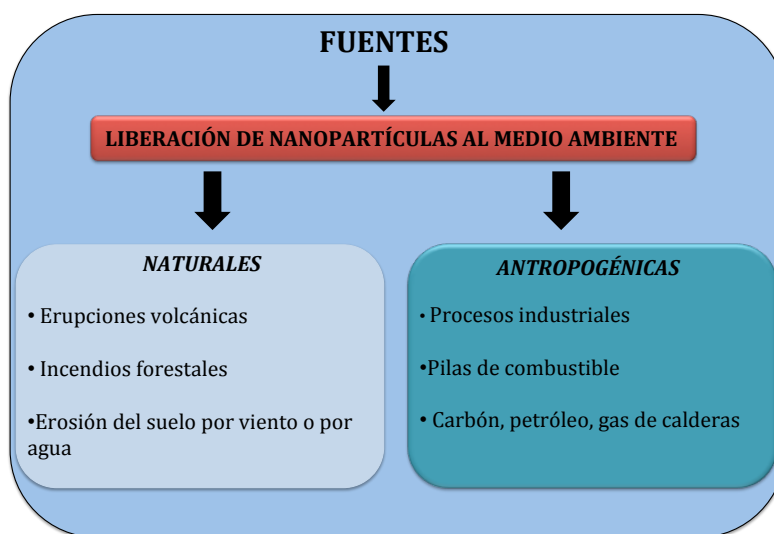


Figura I.2: Fuentes de liberación de nanopartículas en el medio ambiente (modificado de Smitha et al., 2012).

Tanto los seres humanos como el medio ambiente hemos estado expuestos a las NPs desde siempre; sin embargo, en los últimos años la liberación de las mismas se ha incrementado de forma exponencial, debido a que una gran cantidad de empresas las ha incorporado a sus productos (medicamentos, pinturas, cosméticos, cremas solares, dispositivos electrónicos, etc.).

Las NPs poseen una mayor relación superficie/volumen y por tanto una mayor superficie de contacto con el entorno (Maurer-Jones *et al.*, 2010, Yaqoob *et al.*, 2020). Esto hace que los nanomateriales sean muy atractivos para su explotación en múltiples sectores y que la nanotecnología se expanda a un gran ritmo. De esta forma, en muy poco tiempo se ha pasado de una situación en la que prácticamente no existían nanomateriales en nuestro entorno, a estar rodeados por una gran variedad de productos que los contienen en su composición (Burdusel *et al.*, 2018).

El desarrollo de la nanotecnología, no obstante, tiene que ir acompañado de estudios de toxicidad que permitan conocer sus efectos tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Actualmente no existe ninguna legislación específica sobre la nanotecnología y los nanomateriales, aunque sí están incluidos en la definición de “sustancia” según la Regulación Europea de sustancias químicas (REACH). REACH es un Reglamento de la Unión Europea (UE), adoptado con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente contra los riesgos que pueden presentar los productos químicos, a la vez que se potencia la competitividad de la industria química de la UE. En principio, el ámbito de aplicación de REACH se extiende a todas las sustancias importadas o fabricadas contenidas en artículos que se liberen en condiciones de uso normal y que estén presentes en el artículo en cantidades superiores a 1 tonelada/año. Es decir, las sustancias químicas importadas o fabricadas en la UE en más de esa cantidad deben estar registradas en la ECHA (Agencia Europea de los productos químicos), lo que demuestra que su uso es seguro, ya que el expediente de registro o la sustancia en sí pueden ser objeto de evaluación. Este reglamento no sólo se aplica a sustancias utilizadas en procesos industriales sino también a productos utilizados en nuestra vida diaria, como por ejemplo, productos de limpieza, pinturas, ropa, muebles y dispositivos electrónicos (Piao *et al.*, 2011; Burdusel *et al.*, 2018).

Dentro de los diferentes tipos de nanomateriales que se pueden encontrar, los estudios realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han centrado, concretamente, en las nanopartículas de plata (AgNPs), ya que son uno de los nanomateriales más comúnmente utilizados, principalmente debido a su fuerte actividad antimicrobiana.

Algunos estudios sugieren que la toxicidad de las AgNPs es mayor que las partículas de mayor tamaño con la misma composición, debido a una mayor área superficial que mejora la reactividad química, además de favorecer la internalización en las células debido a su reducido tamaño. Este hecho reafirma que las dimensiones de los compuestos empleados en las distintas aplicaciones son críticas no solo en la actividad, sino también en los efectos tóxicos que pueden originar (Gioria *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2018). Por esta razón, la presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de la toxicidad de las AgNPs en función de su tamaño en un modelo *in vitro*, y en comparar sus efectos citotóxicos en un modelo *in vivo*.

I.1. NANOPARTÍCULAS DE PLATA

I.1.1. Características y aplicaciones

La plata (Ag) ha sido ampliamente utilizada desde hace miles de años en aplicaciones como la joyería, orfebrería, fotografía, etc. (Chen & Schluesener, 2008). Civilizaciones antiguas como

los griegos utilizaban este elemento para cocinar y mantener la seguridad del agua. Sus propiedades antimicrobianas ya se utilizaban en la medicina tradicional (Behera *et al.*, 2011).

La abundancia de este elemento en la corteza terrestre es aproximadamente de un $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$, encontrándose principalmente en el basalto y las rocas ígneas, en forma de cloruro, sulfuro o nitrato. Este valor tiende a elevarse en el petróleo crudo y en el agua de las fuentes termales. Las concentraciones de Ag en ríos, lagos y estuarios suelen ser de $0,01 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ para zonas no contaminadas y de $0,01\text{-}0,1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ en áreas urbanas e industrializadas (Howe *et al.*, 2002). Los efluentes antropogénicos con elevadas concentraciones de Ag suelen ser debidos a actividades de fundición, emisarios de aguas residuales, industrias siderúrgicas, industria fotográfica, etc.

Debido al cambio de escala, las AgNPs presentan propiedades entre las que destacan una elevada conductividad térmica y eléctrica, una superficie mejorada de dispersión Raman, una mayor estabilidad química o una actividad catalítica (Fábrega *et al.*, 2011). Es importante destacar que estas propiedades dependen de su morfología, tamaño y distribución así como también del medio en el que se encuentren. Otra de las propiedades que caracteriza este tipo de NPs es la banda de resonancia de plasmón superficial (SPR). Dicho fenómeno ocurre porque los electrones en la superficie de una nanopartícula metálica oscilan al interactuar con una onda electromagnética y se induce un momento dipolar sobre la partícula en un intervalo de tiempo. Cuando la componente eléctrica de la onda electromagnética de un haz de luz visible que incide sobre la NP oscila a la misma frecuencia que los electrones de esta, ocurre el fenómeno de resonancia de plasmón superficial (Martínez *et al.*, 2013). Este fenómeno es dependiente del tamaño, morfología y agente estabilizante, lo que permite una identificación única de las AgNPs a través de su espectro ultravioleta visible (UV-Vis).

Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs. Hoy en día, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado llegando a ser el nanomaterial más utilizado, estando presente en varios centenares de productos (Vance *et al.*, 2015; McGillicuddy *et al.*, 2017). En la **Figura I.3**, se muestra un resumen de las principales aplicaciones.



Figura I.3: Principales aplicaciones de las AgNPs.

Una de las aplicaciones de las AgNPs se encuentra en la industria alimentaria, concretamente en agricultura y en el envasado de alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutas, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos (Aguilar, 2009). Además, también se utilizan para el envasado de alimentos (los denominados envases activos y envases inteligentes), consiguiendo eliminar hasta un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos (Pérez-Surio & Oliver, 2015). Como ejemplo de todo esto, Li *et al.* 2009, investigaron el efecto de un nuevo material de embalaje “nano”, para la preservación de dátiles chinos. Para ello, emplearon un material de envase con incorporación de AgNPs, dióxido de titanio (TiO_2) y kaolin. Los resultados mostraron que los envases además de presentar mejores propiedades de barrera y mecánicas, mantuvieron la calidad de los frutos por más tiempo en comparación con los envases que no contenían un recubrimiento nanoestructurado.

La Autoridad Europea de Normas Alimentarias (EFSA) ha realizado un inventario (<http://nanotechproject.org/cpi/products/bluemoongoodstm-fresh-box-silvernanoparticle-food-storage-containers/>) en el cual se muestra una visión general de las aplicaciones actuales y futuras de la nanotecnología en el ámbito de la alimentación, examina la normativa en la UE y países del tercer mundo, y recopila datos toxicológicos disponibles en los últimos años. El inventario recopila 633 registros, que incluyen 55 nanomateriales y 12 aplicaciones, procedentes todas ellas de búsquedas bibliográficas (más de 9000 referencias), de consultas a webs de empresas de alimentación y de cuestionarios enviados a institutos de investigación,

industrias alimentarias, consultores y otros expertos. Cabe destacar que uno de los mayores registros corresponde a las AgNPs (EFSA Scientific Committee, 2011).

En el ámbito médico y quirúrgico existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano (Cheng *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2007; Verma & Maheshwari, 2019).

Recientemente también se han estudiado materiales basados en AgNPs para evaluar la capacidad bactericida frente a la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) con el fin de obtener nuevas terapias efectivas. Los resultados han demostrado una mayor efectividad para un material consistente en nanopartículas de sílice mesoporosa recubiertas con AgNPs (MSNs-AgBrNPs), el cual ocasiona alteraciones en la pared celular de la bacteria. Así, este material supone una base para nuevos candidatos a vacunas terapéuticas o tratamientos con la posibilidad de combinarse con otros fármacos que puedan alojarse en la estructura mesoporosa (Montalvo-Quirós *et al.*, 2021).

Asimismo, en la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes, productos cosméticos, etc. (Zhang & Sun, 2007). Además, estas NPs están incorporadas en la industria textil para la fabricación de prendas de vestir, ropa interior y calcetines (Lee *et al.*, 2007) ya que mediante la introducción de AgNPs en fibras sintéticas o naturales se consigue una potenciación de la actividad iónica gracias a la mayor cantidad de iones plata que son liberados. El resultado es la obtención de un eficaz efecto antimicrobiano y antiodorante (Chen & Chiang, 2008).

I.1.2. Métodos de síntesis y rutas de exposición

Existen distintas rutas de síntesis de AgNPs que conducen a tamaños, morfología, e incluso estabilidad variables. Estos métodos se pueden clasificar en tres grandes categorías: de síntesis física, química y biológica, esta última también llamada síntesis verde. Hay otra clasificación que atiende a cómo se generan las nanopartículas: técnicas descendentes (*Top-down*), donde se va reduciendo el tamaño de las partículas de partida por molienda, enfriamiento o fotolitografía; y técnicas ascendentes (*Bottom-up*), en las que las AgNPs se generan a partir del ensamblaje de átomos individuales mediante reacciones químicas (Cardoso, 2016).

Algunos de los métodos físicos más utilizados emplean la condensación/evaporación (León-Silva *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2005); también se emplea la irradiación vía

microondas, ultravioleta, ionización o ablación láser (Hwang *et al.*, 2000; Link *et al.*, 2000; Tsuji *et al.*, 2004), la descomposición térmica (León-silva *et al.*, 2016; Lee & Kang, 2004) o la radiólisis con rayos gamma (Temgire & Joshi, 2004). Estas técnicas son poco contaminantes por el uso mínimo o nulo de productos químicos, pero requieren un alto consumo de energía así como de equipos complejos que aumentan el coste de la operación.

La síntesis química fue siempre la más utilizada dada su gran versatilidad, bajo coste y estabilidad (Ge *et al.*, 2014). Desde el punto de vista químico, la síntesis de AgNPs en disolución precisa de métodos que permitan tener el control riguroso sobre el tamaño y la forma de las NPs para obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten propiedades determinadas. La síntesis, en general, se lleva a cabo utilizando un precursor metálico (nitrato de plata principalmente), un agente reductor (borohidruros, ascorbatos, citratos) y un agente estabilizante (suelen ser ligandos, polímeros o surfactantes cargados) (Monge, 2009). La síntesis fotoquímica es otra posibilidad (Sato-Berrú *et al.*, 2009), así como la reducción electroquímica (Zhu *et al.*, 2001). Sin embargo, los restos de algunos productos químicos utilizados son altamente reactivos, no biodegradables y potencialmente perjudiciales para el medio ambiente. Además, algunos de estos productos químicos pueden adsorberse a la superficie de las AgNPs haciéndolos inadecuados para ciertas aplicaciones biomédicas.

Por el contrario, la biosíntesis o síntesis verde de AgNPs merece especial atención debido a una creciente necesidad de métodos de síntesis “amigables” para el medio ambiente, ya que utilizan agentes ecológicos como son las proteínas, péptidos, vitaminas, polisacáridos, aminoácidos u organismos como bacterias, hongos, algas o plantas (León-Silva *et al.*, 2016, Rafique *et al.*, 2017). A modo de ejemplo, uno de estos métodos utiliza la β -D-glucosa como agente reductor en presencia de almidón como agente estabilizante. En este caso concreto, los resultados experimentales mostraron que la superficie modificada por la β -ciclodextrina mejoraba la actividad catalítica de las AgNPs (Li *et al.*, 2017).

Los métodos que se utilizan en la síntesis biológica para producir AgNPs son más económicos, más simples y más factibles que los métodos químicos, además de la ventaja de que la síntesis biológica utiliza productos naturales. Entonces, ¿por qué no son los más empleados a día de hoy? La amplia distribución de tamaños obtenidos, el tiempo biológico, normalmente lento, y el bajo volumen de AgNPs obtenido son los principales obstáculos para que esta técnica sea aceptada y empleada de forma global. Aún así, actualmente, cada vez son más estudios los que utilizan este método para la síntesis de AgNPs (Mahajan *et al.*, 2019; Purohit *et al.*, 2020; Shumail *et al.*, 2021)

A pesar del amplio espectro de utilización de las AgNPs, tal y como se ha visto anteriormente, persiste una notoria falta de información acerca de la exposición humana y medioambiental, así

como sus riesgos potenciales; esta exposición puede venir principalmente del contacto dérmico en textiles, ingestión en alimentos o inhalación (Johnston *et al.*, 2010) aunque recientemente la ruta genital está aumentando debido al uso de AgNPs en productos de higiene personal (Chen & Schluesener, 2008). Por lo tanto, dichas AgNPs pueden tener efectos tóxicos y nocivos en una exposición a medio y largo plazo debido a efectos oxidativos e inflamatorios lo que generaría genotoxicidad y citotoxicidad (Asharani *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Krzyżewska *et al.*, 2016).

La administración oral es una ruta relevante debido al uso de AgNPs en productos relacionados con alimentos. Si la ingestión de Ag metálica, tal y como sugirió Luoma (Luoma, 2008), puede ocasionar la conversión a su forma iónica debido al pH ácido del estómago produciendo así úlceras intestinales y argiria, esto mismo podría ocurrir también con las AgNPs. Varias investigaciones sugieren que tras la exposición oral, es probable que las AgNPs ó los iones plata se trasladen desde el intestino al torrente sanguíneo, y a partir de ahí causen argiria y daño hepático (Silva *et al.*, 2016). Todos los trabajos coinciden en que el órgano diana de las AgNPs es el hígado ya que los macrófagos contenidos dentro del sistema reticuloendotelial son los principales responsables de eliminar las AgNPs de la circulación.

El sistema respiratorio es, lógicamente, la principal vía de entrada para las partículas ambientales. La inhalación de partículas ultrafinas, equivalentes a las NPs en tamaño, está asociada con efectos pulmonares y cardiovasculares adversos (Pope & Dockery, 2006). Tras la inhalación de AgNPs en ratas se han observado depósitos en la cavidad nasal, en la región alveolar de los pulmones y ganglios linfáticos pulmonares (Takenaka *et al.*, 2001, Ávalos *et al.*, 2013). Estas AgNPs depositadas provocan una respuesta inflamatoria, ya que la fagocitosis de las AgNPs puede conducir a la liberación de quimiocinas, citoquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores que originan como resultado la activación de macrófagos alveolares (Sung *et al.*, 2009, Ávalos *et al.*, 2013). Estos mismos autores han mostrado la presencia de AgNPs en el cerebro de ratas expuestas, lo que significa que también se podrían distribuir a través del sistema nervioso.

La vía dérmica es otra de las rutas de entrada preferentes debido a la utilización de AgNPs en textiles, cosméticos, productos médicos y prótesis quirúrgicas, que están directamente en contacto con la piel. Una base de datos danesa (Nanodatabase 2015) muestra más de 1.600 productos de exposición dérmica a las AgNPs: Por ejemplo, en los apósitos para heridas y quemaduras ya que permiten que las AgNPs entren en contacto directo con la piel (Tinkle *et al.*, 2003). Tras la exposición, también se ha observado un aumento de enzimas hepáticas que sugiere que el hígado ha sido dañado como consecuencia del tratamiento con AgNPs. Este hecho

pone en evidencia la disponibilidad de las AgNPs tras el contacto con la piel (Trop *et al.*, 2006) por lo que se plantea la posibilidad de que la permeabilidad de las AgNPs a través de la piel normal pueda ser influida por su habilidad para acceder a capas más profundas a través de folículos pilosos o conductos de sudor, donde la función barrera de la piel está alterada o es más débil (Hoet *et al.*, 2004, Ávalos *et al.*, 2013). Sin embargo, todavía falta más información sobre su capacidad para penetrar a través de la dermis.

I.1.3. Propiedades físico-químicas

Todos los efectos mencionados hasta aquí dependen de las propiedades físico-químicas de las AgNPs (Carlson *et al.*, 2008; Choi & Hu, 2008; Horie *et al.*, 2012). El tamaño es una de las propiedades más importantes de las AgNPs y un factor crítico en la mediación de diversos efectos biológicos como el estrés oxidativo, daño en el ADN, disfunción mitocondrial, captación celular y permeabilización a través de barreras biológicas, tal y como se muestra en la **Figura I.4**. Son numerosos los estudios que han observado una mayor toxicidad con AgNPs más pequeñas existiendo así una correlación inversa entre el tamaño y su citotoxicidad (Liu *et al.*, 2010b; Gliga *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2011a; Nguyen *et al.*, 2018; Ávalos *et al.*, 2019). Las razones de este diferente comportamiento es que las AgNPs más pequeñas exhiben una mayor capacidad para atravesar la membrana celular; una vez internalizadas, las AgNPs más pequeñas tienen un área superficial y un número de partículas mayor para la misma dosis de masa/volumen dando lugar a más interacciones con orgánulos y proteínas celulares (Braydich-Stolle *et al.*, 2010; Kim & Ryu, 2013; Carlson *et al.*, 2008), sin olvidar una mayor liberación de iones Ag^+ , lo que aumenta aún más el potencial tóxico debido probablemente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu *et al.*, 2010a; Gliga *et al.*, 2014; Ávalos *et al.*, 2013; Kittler *et al.*, 2010; Asharani *et al.*, 2009).

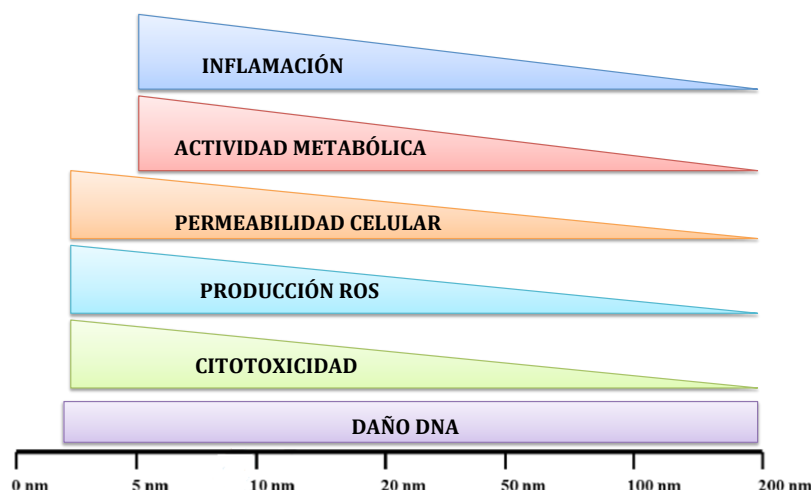


Figura I.4: Efectos de las AgNPs en función del tamaño (modificado de Kausar et al., 2017).

La forma también puede influir en la toxicidad de las AgNPs ya que según la estructura aumenta el tamaño y disminuye el área superficial pudiendo facilitar así su distribución en el organismo. De esta forma, las NPs esféricas y alargadas son menos tóxicas que las triangulares o las que tienen forma de alambre por tener menos caras reactivas (Pal *et al.*, 2007; Akter, 2019; Stoehr, 2011). Otro factor a tener en cuenta y que puede influir en la toxicidad es la carga superficial, que va a depender del recubrimiento que lleven las NPs. En estado natural, sin modificaciones artificiales, la superficie de las AgNPs tiene normalmente carga neta negativa a pH neutro. En cambio, si el recubrimiento contiene ácidos débiles en su superficie, la carga dependerá fuertemente del pH del medio en el que se encuentre. Si la carga superficial es neutralizada en función del pH existente, se producen fenómenos de aglomeración y se favorece su sedimentación (Silva *et al.*, 2016). Así, por ejemplo, las AgNPs estabilizadas con citrato, que posee cargas superficiales negativas, son menos citotóxicas que las AgNPs estabilizadas con cargas superficiales positivas como la polietilenamina ramificada (Badawy *et al.*, 2011).

Aparte de las propiedades físico-químicas de las AgNPs, existe un factor muy importante a tener en cuenta: su tendencia natural a formar aglomerados o agregados (Oberdörster, 2010). Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo Van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos, mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociados cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil. Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las AgNPs en el organismo, ya que un agregado o aglomerado de NPs se deposita en unas zonas u otras debido al distinto diámetro hidrodinámico. Además, también

modifica la toxicidad, ya que al ser una estructura relativamente compacta, el área superficial es menor y por tanto la toxicidad también será menor. Existen algunos estudios que corroboran esta afirmación (Gálvez & Tanarro, 2010; Kaur & Tikoo, 2013). Esta reducción en la toxicidad de las AgNPs debido a su agregación puede ir acompañada de una pérdida de la actividad antibacteriana (Lok *et al.*, 2007). También se sabe que la agregación está muy directamente relacionada con el tamaño: las partículas más pequeñas tienen un mayor coeficiente de difusión, en comparación con las de mayor tamaño en la misma concentración de masa, y se agregan rápidamente en el agua por el movimiento browniano (Da Silva *et al.*, 2011).

La liberación de la Ag^+ a partir de las AgNPs es una de las principales discusiones actuales en lo que respecta a la toxicidad de las AgNPs, ya que todavía es difícil saber si la toxicidad observada de las AgNPs se debe a las propias nanopartículas o es debido a la liberación de iones Ag^+ (Coutiño *et al.*, 2017). Además, factores como el recubrimiento superficial, el tamaño de partícula, la forma, las moléculas coexistentes, la temperatura de almacenamiento y las interacciones *in situ* de las AgNPs con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos pueden afectar a la velocidad de oxidación de la superficie y al grado de disolución de los iones Ag^+ de las AgNPs (McShan *et al.*, 2014; Kittler *et al.*, 2010). Utilizando experimentos controlados de liberación de iones, se ha visto que la unión a grupos tiol o al ligando citrato desaceleran este proceso (Liu & Hurt, 2010). Algunos de los revestimientos que se utilizan para estabilizar las AgNPs, tales como dextrano, almidón y polímeros sintéticos, pueden bloquear la disponibilidad del oxígeno, impidiendo así la oxidación de las AgNPs (Liu *et al.*, 2010a). Por todo ello, es imprescindible realizar una caracterización y análisis detallado antes de realizar cualquier ensayo de toxicidad, además de comprender y controlar la síntesis y las aplicaciones de las AgNPs.

I.1.4. Relevancia de los estudios de toxicidad en sistemas *in vitro* e *in vivo* de las AgNPs en el contexto actual

Existen un gran número de estudios *in vitro*, los cuales, indican que las AgNPs son tóxicas para las células de mamífero derivadas de la piel, hígado, pulmón, cerebro, sistema vascular y órganos reproductivos. Algunos de ellos han demostrado que las AgNPs tienen el potencial de inducir genes asociados con la progresión del ciclo celular, daño al ADN y apoptosis en células humanas a dosis no citotóxicas.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de toxicidad es la internalización en las células, ya que la captación de las AgNPs influye en su fisiología y su funcionamiento normal. Se sabe que la membrana celular presenta abundantes proteínas con grupos tioles, por lo que las interacciones entre las AgNPs y las proteínas pueden jugar un papel importante en la

internalización de las mismas (Chen & Schluesener, 2008). La **Figura 1.5** muestra un esquema de varios mecanismos de toxicidad sugeridos por distintos autores.

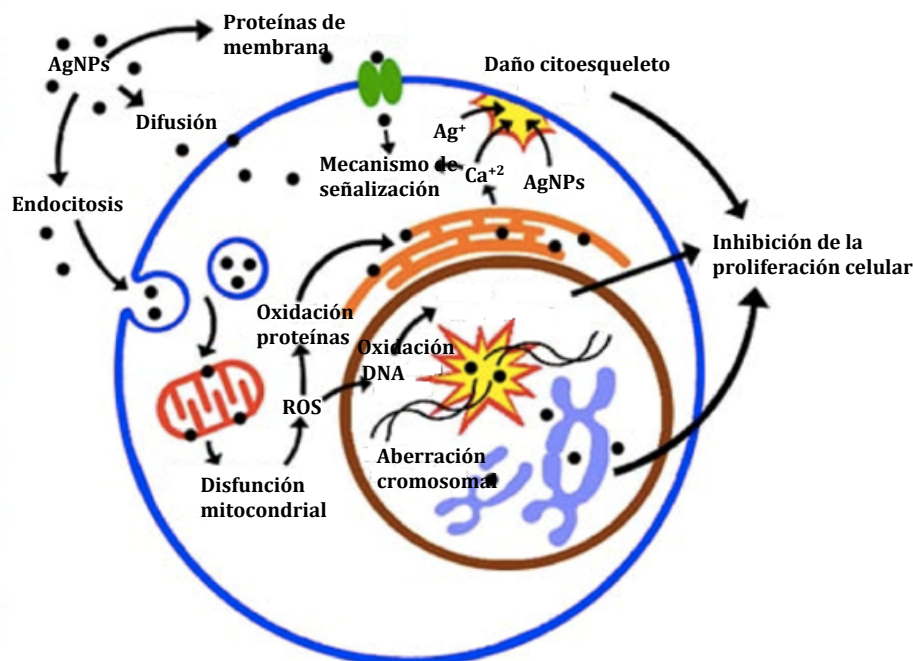


Figura 1.5: Posibles mecanismos causados por la toxicidad de las AgNPs según diferentes estudios (modificado de Asharani *et al.*, 2009).

Los procesos responsables de la captación de las AgNPs incluyen mecanismos activos, como la endocitosis, pasivos como la difusión o a través de proteínas de membrana. Además, hay que tener en cuenta que las AgNPs pueden liberar iones Ag^+ , que pueden ser internalizados por los mismos mecanismos o a través de canales iónicos de la membrana celular (León Silva *et al.*, 2016; Horie *et al.*, 2012; Chen & Schluesener, 2008). Un importante mecanismo de toxicidad para las AgNPs es la interacción de la Ag tanto en forma iónica como nano con proteínas que contienen azufre, debido a la fuerte afinidad de la Ag por este elemento (Hsin *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2009; Mcshan *et al.*, 2014). Asimismo, la Ag^+ liberada de las AgNPs está involucrada en la activación de la liberación de Ca^{2+} mediante cascadas de señalización lo que provocaría un daño en la membrana mitocondrial y como consecuencia una inhibición de la división celular. A nivel molecular, por ejemplo, Asharani *et al.* 2009 o Bressan *et al.* 2013, observaron que las AgNPs se acumulan fuera de la mitocondria, causando daños y alteraciones en el sistema respiratorio, lo que sugiere la interrupción de la cadena respiratoria mitocondrial aumentando así la

producción de ROS e interrumpiendo la síntesis de ATP, lo que causaría daño al DNA y la inhibición de la proliferación celular.

Además de los estudios de evaluación de la citotoxicidad de las AgNPs, en los últimos años, se están llevando a cabo estudios *in vitro* en los que se pretende utilizar las AgNPs para el tratamiento de diversos cánceres. En esta línea temática, se están investigando diversos métodos para dirigir las nanopartículas específicamente al tumor, disminuyendo así su toxicidad sistémica. Por ejemplo, en una de estas investigaciones, las AgNPs se recubren con derivados de hierro que presentan propiedades magnéticas para transportarlas hasta la zona tumoral y con una capa de carbono que las hace tolerables y no tóxicas (Tres *et al.*, 2016)

Cuando se realiza un ensayo de citotoxicidad, los tipos de células se eligen generalmente considerando el órgano en el que más se acumulan las NPs. Es importante tener en cuenta que los efectos tóxicos inducidos por las NPs pueden depender de la línea celular utilizada y estos efectos no tienen que ser necesariamente los mismos al exponer las mismas NPs a otras líneas celulares (Mukherjee *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012). En la presente tesis doctoral se ha utilizado una línea celular de hepatocarcinoma (HepG2) ya que, tal y como se ha comentado anteriormente, las AgNPs se acumulan principalmente en el hígado y bazo (Lu *et al.*, 2011). Estas células se caracterizan por su buen crecimiento y por contener proteínas plasmáticas como la transferrina, fibrinógeno, plasminógeno y albúmina. Crecen en monocapas y formando pequeños agregados. Esta línea celular es la más utilizada y quizá por ello la mejor caracterizada funcionalmente. Se dispone de información muy exhaustiva sobre los efectos de un elevado número de compuestos (hepatotoxinas modelo, fármacos, compuestos químicos) sobre muchos parámetros indicativos de toxicidad celular (viabilidad, integridad de la membrana, proliferación celular, niveles de ATP, estrés oxidativo, potencial de membrana mitocondrial, etc.) utilizando diferentes tecnologías (ensayos convencionales de toxicidad, metabolómica, transcriptómica y análisis de imagen de alto contenido) (Donato *et al.*, 2016).

En la **Tabla I.1** se muestra un resumen de los principales estudios toxicológicos *in vitro* que se han llevado a cabo sobre las AgNPs en células HepG2 en los últimos años.

Tabla I.1: Estudios toxicológicos *in vitro* recientes sobre células HepG2 expuestas a AgNPs de diferentes tamaños, concentraciones y tiempos de exposición.

TAMAÑO (nm)	CONCENTRACIÓN	TIEMPO EXPOSICIÓN (h)	ASPECTOS A DESTACAR	REFERENCIAS
20 y 50	2.5 µg.mL ⁻¹	4, y 24	Sobreexpresión de genes de respuesta a estrés como metalotioneinas (MTs) y proteínas HSPs. Estrés oxidativo y daño ADN.	Sahu <i>et al.</i> , 2015
20 y 200	>100 µg.mL ⁻¹	>48	Ruptura del ADN, aumento de la expresión de genes relacionados con el estrés. Disminución de la expresión de CDKN1B, GREB1 y TRFC.	Brzoska <i>et al.</i> , 2015
30	5 y 11 µg.mL ⁻¹	24 y 48	Desregulación de los genes apoptóticos Bax y Bcl ₂ . Alteración del ciclo celular en la fase S y G2 (inhibición de los genes ciclina B1 y E1).	Bastos <i>et al.</i> , 2016
20-50	12.5-200 µg.mL ⁻¹	48	Disminución de la viabilidad celular a una mayor concentración de AgNPs. Daño oxidativo debido al aumento de la cantidad de malondialdehído (MDA), los niveles de 8-epi- PGF2a y 8-oxo-dG. Sobreexpresión de los genes HSPA1A and HO-1.	Xin <i>et al.</i> , 2016
10, 50 y 100	0.01-50 µg.mL ⁻¹	12 y 24	Las nanopartículas inducen toxicidad dependiente del tamaño a través de la autofagia y permeabilización de la membrana ribosomal debido a la activación de NLRP3.	Mishra <i>et al.</i> , 2016
15	40-160 µg.mL ⁻¹	24 y 48	Arresto del ciclo celular en la fase G2/M, estrés oxidativo (generación ROS) y apoptosis. Daño mitocondrial.	Xue <i>et al.</i> , 2016
20, 40 y 60	0,5-20 µg.mL ⁻¹	24	Estrés oxidativo, disfunción mitocondrial.	Braeuning <i>et al.</i> , 2018
20	50 y 100 µg.mL ⁻¹	2	Generación de ROS. Estrés mitocondrial. Daño ADN.	Grzelak <i>et al.</i> , 2018
23.44 + 4.92	20-160 µg.mL ⁻¹	24 y 48	Estrés oxidativo (producción de ROS), daño mitocondrial. Apoptosis	Xue <i>et al.</i> , 2018
20	20-160 µg.mL ⁻¹	24	Daño ADN y mutación cromosómica.	Wang <i>et al.</i> , 2019
20	10 µg.L ⁻¹	24	Sobreexpresión del gen TNF debido a la inhibición del microRNA (miR-34a). Estrés oxidativo pero no suficiente como para inducir daño al ADN.	Brzóska <i>et al.</i> , 2019
23.44 ± 4.92 nm	20-160 µg.mL ⁻¹	24 y 48	Las AgNPs inducen alteraciones morfológicas y estructurales en la mitocondria afectando así a su función y biogénesis.	Li <i>et al.</i> , 2020
40	1.2 µg.mL ⁻¹	24	Inhibición de la proliferación celular habilitando los puntos control del ciclo celular.	House <i>et al.</i> , 2020

Asimismo, algunos grupos de investigación también están llevando a cabo estudios toxicológicos utilizando organismos biológicos (estudios *in vivo*) típicamente usados para elucidar enfermedades humanas y anomalías del desarrollo debido a la diversidad en la fisiología animal y la anatomía en animales modelo. Los organismos biológicos modelo son aquellas especies que han sido previamente estudiadas con el fin de obtener resultados extrapolables a otras especies. Estos sistemas modelo reúnen características que facilitan tanto su mantenimiento como su manipulación en el laboratorio, obteniendo así resultados en

tiempos razonables. Además, se caracterizan por tener ciclos de vida cortos, un pequeño tamaño, bajo coste y fácil reproducción, siendo conveniente que su morfología y su genoma sean simples para que sea más fácil la interpretación de los resultados (Zarco, 2017).

Se han utilizado varios modelos de animales tanto vertebrados como invertebrados para caracterizar los efectos adversos de las AgNPs (**Figura I.6**). Los más utilizados son la levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae* (Delorme *et al.*, 2015), mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Foriel *et al.*, 2015), nemátodo, *Caenorhabditis Elegans* (González-Moragas *et al.*, 2015), caracol de agua dulce, *Lymnaea stagnalis* (Croteau *et al.* 2011; Stoiber *et al.*, 2015) pez cebra, *Danio rerio* (Montazerolghaem *et al.*, 2015), rana, *Xenopus laevis* (Riccio *et al.*, 2015), ratón, *Mus musculus* (Iguchi *et al.*, 2015). Estos modelos nos ayudan a entender mejor la maquinaria molecular reguladora.

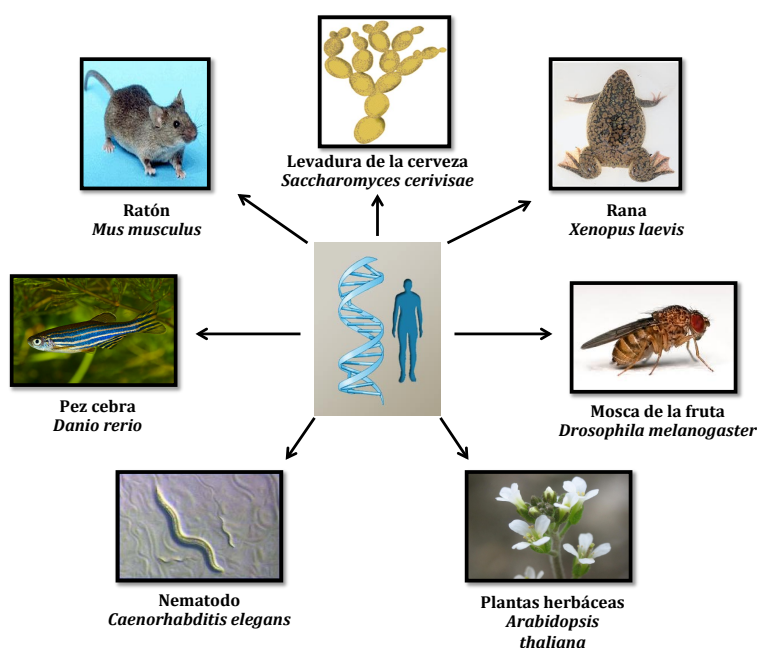


Figura I.6: Organismos modelo más utilizados para estudios *in vivo* tras la exposición a AgNPs.

Todos los test normalizados de ensayo para evaluar el nivel de toxicidad y peligrosidad de sustancias químicas contaminantes precisan un número muy elevado de pruebas reguladas que pueden, como ya se ha comentado, ser llevadas a cabo con organismos vivos. Además de ser estudios muy costosos y que requieren mucho tiempo, implican el sacrificio de un número muy alto de animales de laboratorio. Desde hace unos pocos años se están desarrollando nuevos métodos alternativos en experimentación animal que cumplan el principio de las "3R" (Reemplazar, Reducir y Refinar). Estos métodos reclaman la sustitución de los ensayos con

animales *in vivo* por la realización de estudios *in vitro*, que son llevados a cabo principalmente en líneas celulares, en especies microbianas unicelulares como bacterias o levaduras, o bien en organismos acuáticos en fases juveniles de crecimiento reduciendo así los tiempos de exposición y el empleo de seres vivos. Estos organismos se han convertido en objeto de estudio de la investigación biológica y en la actualidad son piezas clave de la investigación biomédica. Se les podría llamar organismos simples o de experimentación (López-Serrano, 2014). Además, deben presentar características distintivas (embriones de gran tamaño, linaje celular fijo, transparencia, etc) interesantes para el estudio de determinados procesos. En la presente Tesis Doctoral se han utilizado las larvas de pez cebra como modelo biológico para el estudio de la toxicidad de las AgNPs.

El pez cebra, *Danio rerio*, es un pez de agua dulce tropical (**Figura I.7**), teleósteo, de la familia Cyprinidae, y, junto con el ratón, se considera el modelo por excelencia en el estudio de la biología de vertebrados (Chakraborty *et al.*, 2017). Ofrece una poderosa combinación de características embriológicas, genéticas y celulares, que lo hacen el candidato ideal como organismo de estudio para entender y comparar diferencias y similitudes entre distintas especies de vertebrados.

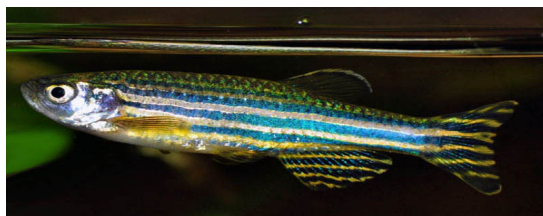


Figura I.7: Ejemplar de pez cebra.

Los embriones y larvas de este animal son idóneos para estudios genéticos debido a su pequeño tamaño y enorme número de individuos por puesta (la hembra puede poner hasta 200 huevos de una sola vez). Esto último permite analizar miles de compuestos terapéuticos de manera rápida, algo que con ratones implicaría más tiempo y dinero. Al ser transparentes pueden realizarse observaciones microscópicas en tiempo real. Además, es especialmente apreciado por su homología genética con el hombre (casi el 80%) lo que permite que los resultados obtenidos en estos animales sean potencialmente extrapolables al ser humano, haciéndolo el candidato perfecto para el estudio de enfermedades humanas como el Alzheimer, el cáncer o las deficiencias cardíacas. Asimismo, tienen un rápido desarrollo; sus órganos se forman en sólo 24 horas, gracias a lo cual se pueden realizar diferentes experimentos en una misma generación de animales, investigar la evolución de las patologías e identificar las causas de las enfermedades

investigadas. Su pequeño tamaño, como ya se ha mencionado, hace fácil su almacenaje, resultando en bajo coste de mantenimiento. Por último, la elección de larvas y embriones en lugar de peces adultos conlleva menos restricciones éticas ya que no se consideran animales de laboratorio por la Directiva de la UE 86/609/CEE relativa a la protección de los animales utilizados para la investigación experimental y otros objetivos científicos (Seth *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014). Por último, el genoma de *Danio rerio* está secuenciado, lo que permite aislar y manipular cualquier gen de este organismo, por ejemplo, induciendo mutaciones o afectando la expresión de genes específicos y analizar las consecuencias de dichas perturbaciones puesto que se pueden visualizar los productos de la expresión génica *in situ*, sin necesidad de seccionar el tejido (López-Serrano *et al.*, 2014).

Hay numerosos estudios *in vivo* sobre citotoxicidad y genotoxicidad de AgNPs en larvas de pez cebra. En la **Tabla 1.2** se muestran algunos de los trabajos más recientes. En esta revisión, los autores han indicado que las AgNPs producen principalmente malformaciones estructurales y de desarrollo, daños en el desarrollo neuronal entre otros. Las causas comunes de la toxicidad inducida por AgNPs incluyen principalmente estrés oxidativo, daño al ADN y apoptosis.

Tabla I.2: Estudios toxicológicos in vivo de las AgNPs en pez cebra.

TAMAÑO (nm)	CONCENTRACIÓN	TIEMPO EXPOSICIÓN	ASPECTOS A DESTACAR	REFERENCIAS
5-20	30,60 y 120 mg.L ⁻¹	24 h	Estrés oxidativo (aumento del nivel de GSH total y la expresión de MT2), sobreexpresión de marcadores pro-apoptóticos (BAC1, Noxa, P21), rotura del ADN y sobreexpresión de γ -H2AX y P53.	Choi <i>et al.</i> , 2010
40-180	0.01, 0.05 μ g.L ⁻¹ Ag+ 100, 1000 μ g.L ⁻¹ AgNPs	48 h	Las larvas expuestas a AgNPs mostraron una acumulación más baja que las expuestas a Ag+, y por tanto una menor toxicidad.	Lopez-Serrano <i>et al.</i> , 2014
4 y 10	0.5-23mg.L ⁻¹	4-96 h	Daños en el desarrollo neuronal de una manera dependiente del tamaño. AgNPs de 4nm se acumulan en mayor cantidad en la cabeza, mostrando anomalías, tales como, cabeza y ojo pequeño y defectos cardíacos.	Xin <i>et al.</i> , 2015
10-20	5, 100 mg.L ⁻¹	4, 24, 48 h	Toxicidad dependiente de la dosis en el desarrollo embrionario, afectando a su desarrollo y provocando deformidad, desarrollo retardado y muerte.	Xia <i>et al.</i> , 2016
5-50	71.1 μ g.L ⁻¹	14 días	Acumulación de AgNPs en las branquias y el hígado. Estrés oxidativo e inmunotoxicidad.	Krishnaraj <i>et al.</i> , 2016
20	10 μ g.L ⁻¹ AgNPs y Ag+	21 días	Acumulación de plata en branquias, intestinos e hígado. Daños en las branquias y efectos en los lisosomas hepáticos	Lacave <i>et al.</i> , 2018
20	Diferentes concentraciones AgNPs y Ag+	21 días	Ningún efecto adverso con respecto al crecimiento ni a la viabilidad. Estudios por SIMS mostraron que la plata se acumula en los vasos sanguíneos del hígado y en el tejido intersticial entre el intestino y el hígado.	Cambier <i>et al.</i> , 2018
10-50	17 μ g.L ⁻¹ nanoesferas 42 μ g.L ⁻¹ nanoplatos 65 μ g.L ⁻¹ Ag+	96 h	Las AgNPs de formas diferentes inducen estrés oxidativo y en general mayor toxicidad que la plata iónica. Las que tienen forma de plato resultaron ser más tóxicas que las esféricas.	Abraamenko <i>et al.</i> , 2018
<30	12.25 μ g.L ⁻¹	14 días	Daño membrana, núcleos picnóticos e interrupción completa de las células branquiales y hepáticas. Estrés oxidativo	Ramachandran <i>et al.</i> , 2018
43.94 $\pm$ 1.43 nm	10, 33, 100 μ g.L ⁻¹	5 semanas	Estrés oxidativo, apoptosis de células germinales a través de la vía mitocondrial-dependiente.	Ma <i>et al.</i> , 2018
10, 40, 100	1, 10, 100, 200 mg.L ⁻¹	4 días	Las nanopartículas de menor tamaño mostraron ser más tóxicas en el intestino y branquias.	Liu <i>et al.</i> , 2019
50	8,45,70 μ g.L ⁻¹	30 días	No se muestra alteración o lesiones en el epitelio corneal.	Pecoraro <i>et al.</i> , 2019
40	0.4 mg.L ⁻¹	24	Daño en la formación de circuitos neuronales y actividades motoras. Las AgNPs indujeron propiedades anormales de la membrana eléctrica a causa de la liberación de Ag ⁺ durante la embriogénesis.	Zhao <i>et al.</i> , 2019
4 y 10	0.481, 0.963 and 1.925 mg/L	4-96 h	Perturbaciones en el desarrollo en embriones y transcripción de dos genes relaciones con la hipoxia y el transporte de membrana en embriones expuestos a AgNPs de menor tamaño.	Qiang <i>et al.</i> , 2020
35 $\pm$ 10 nm	0.2 mM	24 h	No induce mortalidad	Ottoni <i>et al.</i> , 2020

I.2. PROTEÓMICA CUANTITATIVA

El término proteómica apareció por primera vez en 1994 y se refiere al estudio de proteínas a gran escala, su estructura y papel fisiológico o las funciones que realizan en un organismo concreto. El análisis del proteoma de una célula es muy complejo, ya que está en constante cambio en función de las necesidades biológicas en respuesta a estímulos internos y externos (Shah & Misra, 2011).

I.2.1. Empleo en estudios toxicológicos

A pesar de que el campo principal de aplicación de la proteómica es el área biomédica, existen estudios donde se han empleado diferentes estrategias proteómicas para evaluar el potencial tóxico de una amplia variedad de compuestos, tales como metales (Cuello *et al.*, 2012, Sánchez-Cabezas *et al.*, 2016; García-Calvo *et al.*, 2021), fármacos (Campos *et al.*, 2016), nanopartículas (López-Heras *et al.*, 2015; Gioria *et al.*, 2018; Montalvo-Quirós *et al.*, 2019), o compuestos orgánicos (Tomé-Carneiro *et al.*, 2017), entre otros. Los métodos de cuantificación de proteínas son especialmente importantes, ya que permiten identificar proteínas diferencialmente expresadas entre dos o más muestras correspondientes a diferentes estados, permitiendo así identificar los mecanismos biomoleculares que se ven alterados tras la exposición a un determinado agente tóxico. Para ello, se necesita una cuantificación relativa de las proteínas que permita clasificar el conjunto del proteoma en: proteínas que no se alteran, proteínas inhibidas o proteínas sobreexpresadas en un determinado sistema tras la exposición a un tóxico concreto en unas condiciones experimentales previamente seleccionadas.

Por ello, en la actualidad la proteómica cuantitativa es una de las herramientas más utilizadas en el estudio de diferentes patologías. Entre las diferentes estrategias de cuantificación de proteínas encontramos los geles bidimensionales empleando tinción con plata (Zhen *et al.*, 2007) o marcaje DIGE (Differential In-gel Electrophoresis) (Kieffer *et al.*, 2008) y técnicas más sofisticadas que emplean la espectrometría de masas para la detección y cuantificación de las proteínas, tales como las estrategias SILAC (Stable Isotopic Labeling by Amino acids in Cell culture) o iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) (Cuello *et al.*, 2012).

I.2.2. Estrategias SILAC y super-SILAC

En la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo estudios proteómicos basados en la estrategia SILAC para el estudio de mecanismos de toxicidad de las AgNPs en células HepG2. Se trata de la técnica recomendada para el marcaje de líneas celulares, ya que prácticamente cualquier cultivo celular puede ser marcado. La selección de este tipo de marcaje metabólico

permite minimizar los errores del tratamiento de muestra, y a su vez facilita el análisis en un solo experimento del contenido proteico de lisados totales de determinadas líneas celulares, alcanzando una elevada exactitud en los resultados. Es importante destacar que esta metodología también permite la combinación con diferentes métodos de fraccionamiento y aislamiento de determinados grupos de proteínas, con el fin de mejorar la cuantificación de proteínas que se encuentren en menor abundancia en la célula. Además, el empleo de dicha estrategia permite la cuantificación relativa de proteínas y, por tanto, la identificación de proteínas expresadas diferencialmente entre dos estados celulares distintos: uno tratado con un agente externo respecto a uno sin tratar (Mann, 2006; Ong *et al.*, 2006). El conjunto de proteínas desreguladas identificadas mediante SILAC, así como aquellas descartadas por no encontrarse alteradas, constituyen la clave para un mejor entendimiento e interpretación del mecanismo molecular implicado en el proceso estudiado.

Como se muestra en la **Figura I.8**, la estrategia SILAC consiste en cultivar dos poblaciones celulares (A y B), en medios de cultivo idénticos, salvo por la sustitución en uno de los medios de unos aminoácidos determinados (generalmente lisina y arginina) por su versión “pesada”, en la cual se sustituyen los átomos de ^{12}C por átomos de ^{13}C , los de ^{14}N por ^{15}N , o ambos. La incorporación de los mencionados aminoácidos “pesados” se realiza de manera metabólica, por lo que en primer lugar hay que realizar un estudio de la cinética de marcaje para comprobar el número de doblajes celulares que son necesarios para conseguir una eficiencia de marcaje del 100%. Asimismo, para la línea celular empleada en esta tesis doctoral (HepG2), se realizó un estudio previo de cinética de marcaje, siendo necesarios 5-6 doblajes celulares para un marcaje completo. En la población A todas las proteínas presentes en las células tienen sus aminoácidos según la abundancia isotópica natural de sus átomos, mientras que en la población B, todas las proteínas están marcadas isotópicamente con los aminoácidos “pesados” correspondientes. A continuación, ambas poblaciones son mezcladas en relación 1:1, de forma que el proceso analítico se hace a partir de este punto con una única muestra, minimizando así enormemente la introducción de errores. Tras aplicar dicho proceso analítico, que generalmente implica varias etapas (purificación y aislamiento de subproteomas, separación de proteínas, digestión, etc.), los péptidos son analizados mediante la técnica acoplada de nanocromatografía de líquidos-espectrometría de masas (nanoLC-MS).

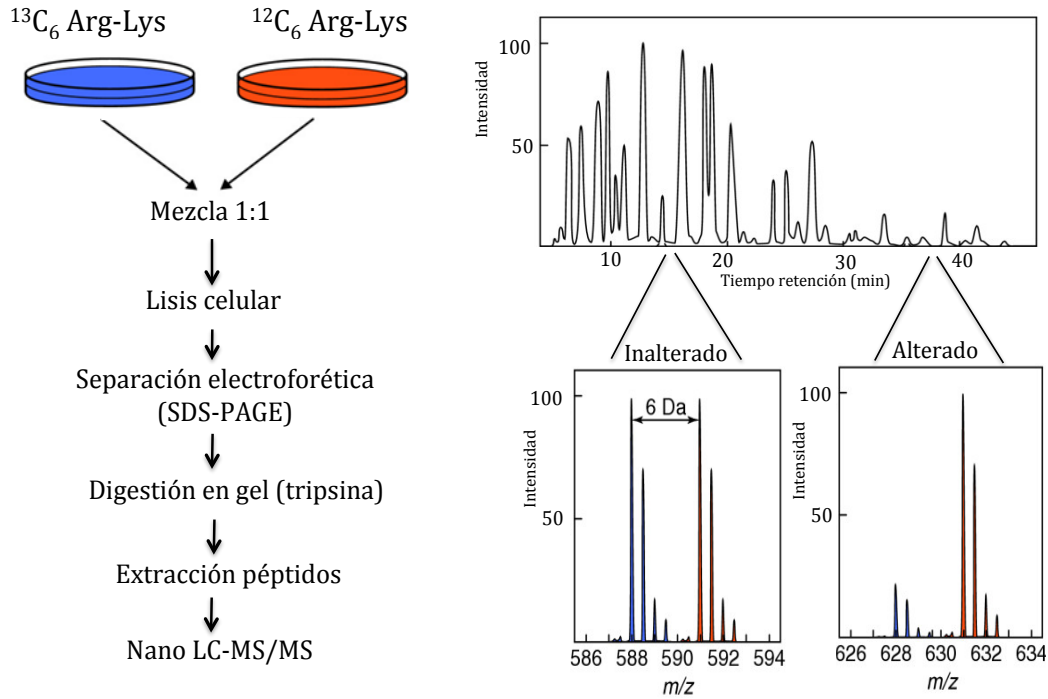


Figura I.8: Esquema general de las etapas del procedimiento de la estrategia SILAC.

Dado que los péptidos iguales procedentes de las poblaciones A y B son químicamente idénticos, salvo por la presencia de ^{12}C o ^{13}C , se comportan del mismo modo cromatográficamente, por lo que serán detectados en el espectrómetro de masas al mismo tiempo. Cada péptido, aparece en el espectro de masas como un doblete, con una diferencia de masa que dependerá del número de átomos de C marcados, y de la carga con la que haya ionizado el péptido. De esta forma, se puede relacionar la diferencia de intensidad relativa de estos péptidos con la abundancia relativa de las proteínas a las que pertenecen dichos péptidos en las poblaciones originales A y B (Ong *et al.*, 2006). Para cada proteína se obtiene por tanto el llamado *cociente SILAC*, el cual se calcula mediante la Ecuación I.1:

$$R_{\text{SILAC}} = \frac{\frac{I_{\text{PA}}}{I_{\text{LA}}} + \frac{I_{\text{PB}}}{I_{\text{LB}}} + \frac{I_{\text{Pn}}}{I_{\text{Ln}}}}{n}$$

Ecuación I.1

donde A y B son las dos poblaciones, I_{P} es la intensidad de pico del péptido “pesado” (procedente de la población B), I_{L} la intensidad de pico del péptido “ligero” (procedente de la población A) y “n” el número de péptidos cuantificados para esa proteína, ya que cada proteína se cuantifica con al menos dos péptidos.

De manera simultánea se lleva a cabo la identificación de las proteínas mediante los espectros de MS/MS de cada péptido. Generalmente se marcan los aminoácidos Lysina (Lys) y Arginina (Arg), ya que la enzima proteolítica más comúnmente usada para la digestión de proteínas es la tripsina, la cual corta las proteínas en las posiciones de los residuos Arg y Lys; de esta manera se asegura que cada péptido va a tener al menos un aminoácido marcado isotópicamente en su secuencia. Cuando una proteína presente un cociente SILAC igual a 1, implicará que dicha proteína está igualmente expresada en las dos poblaciones A y B estudiadas. Proteínas cuyo cociente SILAC sea mayor que 1 estarán sobreexpresadas en la población B (marcada con isótopos pesados) respecto a la población celular A y, de la misma manera, cocientes SILAC menores a 1, indicarán inhibición de esa proteína en la población B respecto a la A. Aquellas proteínas que tengan un R_{SILAC} diferente de 1 representarán a proteínas cuya abundancia entre los dos estados es diferente, y por tanto, se tratará de proteínas implicadas en el proceso objeto de estudio. Una vez que se ha conseguido el marcaje metabólico y la preparación de la muestra, el siguiente paso es la cuantificación de las proteínas, para lo que son necesarias etapas de fraccionamiento de la muestra, extracción y purificación, análisis por espectrometría de masas e interpretación de los datos obtenidos. Aunque en proteómica cuantitativa, la abundancia de las proteínas se puede medir durante el fraccionamiento de la muestra (proteómica cuantitativa basada en la electroforesis bidimensional), en este caso nos vamos a centrar únicamente en el análisis por masas (MS). Las proteínas se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) como agente desnaturizante. Además de la adición de SDS a la muestra, se suele emplear un agente reductor como el ditioneitol (DTT) o el 2-mercaptoetanol (β -ME), que ayuda a la desnaturalización de las proteínas reduciendo los enlaces disulfuro y desplegando, por tanto, algunas formas conformacionales terciarias (Lomonte, 2009). Una vez separadas las proteínas, se procede a la tinción de las mismas en el gel para poder visualizarlas antes de proceder a su tratamiento de digestión. Para ello, se utiliza generalmente azul de Coomassie (CBB) ya que es mucho más simple y rápido de utilizar que otros métodos, presentando una sensibilidad que oscila entre 0,1-0,5 μ g de proteína total (Brunelle & Green, 2014). Antes de proceder a la digestión de las proteínas, es necesario una vez cortadas las bandas, desteñirlas para eliminar el agente colorante y así evitar interferencias en la etapa de medida. Una vez realizado el proceso de fijación, tinción y distinción, se procede a la etapa de digestión. Para ello se utiliza una enzima que sea altamente selectiva y que corte a la proteína en los residuos de Lys y Arg; normalmente se utiliza la tripsina. La última etapa de este proceso consiste en la extracción de los péptidos generados tras la digestión, que se lleva a cabo mediante una extracción sólido-líquido. El extracto final de péptidos obtenido combinando los extractos de las diferentes

extracciones se lleva a sequedad mediante centrifugación a vacío y se procede a su posterior análisis mediante espectrometría de masas (Luque-García *et al.*, 2011). Es importante destacar aquí que para llevar a cabo una buena interpretación de los resultados obtenidos tiene que existir una incorporación completa de los aminoácidos pesados. En líneas celulares inmortalizadas, se puede obtener el marcaje de las proteínas al prácticamente 100% tras 6-8 doblajes dependiendo de la línea celular empleada en medios suplementados con aminoácidos pesados (Ong *et al.*, 2002); esta metodología se considera una de las técnicas de cuantificación más poderosa dentro de la proteómica dada su alta exactitud y simplicidad. Todo este proceso está más detallado en el Anexo A.

No obstante, el estudio de modelos animales es esencial para comprender mejor el efecto tóxico de un compuesto, por lo que es necesario realizar en muchas ocasiones estudios del proteoma de un sistema *in vivo*. Se han realizado trabajos de marcaje metabólico de ratones con $^{13}\text{C}_6$ -lisina (Rauniyar *et al.*, 2013). Sin embargo, esta metodología requiere mucho tiempo, es costosa y no puede aplicarse a humanos. Es por esta razón que se ha desarrollado una variante de la estrategia SILAC, conocida como super-SILAC, que se ha utilizado satisfactoriamente para la cuantificación de diferentes tejidos, demostrando su aplicabilidad (Geiger *et al.*, 2010; Deeb *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2017).

Dicha técnica se basa en el uso de una mezcla de diferentes líneas celulares representativas del tejido a estudiar marcadas con los aminoácidos SILAC. La mezcla de células se emplea como estándar interno tanto en el tejido control como en el tejido tratado, de forma que, se puedan comparar las proteínas de ambos tejidos. El análisis de las muestras se realiza también mediante espectrometría de masas. Al igual que en el experimento SILAC, se obtiene un $R_{\text{super-SILAC}}$ para cada proteína cuantificada. En este caso, para cada uno de los experimentos se obtiene un R_{SILAC} para las diferentes proteínas cuantificadas. En nuestro caso, se han empleado larvas de pez cebra como modelo *in vivo*. El R_{SILAC} (control) para las larvas control mezcladas con la mezcla super-SILAC tal y como se explica en la sección de Materiales y Métodos, y el R_{SILAC} (tratadas) para las proteínas de las larvas expuestas a AgNPs se muestran en las ecuaciones I.2 y I.3, respectivamente.

$$R_{SILAC}(control) = \frac{A_{mezcla\ 1}/A_{LC1} + A_{mezcla\ 2}/A_{LC2} + \dots + A_{mezcla\ n}/A_{LCn}}{n}$$

Ecuación I.2

$$R_{SILAC}(tratado) = \frac{A_{mezcla\ 1}/A_{LT1} + A_{mezcla\ 2}/A_{LT2} + \dots + A_{mezcla\ n}/A_{LTn}}{n}$$

Ecuación I.3

donde A_{mezcla} representa las áreas de los péptidos pesados procedentes de la mezcla super-SILAC; A_{LC} las áreas de los mismos péptidos pero procedentes de la muestra de larvas control (LC), A_{LT} las áreas de los mismos péptidos pero procedentes de la muestra de larvas expuestas a AgNPs (LT), y “n” el número de péptidos cuantificados para la proteína en cuestión. Dado que las áreas de los péptidos procedentes de la mezcla super-SILAC (A_{LC}) son iguales en ambos R_{SILAC} , se pueden dividir ambos cocientes para obtener el $R_{super-SILAC}$ (Ecuación I.4) que permite relacionar directamente la expresión de las proteínas entre las dos muestras de larvas (control y tratadas).

$$R_{superSILAC} = \frac{R_{SILAC}(control)}{R_{SILAC}(tratado)}$$

Ecuación I.4

Por tanto, este método se divide en dos etapas: la primera de ellas consiste en la cuantificación de las proteínas de cada tejido sin marcar con respecto a las células marcadas, utilizando la relación de los dos cocientes SILAC. En la segunda etapa, se calcula, en función de la relación de los dos cocientes SILAC obtenidos en la primera etapa, las diferencias entre las muestras de tejido. En la **Figura I.9** se esquematiza de forma resumida la comparación entre ambas metodologías (SILAC y super-SILAC). Esta metodología también aparece más detallada en el Anexo A.

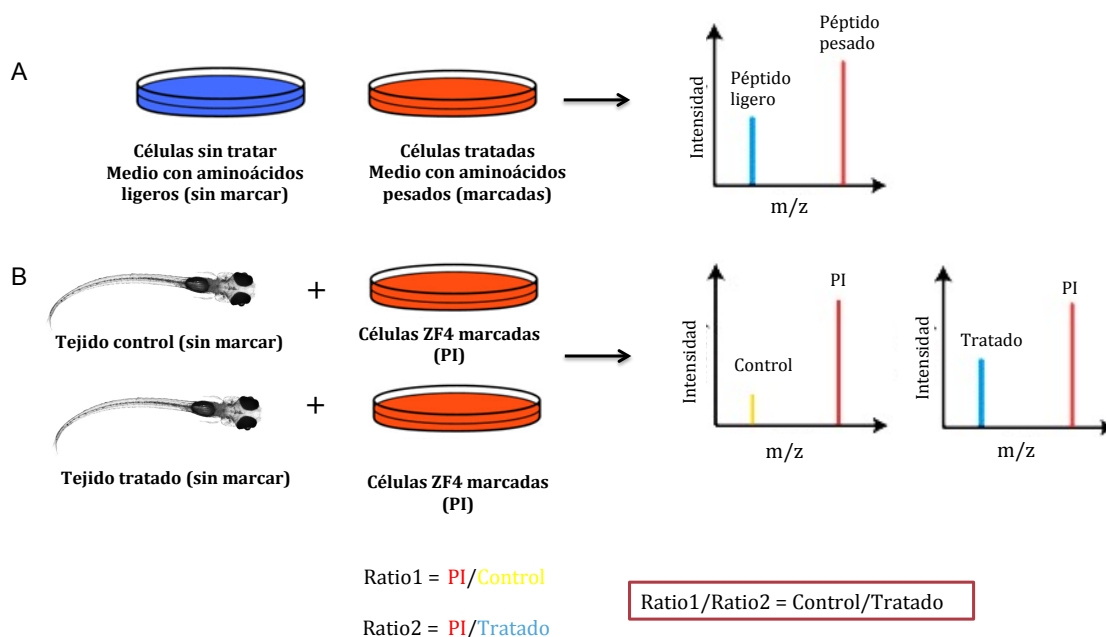


Figura I.9: Esquema de la metodología SILAC (A) y super-SILAC (B).

I.3. LA-ICP-MS COMO TÉCNICA DE IMAGEN Y SEMI-CUANTIFICACIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS EN TEJIDOS BIOLÓGICOS

El interés por el estudio de la distribución elemental en muestras biológicas y obtención de imágenes ha ido en progresivo aumento y es un objetivo analítico prioritario hoy en día. Las técnicas más empleadas para el análisis de la distribución elemental en muestras sólidas son la fluorescencia de rayos X con radiación de sincrotrón (SXRF) (Majumdar *et al.*, 2012), la espectrometría de masas de ión secundario (SIMS) (Vickerman & Winograd 2013), y el acoplamiento entre la ablación láser con ICP-MS (LA-ICP-MS) (Becker *et al.*, 2008). Desde que Kindness *et al.* 2003, publicaran un estudio donde mostraban la distribución de Cu y Zn en un tejido de hígado mediante LA-ICP-MS, esta técnica ha experimentado un gran auge, existiendo en la actualidad una gran cantidad de trabajos donde se estudian distribuciones elementales en estructuras biológicas. Concretamente, dicha técnica se basa en la interacción de un haz láser con una muestra sólida, produciéndose el desprendimiento de una pequeña cantidad de material en forma de partículas. Estas partículas rondan un tamaño entre los nm y μm , las cuales son arrastradas en forma de aerosol por un gas inerte hacia el ICP, que actúa como fuente de ionización. Los iones generados son llevados finalmente a un analizador de masas, generalmente se trata de un cuadrupolo.

Durante el proceso de ablación de la muestra, existen numerosos factores que pueden influir en la señal analítica obtenida, entre ellos, la potencia del láser, la longitud de onda, la longitud de pulso, la relación profundidad/diámetro del cráter formado, la composición de la matriz, y el modo de ablación (Hoffman *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2007). Diferentes autores han estudiado el fenómeno físico conocido como “fraccionamiento elemental” (García *et al.*, 2009; Zang *et al.*, 2016), que consiste en un proceso complejo que se puede originar durante la formación del aerosol, durante su transporte hacia el ICP, o durante la atomización e ionización en el ICP. Al incidir el láser en la muestra y producir el aerosol, la composición del mismo puede no ser representativa de la muestra porque haya habido una evaporación preferente de los elementos volátiles en el gas portador, por ejemplo. Además, durante el transporte hacia la fuente de ionización, el tamaño de partícula va a determinar la velocidad de transporte, por lo que es conveniente que la distribución de partículas sea homogénea y de pequeño tamaño. Adicionalmente, la distribución de tamaños en el aerosol afectará al comportamiento en la descomposición. También puede ocurrir que en el transporte del aerosol hacia el ICP haya partículas que no se hayan evaporado completamente. Con el objetivo de minimizar el fraccionamiento elemental se han llevado a cabo numerosos estudios, los cuales, permiten poder hacer una elección óptima de diversos parámetros entre los que cabe destacar: la longitud de onda del láser (infrarrojo frente a ultravioleta) (Gunther & Hattendorf, 2005), la duración del pulso del láser (nanosegundos frente a femtosegundos) (Poitrasson *et al.*, 2003), el gas portador (Ar frente a He o Ne) (Horn & Günther, 2006) o el diseño de la celda de ablación (Pisonero *et al.*, 2006). Además del efecto del fraccionamiento, la señal elemental se puede ver modificada por fluctuaciones en la potencia del láser, por falta de homogeneidad en la matriz de la muestra, por variaciones en la masa y la eficiencia de transporte al plasma del material ablacionado, o por la propia inestabilidad de la señal del ICP-MS.

Debido a todo lo comentado hasta aquí, y considerando que el tiempo necesario para obtener la bioimagen de un tejido es elevado en función del tamaño del mismo, la comparación de las señales obtenidas para diferentes muestras o tejidos analizados en diferentes sesiones de medida se convierte en una tarea complicada. Por todo ello se hace necesario el empleo de protocolos de normalización y corrección de la señal. El procedimiento más habitual de normalización consiste en realizar una estandarización interna de las señales mediante la medida simultánea de un patrón interno (PI). Sin embargo, a diferencia del análisis directo por ICP-MS, la elección de un PI adecuado para LA es más complicado. Diferentes estándares internos han sido investigados para el análisis elemental cualitativo y cuantitativo empleando la técnica LA-ICP-MS con el propósito de corregir las variaciones en la ablación, en el transporte del aerosol y la deriva instrumental. (Konz *et al.*, 2013; Bonta *et al.*, 2014). Se ha propuesto el

empleo de ^{13}C como patrón interno (PI), poniendo de manifiesto que es un buen candidato debido a su buena resolución con respecto al pico adyacente y de alta abundancia de ^{14}N , y a su respuesta lineal con respecto a la cantidad de masa ablacionada (Austin *et al.*, 2011; Hare *et al.*, 2012). Sin embargo, la señal de ^{13}C puede ser debida en parte al carbono atmosférico y no necesariamente al contenido de ^{13}C que haya en la muestra. Esto normalmente se aprecia cuando la señal va aumentando o disminuyendo progresivamente durante el tiempo de análisis. Diversas desventajas han obstaculizado su aplicación de forma general, como el primer potencial de ionización, o su diferente comportamiento en el transporte al plasma comparado con los elementos de transición biológicamente relevantes y especialmente, en el caso del análisis de elementos pesados, donde la masa de este elemento difiere mucho de la de los analitos. En este punto, Frick & Günther, 2012 realizaron una rigurosa evaluación de los aspectos físico-químicos fundamentales de este procedimiento, concluyendo que el isótopo ^{13}C no es adecuado para la estandarización interna de la señal excepto en tejidos relativamente homogéneos. Actualmente, se está dejando de utilizar este isótopo como PI. Otro procedimiento empleado para la normalización de la señal en LA-ICP-MS consiste en la aplicación de láminas metálicas en la superficie, o por debajo de la muestra. Austin *et al.* 2010 propusieron la aplicación de finas láminas poliméricas de polimetilmetacrilato dopadas con metales encima de la muestra. Siguiendo esta línea, se desarrolló una metodología basada en la deposición electroquímica de una capa de Au metálico sobre la superficie del tejido (Konz *et al.*, 2013; Bonta *et al.*, 2014; Bonta *et al.*, 2016). Por otro lado, Hoesl *et al.* 2014 han desarrollado una metodología original basada en la deposición de membranas de nitrocelulosa mediante la impresión de tintas comerciales enriquecidas con In o lantánidos (seleccionados como PI) con una impresora convencional, con el fin de cuantificar mediante LA-ICP-MS las proteínas transferidas a las membranas tras ensayos de Western-Blot. Los resultados mostraron que el patrón interno seleccionado es homogéneo (5% RSD) y reproducible obteniendo valores de RSD en torno a un 2%.

Una vez resuelto el problema de la estabilidad de la señal, se requiere una cuantificación lo más exacta posible para evaluar si la variación de un elemento dentro de una muestra es significativa o simplemente es debido a la heterogeneidad típica de los sistemas biológicos. Por ello, actualmente existe un gran debate de si sería apropiada la existencia de un método universal para la cuantificación por LA-ICP-MS en tejidos biológicos, e incluso si dicho método puede llegar a conseguirse. Por tanto, el estudio e investigación de metodologías que permitan realizar una correcta calibración y cuantificación es de gran interés. Existen diferentes estrategias para la calibración y cuantificación de muestras mediante LA-ICP-MS. Puesto que el fenómeno del fraccionamiento elemental es altamente dependiente de la matriz de la muestra, uno de los procedimientos más utilizados es el empleo de materiales de referencia matriciales o, como se

denominan más comúnmente, “matrix matched standards” (MMS). El empleo de estos patrones con una matriz igual, o lo más parecida posible a la muestra de interés permite corregir tanto los efectos de fraccionamiento como el efecto matriz producido en el ICP-MS. En este punto, existen distintos procedimientos alternativos para realizar la calibración y cuantificación mediante LA-ICP-MS: el empleo de materiales de referencia certificados (CRMs), el uso de tintas enriquecidas con los elementos de interés, o la fabricación en el laboratorio de MMS personalizados según las necesidades. Comercialmente, existen numerosos CRMs para diversos tipos de matrices sólidas como cristal, cerámica, cemento, metales, etc (Pozebon *et al.*, 2017). Sin embargo, estos CRMs no cubren todo el rango de muestras analizadas habitualmente y existe una gran escasez de este tipo de materiales para tejidos biológicos (Labine *et al.*, 2021). Otras alternativas como los estándares basados en gel (Ghölöp *et al.*, 2012; Sela *et al.*, 2011; Stärk *et al.*, 2010), o la inclusión de tejidos en resinas epoxídicas (Reifschneider *et al.*, 2013) se han propuesto como alternativa al uso de “matrix matched standards”. No obstante, este tipo de metodologías requieren una elevada carga de trabajo y la cuantificación no muestra ser muy fiable. Otros autores también han optado por el uso de membranas de celulosa mediante la impresión de tintas comerciales enriquecidas (Moraleja *et al.*, 2016). Este método mostró muy buenos resultados para la cuantificación de un solo elemento a niveles traza, sin embargo, no es aplicable a un análisis multielemental, ya que la tinta de impresora no es compatible con todo tipo de elementos. Autores como Bonta *et al.* 2016 o Villaseñor *et al.* 2017 optimizaron un método de cuantificación basado en la deposición de gotas sobre una superficie sólida, el cual resultó ser un buen método de cuantificación multielemental pero no para tejidos complejos. En los últimos años, la gelatina ha irrumpido como una matriz adecuada para crear estándares de calibración para la obtención de imágenes de tejidos biológicos debido a su fácil manejo, menor carga de trabajo y posibilidad de un análisis multielemental. Se han llevado a cabo varios estudios utilizando estándares de gelatina para una posterior calibración externa por LA-ICP-MS (Izmer *et al.*, 2012; Gholap *et al.*, 2012; Birka *et al.*, 2015; Stijn *et al.*, 2016; Sâla *et al.*, 2017; Niehaus *et al.*, 2015). Otros autores también han empleado geles de agarosa para la evaluación de concentraciones elementales en muestras biológicas (Saatz *et al.*, 2016; Böhme *et al.*, 2015; Stark & Wennrich, 2010; Ackerman *et al.*, 2018).

En la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado una estrategia de calibración para evaluar la acumulación de metales en larvas de pez cebra. Para llevar a cabo este estudio, se ha utilizado una gelatina de pescado como matriz similar a las larvas, la cual ha sido enriquecida con Au (III) como PI para su normalización y posterior semi-cuantificación.

II. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral se ha centrado fundamentalmente en el potencial tóxico de las nanopartículas de plata (AgNPs) ya que están siendo de las más utilizadas en diversos sectores, principalmente debido a su demostrada capacidad bactericida. Diversos estudios revelan que las AgNPs de menor tamaño muestran una mayor actividad antibacteriana y como consecuencia, una mayor citotoxicidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la toxicidad de las AgNPs en función del tamaño de partícula en sistemas *in vitro* y comparar dichos efectos y mecanismos de toxicidad en sistemas *in vivo*. Para ello, se propuso la combinación de estrategias analíticas y -ómicas que permitieran abordar el estudio desde un punto de vista multidisciplinar, con técnicas y estrategias alternativas y complementarias. A continuación, se detallan los objetivos específicos establecidos:

Objetivo II.1: Desarrollo y optimización de metodologías analíticas para la caracterización de las AgNPs por microscopía de transmisión electrónica y AF₄.

Objetivo II.2: Evaluación de la alteración proteica inducida por el efecto de las AgNPs en función del tamaño de partícula (10 y 60 nm) en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) mediante la técnica proteómica SILAC.

Objetivo II.3: Evaluación de los mecanismos de toxicidad relacionados con proteínas de núcleo en células HepG2 tras la exposición a AgNPs de 10 nm mediante la técnica proteómica SILAC.

Objetivo II.4: Evaluación de la alteración proteica por el efecto de las AgNPs de dos tamaños (10 y 60 nm) en larvas de pez cebra mediante la estrategia super-SILAC.

Objetivo II.5: Desarrollo de un método analítico para la distribución y cuantificación de metales pesados (Ag, Cd y Hg) en larvas de pez cebra a través de imágenes construidas mediante LA-ICP-MS.

Objetivo II.6: Aplicación del método LA-ICP-MS desarrollado en el punto anterior para evaluar la acumulación de las AgNPs en función del tamaño en larvas de pez cebra. Correspondencia de estos resultados con los obtenidos en la evaluación del proteoma de dichas larvas mediante la técnica super-SILAC.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta Sección se describen los Materiales y Métodos empleados en los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. Los fundamentos teóricos de las técnicas y métodos analíticos descritos en este capítulo se incluyen en la Introducción y en más profundidad en el Anexo A.

III.1. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Las disoluciones patrón de AgNPs empleadas fueron comerciales (NanoComposix, San Diego, CA, EEUU) de dos tamaños diferentes: 10 y 60 nm (nanoesferas), a una concentración de 20 mg.L⁻¹ y estabilizadas con una disolución de citrato de sodio 2 mM. Debido a su inestabilidad fue necesario almacenarlas a 4 °C y en ausencia de luz; por ello, se almacenaron en viales de vidrio ámbar. Dado que la presencia de O₂ también debe ser mínima para evitar su oxidación, se alicuotaron en diferentes viales, haciendo pasar una corriente de N₂ antes de su sellado.

Las disoluciones de trabajo preparadas a partir de la disolución comercial se sonicaron antes de su utilización diaria para evitar la agregación y asegurar así su homogeneidad. La sonicación se realizó empleando un baño de ultrasonidos (JPSelecta, Barcelona, Spain).

Para la caracterización de las AgNPs se utilizaron dos técnicas: la microscopía de transmisión electrónica (TEM) acoplada a la técnica de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) que determina la composición elemental de la muestra de interés, y el fraccionamiento de campo de flujo (AF₄).

- Microscopía de transmisión electrónica

Esta caracterización se llevó a cabo empleando un microscopio JEOL JEM 2100 operando a 120 y 200 kV. Se preparó una disolución de AgNPs de 1 mg.L⁻¹ a partir de la disolución comercial, sonicada previamente durante 5 min para conseguir así una disolución homogénea y evitar su agregación. Finalmente, se depositó una gota de la disolución en una rejilla de cobre recubierta de carbono y se procedió a su análisis.

- Fraccionamiento de campo de flujo

La caracterización de las AgNPs también se llevó a cabo con un sistema AF2000 (Postnova Analytics, Landsberg an Lech, Alemania) equipado con una membrana regenerable de celulosa de masa molar de corte 10 kDa. Las dimensiones del canal fueron 355 x 60 mm y se empleó un espaciador de 350 µm de espesor. Las fases móviles utilizadas fueron: i) Disolución del 0,01% de dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma Aldrich, St Louis, USA) a pH=8; ii) Agua Milli-Q a pH = 6-9. El ajuste del pH se llevó a cabo empleando una disolución de 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH (99 %,

Panreac, España) y otra de HNO_3 al 2% (60% w/w, reagent grade, ISO, Scharlab, España). Para limpiar la membrana se utilizó una mezcla 1:4 de metanol: agua (grado HPLC, Scharlab, España). Tanto las fases móviles como la disolución de limpieza se filtraron a vacío con filtros de $0,1\ \mu\text{m}$ de Omniport (Milipore, Irlanda) y se sonicaron en el baño de ultrasonidos durante 15 min para eliminar posibles burbujas de aire. El programa utilizado para la separación de las nanopartículas por tamaños se recoge en la **Tabla III.1**. El caudal que llega al detector se mantuvo constante a $0,3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante los 35 min de duración del análisis. La etapa de focalización duró 5 min y los caudales de los flujos de focalización, cruzado e inyección fueron $0,6$, $0,5$ y $0,2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Posteriormente, el caudal del flujo de focalización se hizo decaer hasta cero. En la etapa de elución el valor de caudal de flujo cruzado se disminuyó de forma lineal hasta hacerse cero en 25 min. Según la ecuación A.1. (ver Anexo A), esta disminución del caudal de flujo cruzado implica un descenso en el caudal de inyección desde $0,6\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta $0,3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tabla III.1: Condiciones AF4 para la caracterización de las AgNPs.

		Caudal (mL.min ⁻¹)	Tiempo (min)
Constante	Detector	0,3	35
Etapa de focalización	Focalización	0,6	5
	Cruzado	0,5	
	Inyección	0,2	
	Decaimiento lineal del caudal del flujo cruzado		
Etapa de elución	Focalización	0	25
	Cruzado	0,5-0	
	Inyección	0,6-0,3	
	Caudales constantes		
	Focalización	0	5
	Cruzado	0	
	Inyección	0,3	

III.2. CULTIVO CELULAR

Se emplearon las siguientes líneas celulares: Células de hepatocarcinoma humano (HepG2), células embrionarias de riñón humano (Hek293), células de osteosarcoma humano (Hos), células humanas de cáncer de cérvix (HeLa), células de fibroblasto de embrión de pez cebra (ZF4) y células de fibroblasto de cola de pez cebra (AB.9). Todas ellas son células de tipo adherente y se cultivaron en un incubador New Brunswick Galaxy 48S que permitió mantener las condiciones óptimas para la proliferación de las diferentes líneas celulares: 37°C y 5% de CO_2 , salvo en el caso de las líneas ZF4 y AB.9 que se cultivaron a 28°C .

En todos los casos, los cultivos celulares se mantuvieron en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma Aldrich).

III.3. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el potencial citotóxico de las AgNPs, y si este variaba en función del tamaño de las mismas, se realizaron varios ensayos de viabilidad celular empleando la línea HepG2 y el método fotométrico conocido como ensayo de MTT, basado en la reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) para la formación de un compuesto coloreado denominado formazán. Las células HepG2 se expusieron a diferentes concentraciones de Ag⁺, AgNPs de 10nm, AgNPs de 60nm (0,1, 0,5, 1,5 y 10 mg.L⁻¹) durante 72 h. Transcurrido el tiempo de exposición, se añadieron 20 µL de MTT (Invitrogen, 5 mg.mL⁻¹) a cada pocillo y se incubó durante 5 h a 37 °C. Posteriormente, se eliminó la disolución de MTT y se añadieron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) para disolver los cristales de formazán generados. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia del formazán solubilizado en DMSO a una longitud de onda de 595nm en un fotómetro de placas multipocillo (Tecan Sunrise, Suiza). Finalmente, para calcular la viabilidad celular se relacionó la absorbancia de las células expuestas, con la absorbancia de las células control para las que se considera una viabilidad celular del 100%.

Posteriormente, se evaluaron los cambios en la viabilidad celular de células expuestas a 5 mg.L⁻¹ de AgNPs de 10nm y 60nm durante 72 h empleando las líneas celulares humanas citadas anteriormente (HepG2, HeLa, Hos y Hek293).

III.4. ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR

La evaluación de la internalización celular de las AgNPs se llevó a cabo de forma cualitativa mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y cuantitativamente mediante espectrometría de masas acoplada inductivamente a un plasma (ICP-MS).

III.4.a Internalización de las AgNPs por TEM

Para obtener las micrografías de TEM, se emplearon células cultivadas en diferentes placas Petri P100 (100 mm): se cultivaron células control, células HepG2 expuestas a dos concentraciones de AgNPs de 10nm (1 y 5 mg.L⁻¹) y células expuestas a dos concentraciones de AgNPs de 60nm (1 y 5 mg.L⁻¹) durante 72 h. Transcurrido el tiempo de exposición, las células se levantaron mediante la adición de tripsina-EDTA y la suspensión resultante se traspasó a un tubo Falcon de 15 mL. El pellet celular se lavó con 10 mL de PBS (Lonza), se centrifugó durante 5 min a 1500

rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las células se fijaron mediante la adición de un 1 mL de la disolución de fijado (2,5% de glutaraldehído y 4% de p-formaldehído, Sigma Aldrich). Esta disolución favorece que las células mantengan su forma extra e intracelular, permitiendo, por tanto, la realización de estudios microscópicos a posteriori. Las células se incubaron en dicha disolución durante 4 h a 4 °C. Una vez transcurridas 4 h, se centrifugaron y se realizaron 3 ciclos de lavado con PBS. Finalmente, las células fijadas se incubaron con 1 mL de PBS a 4 °C durante toda la noche.

A continuación, el pellet celular se suspendió con 1 mL de óxido de osmio al 1% y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Esta etapa forma parte de la post-fijación, a partir de la cual el pellet celular adquiere un aspecto negruzco. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua Milli-Q para eliminar los restos de la disolución de osmio. El siguiente paso fue deshidratar las células, para lo cual se realizaron varios ciclos de adición, incubación, centrifugación y desecho con disoluciones de proporciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 95%) hasta acabar en dos ciclos de 100% de acetona (Sigma Aldrich).

La deshidratación es un paso esencial, ya que para la posterior formación de la resina, es imprescindible eliminar completamente el agua. Una vez las células fueron fijadas y deshidratadas, se dispersaron en el interior de la resina antes de la polimerización de la misma, con objeto de dejarlas inmóviles en su interior. Para ello, se añadieron a los pellets celulares proporciones crecientes de resina (25%, 50% y 75%) preparada en acetona, hasta acabar con dos ciclos de 100% de resina. El último ciclo no se desechó, sino que se dejó incubando durante 48 h en una estufa a 70 °C para favorecer así la reacción de polimerización. Una vez las células se encontraron inmóviles y fijadas en el interior de la resina, se utilizó un microtomo para obtener los cortes necesarios para el análisis de la muestra mediante TEM empleando un microscopio JEOL JEM 1010.

III.4.b Internalización de las AgNPs por ICP-MS

Con objeto de evaluar la cantidad de AgNPs internalizadas en las células, se cultivaron 6 placas Petri P60, dos de ellas se emplearon como control y las 4 restantes se incubaron con AgNPs de 10 nm o 60 nm a una concentración de 5 mg.L⁻¹ durante 72 h de exposición; se midió también a t=0h para evaluar una hipotética concentración endógena de Ag en las células. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron 3mL del medio celular en un tubo Falcon de 15 mL. A continuación las células se lavaron con 3 mL de PBS y el medio de lavado también se recogió. Seguidamente, las células se levantaron mediante la adición de tripsina-EDTA y la suspensión resultante se traspasó, al igual que en los casos anteriores, a un tubo Falcon. Las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante, recuperando sólo el

pellet. Finalmente, se realizó una digestión ácida con ácido nítrico al 5% tanto del medio y de la disolución de lavado como del pellet, para proceder a su medición mediante ICP-MS (**Figura III.1**).

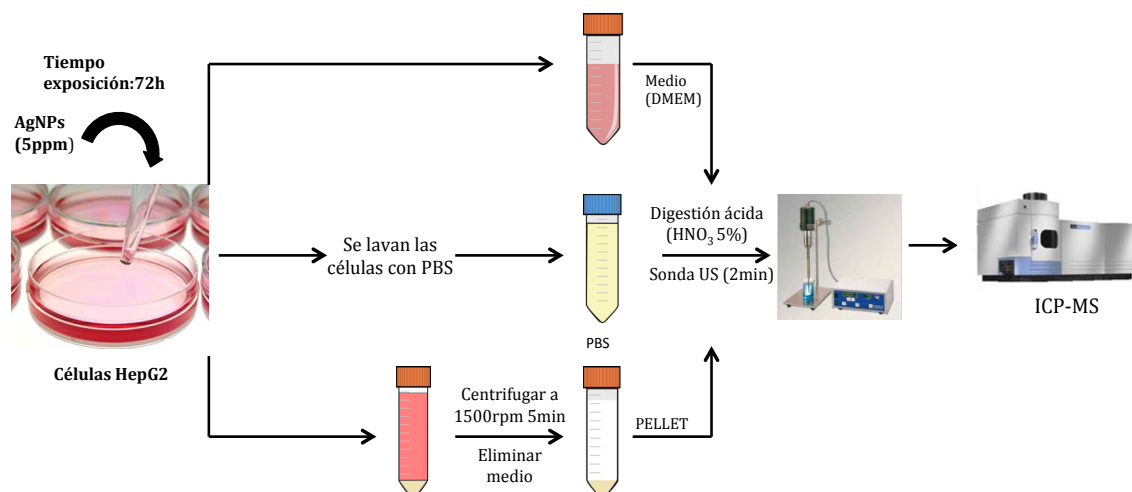


Figura III.1: Procedimiento experimental empleado para la determinación de AgNPs internalizadas en células HepG2 por ICP-MS.

La determinación de los distintos medios por ICP-MS se llevó a cabo como sigue: en el caso del medio celular y disolución de lavado se tomó una alícuota de 1 mL a la que se añadió 100 μ L de ácido nítrico al 5%, las muestras se sonicaron utilizando una sonda de ultrasonidos focalizada de baja potencia con punta de titanio (Vibra Cell VCx 130, Connecticut, USA) durante 2 min. De dicha disolución se tomó una alícuota de 100 μ L que se llevó a 1 mL empleando su respectivo medio (celular o de lavado). En el caso del pellet se adicionó un 1mL del ácido nítrico al 5% y se sonicó igualmente con una sonda de ultrasonidos focalizada de baja potencia (Vibra Cell VCx 130, Connecticut, USA) durante 2 min. Posteriormente se tomó una alícuota de 100 μ L y se llevó a un volumen final de 1 mL con agua.

III.5. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS)

Los análisis mediante ICP-MS se emplearon tanto para medir la cantidad de AgNPs intracelular como la estabilidad de las AgNPs en el medio de cultivo celular. El contenido total de plata se determinó mediante un ICP-MS (7500, Agilent Technologies) equipado con un nebulizador cónico, una antorcha Fassel y una cámara de expansión de cuarzo enfriado por un sistema de refrigeración Peltier. En todos los análisis con ICP-MS se emplearon las condiciones

mostradas en la **Tabla III.2**.

Tabla III.2: Condiciones empleadas en las determinaciones por ICP-MS.

Parámetros ICP-MS	Valores
Potencia de la radiofrecuencia (W)	1550
Flujo del gas plasma (L.min ⁻¹)	15
Flujo del gas transportador (Ar)(L.min ⁻¹)	1,05
Modo de adquisición	Continuo
Isótopos monotorizados	¹⁰⁷ Ag
Número de medidas por muestra	3

Para calcular la concentración de AgNPs en el medio celular, la disolución de lavado y el pellet, se realizó una curva de calibrado con patrones de 10-500 µg.L⁻¹ de Ag⁺ (a partir de un patrón de 1000 mg.L⁻¹, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Para calcular la concentración de las AgNPs en los filtrados se realizaron calibrados con patrones de 10-500 µg.L⁻¹ de ambos tipos de AgNPs (10 y 60 nm) (NanoComposix, San Diego, CA, EEUU).

III.6. PROTEÓMICA CUANTITATIVA

III.6.a. Estrategia SILAC

Como ya se ha comentado en la introducción, se ha utilizado la estrategia SILAC para identificar y cuantificar proteínas alteradas tras la exposición de células HepG2 (modelo *in vitro*) a AgNPs de 10 y 60 nm con el objetivo de profundizar sobre los mecanismos biomoleculares implicados en la toxicidad de dichas AgNPs y en las posibles diferencias atribuibles al diferente tamaño de NPs. A continuación se detallan cada uno de los pasos del procedimiento desarrollado.

III.6.a.1 Marcaje metabólico con aminoácidos isotópicos estables

La incorporación de los mencionados aminoácidos “pesados” se realiza de manera metabólica, por lo que en primer lugar hay que realizar un estudio de la cinética de marcaje para establecer el número de doblajes celulares que son necesarios para conseguir una eficiencia de marcaje del 100%. Para ello, se sembraron 10⁶ células en dos placas Petri P100 (Poblaciones A y B). La población A se cultivó en medio con aminoácidos ligeros (¹²C₆-Lys y ¹²C₆-Arg) y la población B en medio con aminoácidos pesados (¹³C₆-Lys y ¹³C₆-Arg). Diariamente se recogieron extractos celulares de ambos cultivos y se midieron mediante espectrometría de masas. Una vez se

confirmó la incorporación completa de los aminoácidos pesados tras 7 doblajes de la población inicial, se llevó a cabo el experimento SILAC. Células HepG2 marcadas con los aminoácidos pesados se expusieron a 5 mg.L⁻¹ de AgNPs de 10 ó 60 nm durante 72 h. Paralelamente, se mantuvieron dos placas de células control crecidas en medio ligero. Finalizado el tiempo de exposición, las células de cada una de las placas expuestas a AgNPs se mezclaron con las células de las placas control en una proporción 1:1. El conteo de células se llevó a cabo mediante una cámara de Neubauer.

III.6.a.2 Lisis celular

La mezcla de ambas poblaciones celulares se lisó con un buffer de lisis de composición: Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 8, etilen diamina 0,2 mM ácido (EDTA), Na₃VO₄ 2 mM, NaF 2 mM e inhibidores de proteasas. Para ello, se añadieron a la muestra 200 µL de buffer de lisis y se sonicó durante 10 min con una sonda de ultrasonidos focalizada con punta de titanio (Vibra Cell VCx 130, Connecticut, USA). Posteriormente, se incubó durante 15 min con agitación a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 10 min a 13.000 rpm para separar los restos del debris celular del sobrenadante. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80 °C.

III.6.a.3 Separación electroforética, digestión en gel y extracción de péptidos

Las proteínas extraídas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) como agente desnaturizante. Esta técnica, permite llevar a cabo una separación de macromoléculas cargadas gracias a su movilidad en el gel en presencia de un campo eléctrico externo. La electroforesis se realizó en primer lugar a 12 mA (80 V) durante 20 min aproximadamente; transcurrido dicho tiempo, se subió el voltaje hasta 20 mA (120 V) y se mantuvo hasta que finalmente el frente de disolvente alcanzó el final del gel. Posteriormente, se procedió a la fijación de las proteínas en el gel para evitar su pérdida por difusión, para lo cual el gel se incubó con una disolución al 7,5% de ácido acético y 30% de etanol durante 30 min con agitación suave. Transcurrido este tiempo, se tiñó el gel con azul de Coomassie (CBB) (Thermo Scientific) durante 40 min con agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados con etanol al 30%, hasta visualización correcta de las proteínas separadas en el gel. El carril se cortó en 25 bandas con ayuda de un bisturí y las bandas obtenidas se destiñeron mediante lavados sucesivos con una mezcla 50:50 NH₄HCO₃ 25 mM:acetonitrilo (ACN, Fischer Scientific). Una vez desteñidas, las bandas se cortaron en pequeños fragmentos de unos 2 mm² y se deshidrataron con acetonitrilo para su posterior secado por centrifugación a vacío. La digestión de proteínas se llevó a cabo incubando los

fragmentos de gel secos de cada una de las bandas con una disolución de tripsina 12.5 mg.L⁻¹ preparada en NH₄HCO₃ 25 mM. La incubación se mantuvo a 37 °C con agitación suave durante 16 h. Tras la digestión, los péptidos se extrayeron empleando acetonitrilo al 100% y ácido fórmico (Sigma Aldrich) al 5% de forma secuencial. La mezcla de extractos se secó mediante centrifugación a vacío.

III.6.a.4 Análisis por nanocromatografía de líquidos y espectrometría de masas

Los péptidos extraídos de cada banda del gel se reconstituyeron en 12 µL de agua de calidad masas con un 2% de acetonitrilo y un 0.1% de ácido fórmico. Para favorecer la redisolución, las muestras se sonicaron durante 10 min en un baño de ultrasonidos y, posteriormente, se trasvasaron a viales adaptados al auto-muestreador del nanocromatógrafo de líquidos. La mezcla de péptidos de las diferentes fracciones se analizaron mediante nano LC-MS/MS.

Para ello, los péptidos se cargaron en una precolumna C18 (0,3 x 10 mm, SGE) y posteriormente se separaron en una columna analítica de fase inversa (75 µm x 25 cm - capilar de sílice fundida C₁₈ HPLC PepMap column, 3 µm, 100 Å, Thermo) con un gradiente lineal de 5-95% acetonitrilo en una disolución acuosa al 0.1% de ácido fórmico. La separación cromatográfica de los péptidos se realizó a un caudal de 200 nl.min⁻¹ con un gradiente cromatográfico que comenzó al 95% de fase A (95% H₂O, 5% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico) hasta alcanzar un 80% de fase B (100 % acetonitrilo 0,1% ácido fórmico) durante un tiempo total de 2 h. El gradiente se mantuvo a lo largo de 120 min mediante un sistema nanoLC ultra 1D plus (Eksigent) a una velocidad de flujo de 200 nl.min⁻¹ conectado a un sistema de ionización por nano-electrospray equipado con un nano-emitter de acero inoxidable (Proxeon).

Los péptidos fueron escaneados y fragmentados en un espectrómetro de masas equipado con una trampa lineal de iones LTQ XL (Thermo Scientific) operando en modo ZoomScan y MS/MS, en el que se seleccionaron los tres iones precursores más intensos detectados en cada espectro de 400-1600 uma. La energía de colisión normalizada se fijó en un 35% y se aplicó un tiempo de exclusión dinámica de 3 min para evitar la fragmentación repetitiva de iones. La ventana de masa de ZooMScan se estableció en 12 Dalton, permitiendo la monitorización de la envoltura isotópica de la mayoría de péptidos con carga ⁺² y ⁺³.

III.6.a.5 Análisis de datos y estudios estadísticos

Una vez se obtuvieron los cromatogramas y los archivos brutos .raw se llevó a cabo la modificación del formato a .mgf para poder realizar la identificación y cuantificación relativa

con el motor de búsqueda MASCOT (versión 2.3, MatrixScience) empleando la base de datos “Homo Sapiens” del NCBI y el programa QUIXOT (versión 1.3.26), respectivamente. Como criterios de búsqueda específicos se emplearon la oxidación de metionina y los marcajes $^{13}\text{C}_6$ -Arg y $^{13}\text{C}_6$ -Lys como modificaciones variables, la tripsina como enzima específica y un máximo de “missed cleavage” por péptido de 1.

Para considerar la identificación de una proteína como válida, se requirió que cada proteína fuese identificada con al menos un péptido único. Para la cuantificación, se requirieron al menos dos péptidos únicos por proteína. Los valores mínimos de score MASCOT que se consideraron válidos en la búsqueda para péptidos y proteínas, se establecieron en 40 ($p < 0,05$) y 47 ($p < 0,01$), respectivamente. La cuantificación relativa de las proteínas identificadas realizada con QUIXOT se realizó integrando las áreas de cada pico. En todos los casos los péptidos se verificaron manualmente. Finalmente, se calculó el cociente SILAC (R_{SILAC}) para cada proteína, relacionándose las áreas de los péptidos pesados con las áreas de los péptidos ligeros para cada proteína (Ecuaciones I.1 y I.4 del apartado de Introducción). La localización subcelular de cada proteína, así como los procesos biológicos y moleculares en los que participa cada proteína, se asignó en base a la información biológica obtenida de la base de datos Gene Ontology (GO).

III.6.a.6 Experimento SILAC con fraccionamiento de proteínas asociadas a ADN de células expuestas a AgNPs de 10 nm

Para llevar a cabo este experimento, se utilizaron los procedimientos de marcaje metabólico, lisis, separación digestión y cuantificación ya explicados en los puntos III.6.a.1-III.6.a.5. con alguna modificación que explico a continuación: el lisado celular resultante se suspendió en 500 μL de *buffer de lisis* y se incubó en hielo durante 15 min. La disolución resultante se transfirió a un tubo *ependorf* de 1.5 mL y se añadieron 25 μL de *Detergent Solution NP* seguido de 10 s de vortex. Se centrifugó durante 5 min a 10.000g y 4 °C. El sobrenadante que contiene la fracción citosólica se recuperó y se almacenó a -80 °C. El pellet conteniendo los núcleos celulares se suspendió en 500 μL de *buffer de lisis NL* que contiene Benzonasa Nucleasa y DNasa/RNasa (suplementado con inhibidor de proteasa y 0.1M de DTT) y se agitó mediante vortex durante 5 s. La suspensión de núcleos se centrifugó 5 min a 10.000g y 4 °C; el sobrenadante se desechó y el pellet se suspendió en 50 μL de *buffer de extracción Nx1* (suplementado con inhibidor de proteasa). A continuación, se incubó en un agitador (Thermomixer) a 750 rpm durante 30 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo necesario, la suspensión de núcleos se centrifugó durante 10 min a 12.000g y 4 °C. El sobrenadante conteniendo las proteínas asociadas a ADN se transfirió a un nuevo tubo *ependorf* que se almacenó a -80 °C.

III.6b. Estrategia super-SILAC

Esta metodología se empleó en esta tesis, como ya se ha comentado, para identificar las proteínas alteradas como consecuencia de la exposición de larvas de pez cebra a las AgNPs, con el fin de identificar y profundizar en los mecanismos biomoleculares implicados en la posible toxicidad inducida por dichas AgNPs en organismos *in vivo* y poder, de esta forma, compararlos con los identificados anteriormente en células HepG2 mediante la estrategia SILAC. La **Figura III.2** esquematiza el procedimiento experimental de la estrategia super-SILAC empleada.

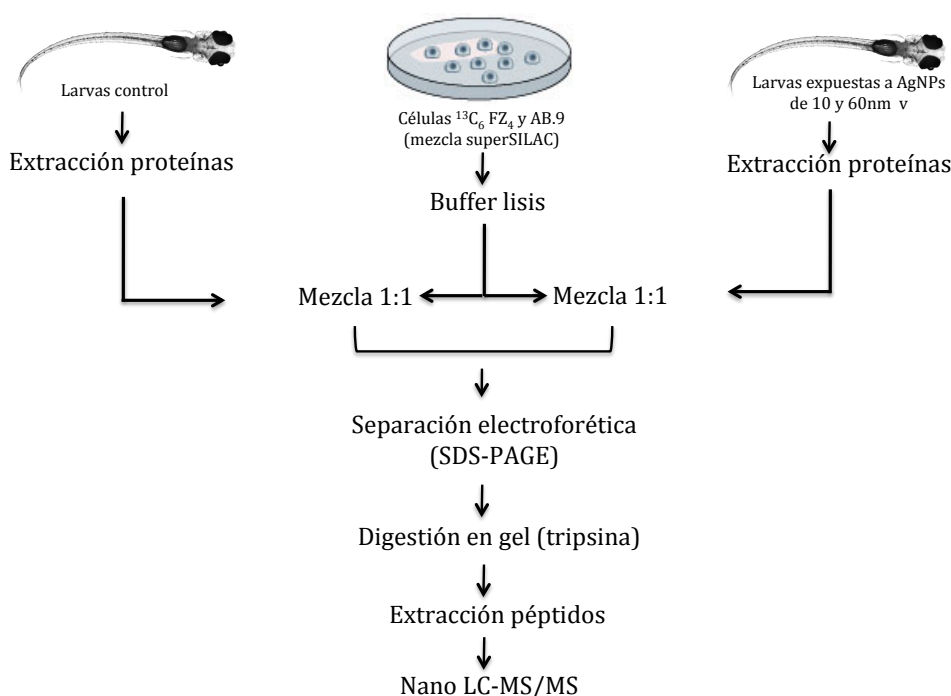


Figura III.2: Esquema de la estrategia super-SILAC empleada para evaluar el efecto de AgNPs en larvas de pez cebra.

A continuación, como en el caso de la estrategia SILAC, se procede a describir las etapas del proceso.

III.6.b.1 Exposición de las larvas de pez cebra a AgNPs (10 nm y 60 nm)

Se preparó una disolución de medio de composición similar a la del agua dulce de río (agua ISO) donde vive el pez cebra: 294 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 123,3 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 63 mg de NaHCO_3 y 5,5 mg de KCl se diluyeron en 1 L de agua destilada. La suspensión de AgNPs con agua ISO se preparó a una concentración de $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en base a la información sobre el LC_{50} para estas

AgNPs. Las larvas de pez cebra de 72h post fertilización (hpf) se expusieron a las AgNPs durante 72 h distribuidas homogéneamente mediante agitación constante. De todas las larvas crecidas en disolución, se recogieron varias muestras de 20 grupos de larvas.

III.6.b.2 Marcaje metabólico con aminoácidos isotópicos: mezcla super-SILAC

Para generar la mezcla super-SILAC se emplearon las líneas celulares ZF4 y AB.9, con objeto de representar el contenido proteico de las larvas pez cebra. El procedimiento para llevar a cabo el marcaje metabólico, al igual que lo explicado en la sección III.6.a.1, consistió en cultivar las células ZF4 y AB.9 en medio pesado ($^{13}\text{C}_6$ -Arg and $^{13}\text{C}_6$ -Lys) durante al menos 6 doblajes de la población para asegurar un marcaje del 100%. A continuación, se realizó un lisado celular de la mezcla de las dos líneas celulares con el buffer de lisis total y se sonicó con una sonda de ultrasonidos con 20 pulsos de 2s y un tiempo de espera de 5 s entre cada pulso. La mezcla se incubó a 4 °C con agitación rotativa y, posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C y se recogió el sobrenadante. El contenido proteico se cuantificó mediante el método Bradford (Bradford, 1976).

III.6.b.3 Extracción de proteínas

Tras la exposición a las AgNPs, dos muestras de 20 larvas cada una, se juntaron y se suspendieron en 100 µl de buffer de lisis total conteniendo Triton X-100 al 1%, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH = 8, ácido etilen diamino tetraacético 0,2 mM (EDTA), Na_3VO_4 2 mM, NaF 2 mM e inhibidores de proteasas. Las muestras se homogeneizaron y se les volvió a añadir 100 µl del buffer de lisis total. Seguidamente, la mezcla se sonicó con la sonda de ultrasonidos durante 2 min, se incubó a 4 °C durante 15 min y, finalmente, se centrifugó a 4 °C y 16.000g durante 10 min. Esta etapa se repitió dos veces y se recogieron los sobrenadantes donde se encontraba la fracción proteica. A continuación, se realizó la etapa de purificación, en la que se añadieron 6 volúmenes de acetona a 4 °C provocando así la precipitación de las proteínas. El pellet proteico obtenido se disolvió en 40 µL de agua de masas (Fisher Scientific) y se calculó su concentración mediante el ensayo Bradford.

III.6.b.4 Identificación y cuantificación de proteínas

Para la identificación y cuantificación de las proteínas expresadas diferencialmente en las larvas de pez cebra expuestas a AgNPs frente a las larvas control, se llevaron a cabo dos experimentos de forma paralela para las AgNPs de 10 nm y 60 nm, en donde las larvas tratadas con cada una de las AgNPs o las larvas control se mezclaron en proporción 1:1 en contenido de proteína total con la mezcla celular super-SILAC. Las muestras resultantes se mezclaron con

Laemmli buffer y se desnaturalizaron con un 4% (v/v) de 2-mercaptoetanol (β -ME, Sigma Aldrich) que actúa como agente reductor. Posteriormente, se procedió a la separación electroforética mediante SDS-PAGE, digestión de proteínas y análisis mediante nano LC-MS/MS de forma similar a lo comentado en las secciones III.6.a.3-III.6.a.5. Al igual que en el experimento SILAC, los archivos .raw generados se convirtieron a archivos .mgf para que fueran compatibles con el software MASCOT. Se realizó una búsqueda con una base de datos de *Danio rerio* de NCBI. Las áreas de pico de los péptidos identificados se obtuvieron utilizando el software Quixot v.1.3.26.

En cada uno de los experimentos se obtuvo un cociente SILAC (R_{SILAC}) para las distintas proteínas cuantificadas. Por un lado se obtuvo el R_{SILAC} (control) perteneciente a las larvas control mezcladas con la mezcla super-SILAC y, por otro lado, el R_{SILAC} de las larvas tratadas con AgNPs (10nm) y AgNPs (60nm) (Ver ecuaciones I.1-I.4 del apartado de Introducción).

III.7. EXPOSICIÓN DE LAS LARVAS DE PEZ CEBRA A LA MEZCLA DE METALES Y A AgNPS. ANÁLISIS POR LA-ICP-MS

Las larvas de pez cebra (72 hpf) fueron expuestas a una mezcla de mercurio (Hg), cadmio (Cd) y plata (Ag) teniendo en cuenta el test OECD 305 en los laboratorios de AZTI (EU-10-BI, Bilbao, España). El test OECD se utiliza como referencia para establecer las condiciones experimentales oportunas para el crecimiento de las larvas, así como para seleccionar la concentración de exposición al contaminante objeto de estudio. Estos parámetros fueron 26 ± 2 °C, oxígeno disuelto $\geq 60\%$, disolución ISOWATER ya descrita previamente, a pH = 6-8,5.

Los experimentos de exposición se realizaron en dos tanques. En el primero se pusieron las larvas control y en el segundo las expuestas a los contaminantes. El procedimiento aplicado consistió en una exposición durante 48 horas al medio contaminado, muestreando después 15 larvas para determinar la concentración captada por las larvas de los analitos estudiados. La concentración nominal se seleccionó para cada analito de acuerdo con el test OECD 305, entre el 0.1-1% con respecto al LC_{50} . Para la plata iónica los valores de LC_{50} se encuentran entre 15-35 $\mu\text{g.L}^{-1}$. En el caso del cadmio iónico, el valor fue 2 mg.L^{-1} y para el metilmercurio de 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Zarco-Fernández *et al.*, 2018). Según estos datos, la concentración nominal seleccionada para llevar a cabo los experimentos de exposición fue de 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para la Ag, Cd y Hg, respectivamente. En el caso de la exposición a AgNPs de 10 y 60 nm, la concentración nominal seleccionada fue de 1 mg.L^{-1} . El análisis se realizó mediante el acoplamiento de un ICP-MS (HP-4500, Agilent Technologies) y un láser de Nd:YAG (granate de ytrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio), el cual opera a una longitud de onda de 266 nm (LSX-500, CETAC)

con una frecuencia de repetición entre 1-20 Hz. Este sistema se empleó para trazar un mapeado de la distribución de los elementos estudiados en las larvas de pez cebra, así como para semi-cuantificar el contenido acumulado por las mismas. La muestra fue ablacionada y transportada hacia el ICP-MS utilizando una mezcla de He y Ar como gases portadores. Las condiciones óptimas utilizadas en este análisis se muestran en la **Tabla III.3**.

Tabla III.3: Condiciones experimentales del LA-ICP-MS.

ICP-MS (Agilent HP- 4500)	
Potencia de la radiofrecuencia (W)	1300
Flujo del gas transportador (Ar) (L.min ⁻¹)	1,05
Modo de obtención de datos	TRA
ABLACIÓN LASER (LSX 500 CETAC Technologies)	
Longitud de onda del laser (nm)	266
Modo Ablación	Líneas
Energía (%)	95-98
Flujo del gas portador He (L.min ⁻¹)	0.8
Frecuencia de repetición (Hz)	20
Velocidad del escaneo (m.s ⁻¹)	25
Tamaño de cráter (μm)	25
Distancia entre líneas (μm)	20
Isótopos	¹⁰⁷ Ag, ¹⁰⁹ Ag, ¹¹¹ Cd, ¹¹² Cd, ²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg, ¹⁹⁷ Au

III.7.a. Calibración del equipo LA-ICP-MS

Para comprobar el correcto funcionamiento del equipo, lo primero que se realizó fue el análisis de un material de referencia certificado (CRM), en concreto, el BCR 664. Se trata de una plancha de vidrio (de 50 x 50 x 7 mm), a la que se le practican diferentes cortes para obtener pequeños trozos que entren en la cámara de ablación y que tengan sus caras pulidas. El CRM se depositó en un portamuestras fijado con una cinta adhesiva de doble cara para evitar cualquier desplazamiento durante la ablación. En primer lugar, hay que llevar a cabo procesos de desbaste y pulido del material para lo cual se empleó una pulidora Allied High Tech (Multiprep Polishing System). A continuación, se llevaron a cabo las medidas, realizando en cada uno de los cortes 5 líneas de ablación en zonas alejadas entre sí para poder estudiar la homogeneidad de cada uno de ellos. La duración de cada línea de ablación fue de 37 s. Los parámetros del láser empleados para estos análisis fueron: frecuencia de ablación de 20 Hz, tamaño de cráter de

200 μm y velocidad de ablación de 200 $\mu\text{m.s}^{-1}$. También se evaluaron la existencia de posibles interferencias espectrales calculando la relación isotópica del Cd ($^{111}\text{Cd}/^{112}\text{Cd}$) y el Pb ($^{207}\text{Pb}/^{208}\text{Pb}$), elementos contenidos en dicho material, comparándolo con sus relaciones isotópicas naturales.

III.7.b. Preparación de los estándares en gelatina y fijación de las larvas para la ablación láser

Tanto para la fijación de la muestra como para los patrones de los calibrados se utilizó una gelatina de pescado como matriz de calibración. Dicha gelatina consistió en una mezcla de piel, tejido conectivo y espinas con un porcentaje de proteínas alrededor del 85%; el resto de la composición era agua (13-14%) y sales (1-2%). Para obtener dicha matriz, se tomó gelatina granulada (Bloom 200, Francia) y se adicionó agua Milli-Q hasta preparar una concentración al 10% m/v, calentando a 60°C para disolver completamente la gelatina. Los patrones de los calibrados se añadiendo diferentes concentraciones (0,05-2 mg.L^{-1}) de la mezcla de metales (Cd, Hg y Ag) y se enrasaron con la gelatina disuelta (en caliente). También se adicionó el volumen correspondiente de una disolución de Au (III) de 10 mg.L^{-1} (preparada a partir del patrón comercial Fluka, 1000 mg.L^{-1}) para obtener una concentración final de 1 mg.L^{-1} . Seguidamente se procedió a la homogeneización en caliente de los estándares mediante agitación rotatoria durante 5 min. Una vez la disolución es homogénea, se depositan 50 μL en unos pocillos fijados en una cinta adhesiva de doble cara sobre un portaobjetos de vidrio, tal y como se muestra en la **Figura III.3**. La gelatina se cubre para evitar posibles contaminaciones y se deja enfriar durante 24 horas.

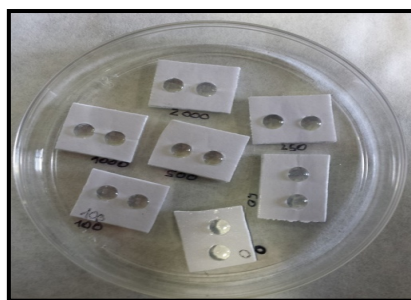


Figura III.3: Gelatina depositada en pocillos fijados con una cinta adhesiva de doble cara.

Los estándares de AgNPs se prepararon a partir de una disolución comercial de concentración 20 mg.L^{-1} (NanoComposix, San Diego, CA, EEUU). En primer lugar, esta disolución se sonicó

durante 2 min en un baño de ultrasonidos para evitar la agregación de las AgNPs. A continuación, se llevan a cabo los mismos pasos que hemos relatado antes para la mezcla de metales. En este caso las concentraciones utilizadas cubrieron el rango de 0,05-1 mg.L⁻¹. Al igual que en el caso de los metales, también se añadió Au (III) en concentración 1 mg.L⁻¹ como patrón interno y se preparó un blanco de gelatina. Las larvas se fijan empleando el mismo sistema, simplemente depositándola en uno de los pocillos y cubriéndola con la misma cantidad de gelatina.

III.7.c. Cuantificación de metales y AgNPs en los estándares de gelatina por ICP-MS

Los estándares de gelatina de pescado se sometieron a una digestión ácida asistida por microondas (modelo 1000 W MSP, CEM) empleando digestores de politetrafluoroetileno (PTFE) previo a su análisis por ICP-MS (HP 7700 PLUS, Agilent Technologies, Tokio, Japón). Para ello, se pesaron exactamente 0,4 mL de cada estándar de gelatina en un vaso de digestión y se añadió 1 mL de una mezcla de HNO₃ (60% pureza, Scharlau) y H₂O₂ (30% pureza, Panreac) en proporción 3:1. La muestra se sometió a la potencia máxima (800 w) empleando una rampa de temperatura durante 45 min hasta alcanzar 150 °C manteniéndola durante 20 min. Una vez finalizada la digestión, los vasos se dejaron enfriar para posteriormente recoger la disolución digerida y diluirla hasta 2 mL con agua Milli-Q. Finalmente, las muestras diluidas se midieron directamente por ICP-MS. Como modo de introducción de muestra se utilizó un sistema de inyección en flujo (FIA) utilizando un bucle de 300 µL.

III.7.d. Determinación de AgNPs en larvas de pez cebra por ICP-MS

Para la cuantificación de la Ag contenida en las larvas, así como en medios de exposición, ambos se sometieron a una digestión ácida mediante una sonda ultrasonidos focalizada con punta de titanio (Vibra Cell VCx 130, Connecticut, USA) previo a su análisis por ICP-MS. El proceso de digestión consistió en agregar 500 µl de HNO₃ al 5% (p/v) a los medios de exposición (1 mL), así como a las muestras que contenían 10 larvas y sonicar con la sonda de ultrasonidos durante 60 s a una potencia del 40%. Las muestras digeridas se diluyeron hasta un volumen final de 2 mL con agua Milli-Q y se analizaron por ICP-MS empleando como modo de introducción de muestra un sistema de inyección en flujo (FIA) con un bucle de 300 µL.

III.7.e. Evaluación del efecto matriz de las larvas en su análisis por LA-ICP-MS

En primer lugar, se doparon larvas control con 30 µL de dos patrones de mezcla de metales de diferente concentración (50 y 500 µg.L⁻¹) enriquecidos con Au en disolución (1000 µg.L⁻¹), se dejaron secar y se procedió a su medida mediante LA-ICP-MS, para lo cual se ablacionaron 30

líneas a lo largo de todo el pocillo, y el pico obtenido para cada una de las líneas en cada elemento se integró. La señal obtenida por cada línea se dividió por la señal del patrón interno correspondiente a esa línea hasta obtener la relación de cada una de las mismas. Finalmente, se sumaron todas las líneas obteniendo un valor único para cada elemento en cada muestra. Los valores se compararon con los correspondientes a las muestras de patrón de gelatina de concentración equivalente sin larva.

III.7.f. Proceso de semi-cuantificación de los metales y AgNPs por LA-ICP-MS

La muestra de larva se depositó en el pocillo y se cubrió con gelatina, tal y como se ha señalado anteriormente. Se ablacionaron entre 30-35 líneas a lo largo del cuerpo de la larva. Para cada línea ablacionada se obtuvo un pico, que se integró y la señal resultante se dividió entre la señal obtenida para el Au (III). De esta forma, se integraron todas las líneas y se calculó la suma de todas las intensidades obteniendo un valor único para cada elemento en la muestra. El valor resultante fue interpolado en la curva de calibración interna, corregida con el Au(III), obteniendo así la concentración de cada elemento en la muestra.

El modo de adquisición de los datos en el ICP también se ha tenido en cuenta a la hora de mejorar la resolución de la imagen. En este caso se utilizó el modo TRA, el cual, integra únicamente el punto central de cada pico, con un tiempo de análisis de 0,1 s. Estos datos fueron tratados en el software del equipo “Offline Data Analysis”. Dicho software nos permitió ver los picos que el ICP-MS registra para cada una de las líneas de ablación realizadas. A continuación, los datos se exportaron al software “Chromatograph Data Analysis” para generar un archivo .csv donde se registraron todas las señales medidas en función del tiempo, ya que es la única forma de realizar un estudio de distribución elemental y crear así una imagen. Estos datos se trataron con Microsoft Office Excel 2016 para construir una matriz de datos, que fue posteriormente exportada a la macro UCM-ZF (aplicación adaptada de *Plataforme d’Analyse des Métaux traces par Ablation Laser*) para el procesamiento y construcción de las imágenes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se describen los principales resultados y discusión obtenidos de los estudios (bio)analíticos y de proteómica cuantitativa realizados para evaluar la toxicidad de las AgNPs de 10 y 60nm.

IV.1. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS BIOMOLECULARES IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DE LAS AgNPS EN UN SISTEMA IN VITRO MEDIANTE PROTEÓMICA CUANTITATIVA

El tamaño es una de las propiedades más importantes de las NPs, tal y como ya se ha comentado anteriormente, y un factor crítico en la mediación de diversos efectos biológicos. Por esta razón, el estudio de la toxicidad de las AgNPs en función de su tamaño ha sido el principal objetivo de este trabajo. Concretamente, este primer estudio se ha centrado en la evaluación de los efectos tóxicos de las AgNPs de 10 y 60 nm en el modelo *in vitro* HepG2, con el fin de conocer más en detalle su potencial citotóxico y los mecanismos moleculares implicados en el mismo.

IV.1.1. Caracterización de las AgNPs empleadas

Las AgNPs comerciales (descritas en el apartado III.1 de Materiales y métodos) fueron caracterizadas por TEM para conocer más en detalle su tamaño y forma. Como podemos observar en la **Figura IV.1**, ambos tipos mostraron una forma esférica con un tamaño que correspondió aproximadamente a 10 y 60 nm (A1 y A2), sin observar aglomerados o agregados, tal y como indicaban las especificaciones comerciales. Asimismo, para comprobar su grado de pureza, se utilizó EDS como técnica complementaria. Los espectros obtenidos confirmaron la presencia mayoritaria de Ag en las nanopartículas estudiadas (B1, B2).

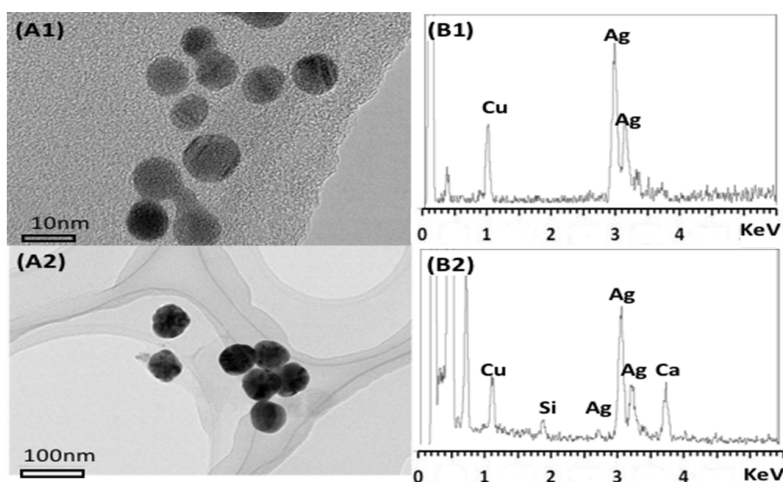


Figura IV.1. Caracterización de A) AgNP10 y B) AgNP60. (A1 y A2): TEM; (B1 y B2): EDS.

Por otro lado, se caracterizaron los dos tipos de AgNPs durante una exposición de las mismas a medios celulares durante 72 h utilizando las técnicas TEM y AF₄, con el propósito de evaluar si el tamaño se mantiene en otro tipo de medios con el paso del tiempo o por el contrario se producen agregados, provocando así un cambio en su forma o tamaño.

Para llevar a cabo la caracterización por AF₄, fue necesario optimizar previamente una serie de parámetros para observar el efecto de los dos tipos de AgNPs en el tiempo de retención y en la intensidad de pico del fractograma obtenido. Para ello, se emplearon suspensiones de cada una de las AgNPs por separado, a una concentración de 500 µg.L⁻¹ cada una, diluidas en la fase móvil a estudiar en cada caso (apartado III.1 de Materiales y métodos). Las medidas se realizaron en todos los casos a una longitud de onda de 405 nm y 430 nm, valores de máxima absorción de nuestras nanopartículas. En primer lugar, se estudió la influencia del pH en el rango 6-9. Como se aprecia en la **Figura IV.2**, para ambos tamaños de AgNPs se obtuvieron las áreas de pico mayores a pH 8, valor que se corresponde con el punto isoeléctrico de dichas AgNPs.

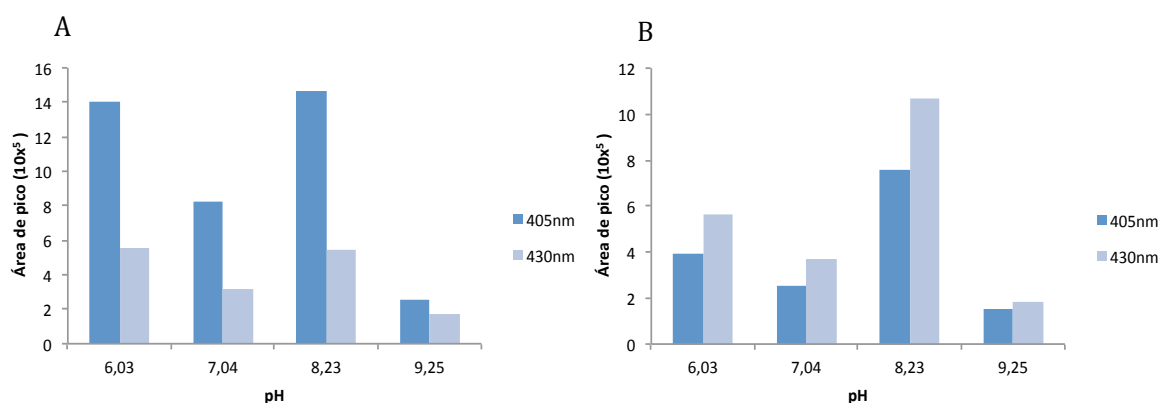


Figura IV.2. Optimización del pH en suspensiones de: A) AgNP10 B) AgNP60. [Ag]=500µg.L⁻¹.

Además, se observó que mientras que las AgNP10 absorben más a una longitud de onda de 405 nm, las AgNP60 lo hacen mayoritariamente a 430 nm. Esto es debido al efecto de resonancia del plasmón superficial. Este efecto es dependiente del tamaño y la morfología que presenten las nanopartículas, lo que permite una identificación única de las mismas a través de su espectro ultravioleta visible tal y como ya se explicó en la Introducción. Asimismo, las AgNP10, debido a su menor diámetro hidrodinámico y a su mayor coeficiente de difusión, eluyen antes que las AgNP60. Los tiempos de retención registrados son 12 minutos para AgNP10 y 26 minutos AgNP60, respectivamente. El pico que aparece en ambos casos en torno a los 7 min, se corresponde con el volumen muerto, que es aquel volumen de fase móvil requerido para eluir un componente no retenido (**Figura IV.3**).

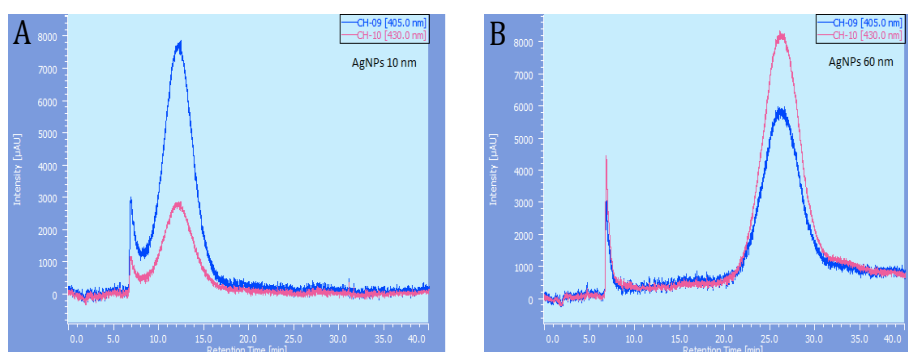


Figura IV.3. Fractogramas obtenidos en agua Milli-Q a pH 8: A) AgNP10 y B) AgNP60. $[Ag]=500 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A continuación, se probó una fase móvil compuesta por dodecil sulfato sódico (SDS) a pH 8. El SDS es un tensioactivo aniónico que asegura una baja fuerza iónica y sirve para evitar la aglomeración de las AgNPs (Bhui *et al.*, 2009); sin embargo, en este caso, los espectros presentaron un aspecto más irregular con picos ligeramente distorsionados, por lo que se descartó su uso y se trabajó con agua Milli-Q. Otro parámetro estudiado fue la temperatura, ya que se trata de un parámetro muy influyente al afectar a la viscosidad de la fase móvil, lo que redundaba en un efecto muy importante en la interacción con la membrana. Las temperaturas estudiadas se encontraban en el intervalo de 20 a 27°C, registrando un mayor área de pico a 25°C (**Figura IV.4**).

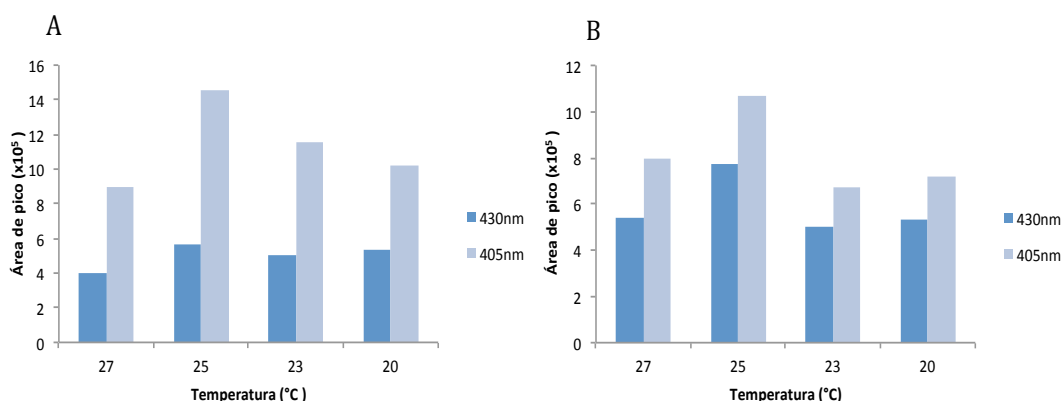


Figura IV.4. Optimización de la temperatura en suspensiones de: A) AgNP10 y B) AgNP60. $[Ag]=500 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Otro criterio importante para evitar la formación de agregados fue la sonicación de las suspensiones previa a la inyección en el AF₄. Para ello, se evaluaron dos métodos diferentes: un baño de ultrasonidos durante 15 min, y una sonda de ultrasonidos focalizada durante 90 s. La **Figura IV.5** muestra picos altos, finos y bien definidos obtenidos cuando se empleó la sonda de ultrasonidos focalizada, por lo que este fue el método seleccionado.

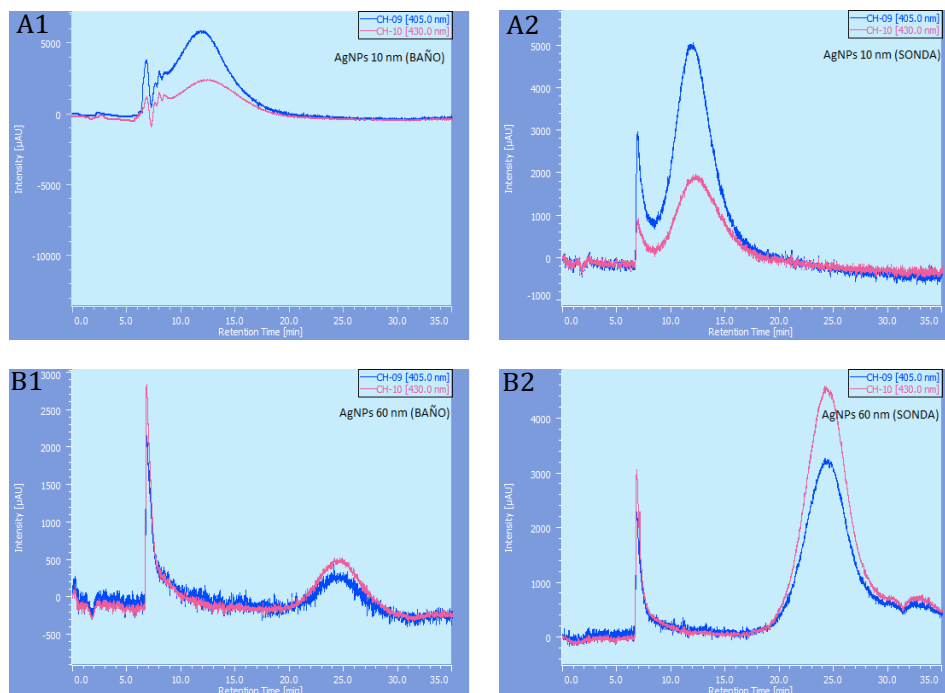


Figura IV.5. Fractogramas obtenidos para A) AgNP10; B) AgNP60, utilizando A1 y B1) baño de ultrasonidos; A2 y B2) sonda de ultrasonidos. $[Ag] = 500 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Con las condiciones seleccionadas (fase móvil agua Milli-Q a pH=8, 25 °C y sonicación con sonda focalizada), se midió el radio hidrodinámico de las nanopartículas. Para las AgNP10 se obtuvo un radio de 17 nm y para las AgNP60 de 75 nm frente a los 10 nm y 60 nm especificados por el proveedor. Es necesario aclarar que el radio hidrodinámico no se corresponde de manera exacta con el tamaño del núcleo de la nanopartícula, sino que incluye también al posible estabilizante que lo rodea y es por ello que se obtuvieron valores ligeramente superiores a los esperados.

Una vez completada la caracterización y comprobando la ausencia de agregados, se realizaron calibrados para los dos tipos de AgNPs en un intervalo de concentraciones desde $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ hasta 2 mg.L^{-1} en las condiciones anteriormente optimizadas. En ambos casos se perdió la linealidad para concentraciones superiores a 1 mg.L^{-1} . Debido a que los estudios de exposición de las células a las AgNPs se realizaron a una concentración de 5 mg.L^{-1} fue necesario ampliar el rango lineal de trabajo. Para solucionar este inconveniente, se decidió cambiar el bucle de inyección de $200 \mu\text{L}$ a $20 \mu\text{L}$ y, de este modo, ya se pudo trabajar entre $0,25$ y 5 mg.L^{-1} , manteniendo así un intervalo dinámico.

A continuación, se procedió a estudiar la influencia de la exposición a las células en la posible aglomeración de las AgNPs. La **Figura IV.6** muestra dos fractogramas obtenidos para AgNP10 y AgNP60 en el medio celular donde se cultivaron las células HepG2 antes y después de la

exposición. La línea naranja se corresponde con la suspensión antes de la exposición y las otras dos con las medidas obtenidas transcurridas las 72 h de contacto con las células.

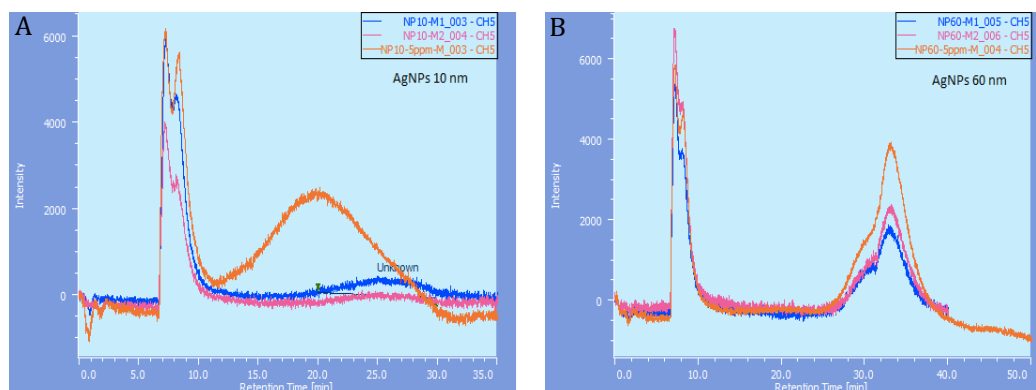


Figura IV.6. Fractogramas obtenidos para A) AgNP10; B) AgNP60 en medio celular DMEM. $[Ag] = 5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Los fractogramas obtenidos por AF₄ muestran de forma evidente que en ambos casos se produjo una disminución de la concentración de Ag tras ser expuestas a las células. Dicha disminución puede deberse fundamentalmente a tres causas: (i) la incorporación intracelular de las AgNPs; (ii) su deposición en el fondo de la placa; y/o (iii) posibles cambios en su estado de agregación. Estas últimas asociaciones afectan al radio hidrodinámico de las NPs, un parámetro fundamental en la separación y en la detección de este tipo de sustancias. Para las AgNP10 se obtuvieron radios de 35 nm y para las AgNP60, de 86 nm. Ambos valores son mayores en comparación a los medidos en agua Milli-Q, lo que puede sugerir un cierto nivel de agregación/aglomeración de las NPs en el medio celular. Los cambios estructurales citados anteriormente se corroboraron por TEM. En la **Figura IV.7**, se observa cómo en las disoluciones previas a la exposición a células ($t=0$), las partículas se encuentran dispersas, aunque formando pequeños agregados (A1 y B1) que aumentan su tamaño una vez transcurridas las 72 horas de exposición (A2 y B2) al recubrirse de otros componentes presentes en el medio celular como fosfatos y sulfatos. Estos nuevos componentes fueron determinados, a su vez, mediante un análisis elemental por EDS (**Figura IV.8**). La formación de estos agregados puede provocar una potencial disminución de las AgNPs en contacto con las células al aumentar su radio hidrodinámico y, por consiguiente, su tamaño, dificultando así su internalización.

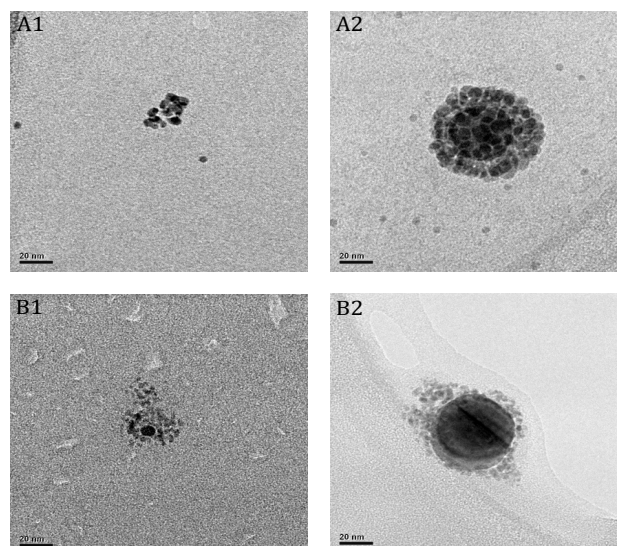


Figura IV.7. Micrografías obtenidas por TEM de AgNPs en medio celular DMEM con células HepG2 a diferentes tiempos de exposición: A1) AgNP10 0h, A2) AgNP10 72h, B1) AgNP60 0h y B2) AgNP60 72h.

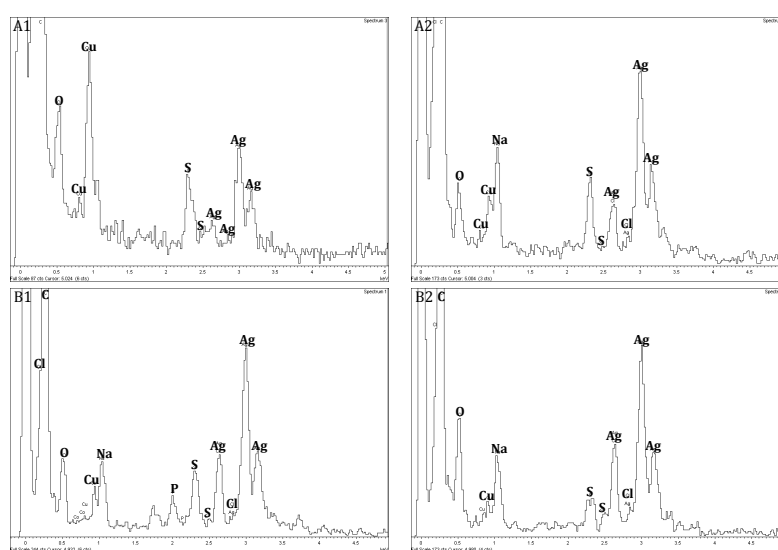


Figura IV.8. Análisis elemental por EDS en medio celular DMEM con células HepG2 expuestas a: A1) AgNP10 0h, A2) AgNP10 72h, B1) AgNP60 0h y B2) AgNP60 72h.

Todas estas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de utilizar varias técnicas para la correcta caracterización de las nanopartículas.

IV.1.2. Viabilidad celular

El análisis de la viabilidad celular es uno de los primeros ensayos que se deben llevar a cabo en la evaluación del potencial citotóxico de cualquier sustancia. El objetivo de este experimento

fue, por una parte, evaluar la citotoxicidad de las AgNPs estudiadas, y por otra, seleccionar unas condiciones de trabajo para los siguientes experimentos de modo que ambos tipos de AgNPs puedan afectar a la viabilidad celular para observar posibles efectos adversos, pero sin disminuirla drásticamente. En primer lugar, con objeto de evaluar el potencial efecto citotóxico de las AgNPs, se evaluó la viabilidad de distintas líneas celulares: HepG2, Hek293, Hela y Hos tras su exposición a diferentes concentraciones de AgNP10 y AgNP60. Para ello, se empleó el ensayo de MTT (detallado en el apartado III.3 de Materiales y métodos). Se seleccionaron 72 h de exposición ya que tiempos más cortos (24 y 48 h) fueron evaluados en experimentos preliminares obteniéndose una baja reproducibilidad de los resultados.

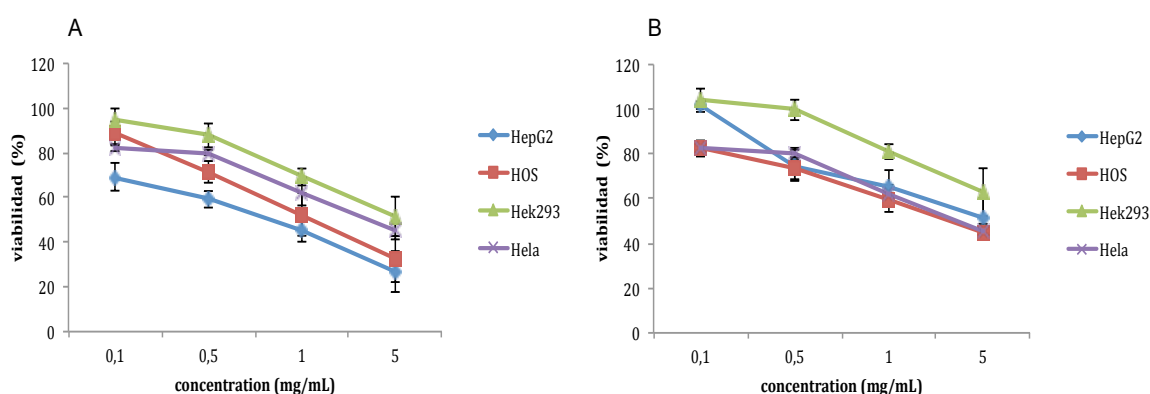


Figura IV.9. Viabilidad de diferentes líneas celulares tras su exposición a diferentes concentraciones de A) AgNP10; B) AgNP60 durante 72 h.

La **Figura IV.9** muestra cómo en todos los casos se observó un decrecimiento de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de AgNPs. Concretamente, la línea celular HepG2 resultó ser la más afectada tras su exposición a AgNP10. En el caso de la exposición a AgNP60, la viabilidad para todas las líneas celulares varió de forma similar a partir de una concentración de 0,5 mg.L⁻¹. Para ambos tamaños de AgNPs, la línea celular Hek293 fue la menos afectada en todo el rango de concentraciones. En base a estos resultados, y a que tal y como se ha descrito anteriormente, el hígado es uno de los órganos donde se produce una mayor acumulación de nanopartículas (Chang *et al.*, 2014), se escogió la línea celular HepG2 para los siguientes experimentos. A continuación, se evaluó el posible efecto del citrato, usado como agente estabilizante en las AgNPs comerciales empleadas, sobre la viabilidad celular con objeto de descartar su influencia en la misma. Tal y como muestra la **Figura IV.10**, se confirmó que la viabilidad de células HepG2 no se veía afectada por el citrato, y que el efecto de la exposición a las AgNP10 fue más acusado respecto a las AgNP60, pudiendo sacar una primera conclusión en cuanto a la mayor toxicidad de las NPs más pequeñas. También hay que resaltar

que la elevada irreproducibilidad de los datos se debe al hecho de trabajar con organismos vivos.

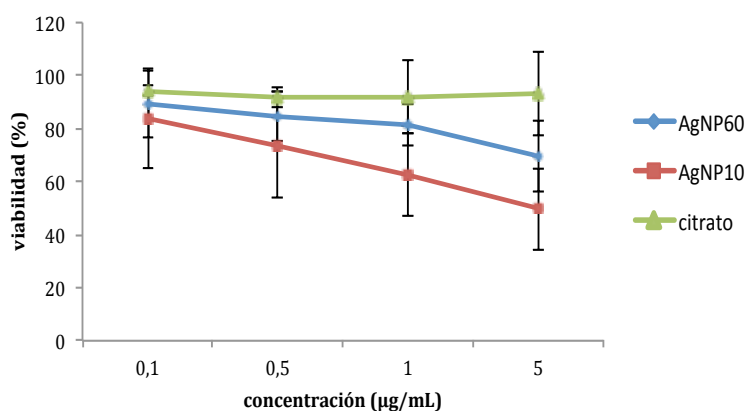


Figura IV.10. Viabilidad de células HepG2 tras la exposición a diferentes concentraciones de AgNP10, AgNP60 y citrato durante 72 h.

En el siguiente estudio de viabilidad, se evaluó la toxicidad ejercida por los dos tamaños de AgNPs frente a la toxicidad de los iones Ag^+ a diferentes concentraciones (**Figura IV.11**). Al igual que en el caso anterior, la viabilidad disminuyó para ambos tipos de NPs, siendo más acusado el descenso tras la exposición a AgNP10. En el caso de la plata iónica la viabilidad disminuyó de forma mucho más drástica, llegando hasta el 100% a partir de una concentración de 5 mg.L^{-1} . De esta forma, se confirmó la mayor toxicidad de la Ag^+ respecto a las AgNPs, tal y como han mostrado estudios de otros autores (Vrček *et al.*, 2016; Samutrtai *et al.*, 2020; Carrola *et al.*, 2020). A partir de los resultados obtenidos, se pudo lanzar la hipótesis de que no se produce una oxidación significativa de las AgNPs a iones Ag^+ , y se mantienen íntegras durante los experimentos de exposición celular, hecho que se confirmó en estudios posteriores.

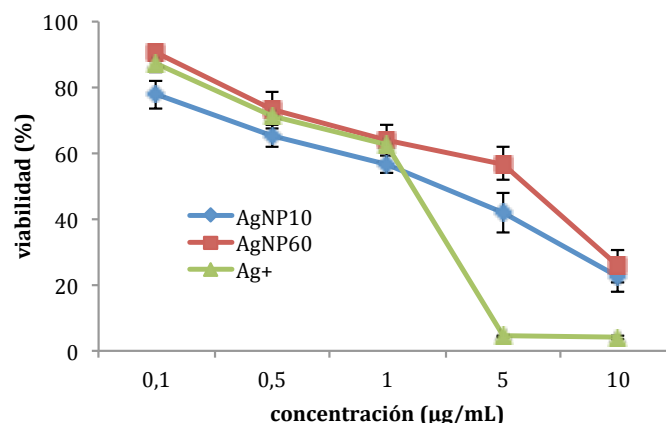


Figura IV.11. Viabilidad de células HepG2 tras la exposición a diferentes concentraciones de AgNP10, AgNP60 y Ag⁺ durante 72 h.

Como conclusión de estos primeros estudios, se seleccionaron como condiciones de trabajo una concentración de 5 mg.L⁻¹ y un tiempo de exposición de 72 h para posteriores experimentos, ya que en dichas condiciones la viabilidad celular disminuye significativamente para ambos tamaños de AgNPs, pero sin comprometerla drásticamente.

IV.1.3. Internalización celular

Se realizó un ensayo de localización intracelular para saber si las AgNPs sólo se adhieren a la superficie de la membrana plasmática o, si por el contrario, son capaces de atravesarla, o incluso traspasar la membrana nuclear de las células y, en tal caso, conocer con más detalle su localización. La **Figura IV.12** muestra las micrografías de TEM de células HepG2 tratadas con AgNP10 y con AgNP60. Como se puede observar, las AgNP10 se localizaron tanto en el citoplasma como en el núcleo, concretamente en el nucleolo. Debido a su pequeño tamaño fueron capaces de atravesar la membrana nuclear. Sin embargo, las de mayor tamaño, AgNP60, atravesaron únicamente la membrana plasmática, localizándose en vacuolas citoplasmáticas formando pequeños agregados.

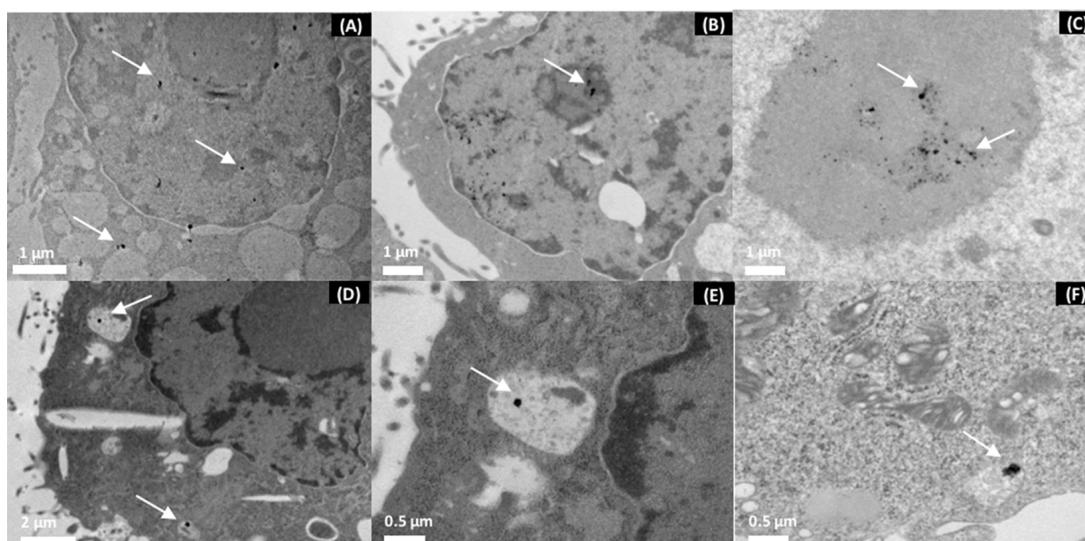


Figura IV.12. Micrografías TEM de secciones ultrafinas de células HepG2 tratadas con:
(A-C) AgNP10; (D-F) AgNP60. $[Ag] = 5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Los resultados observados en estas imágenes fueron completados mediante una digestión ácida y análisis por ICP-MS (detallado en el apartado III.4b de Materiales y métodos). El objetivo de este experimento fue cuantificar su internalización en las células. Por ello, se realizó un balance de masas de la cantidad de Ag encontrada en las diferentes muestras: medio de cultivo, disolución de lavado PBS y pellet celular. Tal y como se observa en la **Tabla IV.1**, se produjo una disminución del contenido de Ag en el medio respecto a la situación inicial ($t = 0$) y se midió Ag en el interior de las células proveniente de la internalización de una pequeña fracción de las AgNPs, concretamente en torno a un 7% para las AgNP10 y un 5% para AgNP60, constatando que la mayoría de la plata permanece en el medio de cultivo. También fue importante ver que la cantidad de Ag en las células antes de llevar a cabo la exposición a las AgNPs fue irrelevante para los dos tamaños de nanopartículas. Finalmente, se comprobó que en ambos casos la suma de la cantidad de Ag encontrada entre las tres muestras (medio de cultivo, PBS y pellet) fue del 100% de la cantidad de Ag inicial, confirmándose así que no hubo ninguna pérdida de Ag durante el experimento.

Tabla IV.1. Balance de masas de la concentración de Ag encontrada en las células HepG2 ($n=5$).
 $[Ag]=5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

AgNP10	Medio (%)	RSD	PBS (%)	RSD	Pellet	RSD
0h	99,5	4,2	0,3	3,7	0,2	9,3
72h	92,3	3,9	0,6	3,5	7,1	1,6
AgNP60	Medio (%)	RSD	PBS (%)	RSD	Pellet	RSD
0h	99,6	5,5	0,3	2,4	0,1	5,9
72h	93,9	1,6	0,8	2,2	5,2	1,9

IV.1.4. Mecanismos moleculares implicados en la toxicidad inducida por AgNPs en células HepG2

Los experimentos realizados hasta este momento, muestran que las AgNP10 se acumulan en el citoplasma formando aglomerados y son capaces de internalizar en el núcleo celular, localizándose concretamente en el nucleolo. Sin embargo, las AgNP60 no traspasan la membrana nuclear, sino que se localizan en vacuolas citoplasmáticas formando pequeños agregados. Esta localización diferente podría ser la razón del efecto diferencial dependiente del tamaño observado en la viabilidad celular. Por todo esto, se decidió profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la toxicidad de estas AgNPs mediante la identificación y cuantificación de proteínas diferencialmente expresadas tras la exposición de células HepG2 a $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AgNP10 ó AgNP60 durante 72 h, empleando para ello la estrategia de proteómica cuantitativa SILAC (detallada en el apartado III.6a de Materiales y métodos). El experimento para cada una de las AgNPs se hizo por duplicado.

En el caso de la exposición a AgNP10 se identificaron un total de 1115 proteínas, de las cuales 574 pasaron los criterios establecidos de cuantificación, que incluyen la identificación de al menos dos péptidos únicos con un valor de MASCOT > 46 , ($p < 0.01$). En cuanto a las células expuestas a AgNP60, se identificaron un total de 1131 proteínas, de las cuales 559 se cuantificaron correctamente. La mayoría de todas estas proteínas presentaron un cociente SILAC próximo a 1, tal y como cabe esperar para una mezcla 1:1 (**Figura IV.13.**). En ambos casos, solo se consideraron las proteínas encontradas en las dos réplicas biológicas llevadas a cabo. Cabe destacar también que, para la cuantificación de proteínas, se estableció otro criterio en el que solo se consideraron proteínas válidas todas aquellas que hubiesen sido identificadas al menos con dos péptidos únicos, es decir, dos péptidos que no compartiesen otras proteínas.

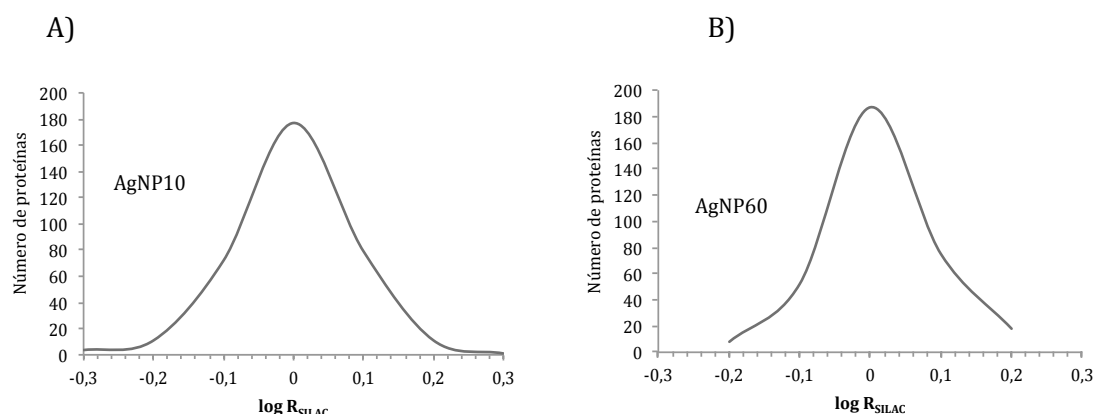


Figura IV.13. Distribución de los cocientes SILAC para las proteínas cuantificadas en células HepG2 expuestas a A) AgNP10; B) AgNP60.

Utilizando como valor de corte un R_{SILAC} de 1.30, se encontraron 51 proteínas alteradas; de las cuales 24 se encontraron sobreexpresadas y 27 inhibidas tras la exposición a AgNP10 y para las AgNP60, 35 se hallaron sobreexpresadas y 17 inhibidas. La **Tabla IV.2** muestra la relación de las proteínas alteradas tras la exposición a las AgNPs y la **Tabla IV.3** muestra las correspondientes a la exposición a AgNP60.

Tabla IV.2. Proteínas alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP10.

Número GI	Nombre	Nombre común	R_{silac}	RSD
148596949	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	-1,93	0,66
23065563	glutathione S-transferase Mu 1	GSTM1	-1,88	15,24
260099723	L-lactate dehydrogenase A chain isoform 3	LDHA	-1,84	8,23
25777600	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 isoform 1	PSMD1	-1,56	18,59
20070130	transcription factor BTF3 isoform B	BTF3	-1,55	17,07
17149828	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	NAA15	-1,51	11,13
4885371	histone H1.0	H1F0	-1,5	9,47
4885409	vigilin isoform a	HDLBP	-1,46	17,37
30410794	proteasome activator complex subunit 3 isoform 1	PSME3	-1,44	17,82
9845509	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 isoform Rac1b	RAC1	-1,44	7,39
33356547	DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	-1,42	13,98
34098946	nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	-1,42	11,77
4557809	ornithine aminotransferase, 66itocondrial isoform 1	OAT	-1,42	7,66
6912634	60S ribosomal protein L13a isoform 1	RPL13a	-1,42	10,62
52632383	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L isoform a	HNRNPL	-1,41	14,67
47132622	S-methyl-5~-thioadenosine phosphorylase	MTAP	-1,41	16,5
42544159	heat shock protein 105 kDa	HSPH1	-1,38	17,4
14165469	40S ribosomal protein S15a	RPS15A	-1,37	19,02
4826760	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRNPF	-1,37	8,2
21361399	serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	-1,35	17,33
4757926	RNA-binding protein 39 isoform b	RBM39	-1,35	4,09
208973246	dihydropteridine reductase	QDPR	-1,35	3,78

4507645	triosephosphate isomerase isoform 1	TPI1	-1,33	15,45
7706495	dnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	DNAJB11	-1,32	5,72
228008295	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 4	SYNCRIP	-1,31	15,87
66346679	plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein isoform 1	SERBP1	-1,3	1,3
24234688	stress-70 protein, 67itocondrial precursor	HSPA9	-1,3	13,29
21361659	importin-9	IPO9	1,3	13,54
62241042	bifunctional glutamate/proline—tRNA ligase	EPRS	1,31	8,19
10835049	transforming protein RhoA precursor	RHOA	1,32	10,16
14719392	cofilin-2 isoform 1	CFL2	1,33	13,84
4826659	F-actin-capping protein subunit beta isoform 1	CAPZB	1,33	12,71
4758868	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 isoform 1 precursor	P4HA1	1,34	9,09
25777732	aldehyde dehydrogenase, 67itocondrial isoform 1 precursor	ALDH2	1,34	17,25
4506003	serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit isoform 1	PPP1CA	1,35	14,09
28178832	isocitrate dehydrogenase [NADP], 67itocondrial precursor	IDH2	1,39	9,8
42558250	caprin-1 isoform 1	CAPRIN1	1,39	3,59
116256489	septin-9 isoform c	sept-09	1,39	15,01
54792069	small ubiquitin-related modifier 2 isoform a precursor	SUMO2	1,41	18,75
4758138	probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	1,42	16,54
315221152	60S ribosomal protein L11 isoform 2	RPL11	1,45	5,53
154355000	far upstream element-binding protein 2	KHSRP	1,47	9,39
108773793	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase isoform b	G6PD	1,48	3,22
17402893	phosphoserine aminotransferase isoform 1	PSAT1	1,49	2,56
10716563	calnexin precursor	CANX	1,5	8,92
40807485	pre-mRNA-processing factor 6	PRPF6	1,53	5,9
31711992	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, 67itocondrial precursor	DLAT	1,59	20,74
302699237	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 isoform 1	EIF4G1	1,65	12,67
4505641	proliferating cell nuclear antigen	PCNA	1,83	18,35
7656952	calcyclin-binding protein isoform 1	CACYBP	2,12	9,16

Tabla IV.3. Proteínas alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP60.

Número GI	Nombre	Nombre común	R _{silac}	RSD
4505145	NAD-dependent malic enzyme, 67itocondrial isoform 1 precursor	ME2	-1,58	10,36
162329583	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	-1,46	10,74
4506621	60S ribosomal protein L26	RPL26	-1,45	9,67
4827050	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 isoform a	USP14	-1,44	18,60
14389309	tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	-1,43	3,95
11968182	40S ribosomal protein S18	RPS18	-1,43	15,85
5729953	nuclear migration protein nudC	NUDC	-1,41	17,98
4506467	radixin isoform 2	RDX	-1,36	5,22
21040371	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	DDX39A	-1,35	9,24
4759274	thioredoxin-like protein 1	TXNL1	-1,35	5,22
4759224	programmed cell death protein 5	PDCD5	-1,34	5,03
10800144	histone cluster 1, H2aj	HIST1H2AJ	-1,34	15,84
7657015	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	-1,33	15,56
38202255	threonine—tRNA ligase, cytoplasmic isoform 1	TARS	-1,31	11,93
4501885	actin, cytoplasmic 1	ACTB	-1,31	18,06
4504897	importin subunit alpha-2	KPNA2	-1,30	18,06

5174391	alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	AKR1A1	-1,29	7,69
4885417	ubiquitin-conjugating enzyme E2 K isoform 1	UBE2K	1,30	14,35
5453832	68itocon up-regulated protein 1 precursor	HYOU1	1,31	19,23
170763498	protein SET isoform 2	SET	1,31	7,95
34932414	non-POU domain-containing octamer-binding protein isoform 1	NONO	1,31	15,57
34098946	nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	1,32	6,58
4506681	40S ribosomal protein S11	RPS11	1,32	3,37
19923437	GTP:AMP phosphotransferase, 68itocondrial isoform a	AK3	1,32	19,43
4826998	splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	1,34	8,7
5031851	stathmin isoform a	STMN1	1,36	10,28
5453555	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	1,36	14,05
5174735	tubulin beta-4B chain	TUBB4B	1,37	12,57
5031777	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, 68itocondrial precursor	IDH3A	1,38	7,95
4502203	ADP-ribosylation factor 3	ARF3	1,4	16,52
57013276	tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1,4	18,34
4503509	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	1,41	7,94
154355000	far upstream element-binding protein 2	KHSRP	1,42	12,09
15718687	40S ribosomal protein S3 isoform 1	RPS3	1,43	15,79
19923142	importin subunit beta-1	KPNB1	1,44	17,15
5729877	heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1	HSPA8	1,44	15,5
4506613	60S ribosomal protein L22 proprotein	RPL22	1,44	1,50
4502643	T-complex protein 1 subunit zeta isoform a	CCT6A	1,44	12,32
384367993	COP9 signalosome complex subunit 4 isoform 2	COPS4	1,44	11,99
4826734	RNA-binding protein FUS isoform 1	FUS	1,44	16,72
5453607	T-complex protein 1 subunit eta isoform a	CCT7	1,45	9,88
38201623	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 isoform 5	EIF4G1	1,46	12,5
14141161	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U isoform b	HNRNPU	1,46	6,25
109389365	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase isoform a	G6PD	1,46	11,84
27436946	lamin isoform A	LMNA	1,47	18,41
32189394	ATP synthase subunit beta, 68itocondrial precursor	ATP5B	1,48	17,22
14141193	40S ribosomal protein S9	RPS9	1,52	6,69
8923390	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial precursor	CHCHD3	1,53	7,26
4504041	guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 isoform 1	GNAI2	1,54	4,61
4506607	60S ribosomal protein L18 isoform 1	RPL18	1,55	31,27
77404397	staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	1,8	12,06
4758504	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 isoform 1	HSD10	1,93	2,20

Las proteínas alteradas en cada uno de los casos se clasificaron de acuerdo con su función molecular y biológica utilizando la base de datos *Gene Ontology* (GO). Las funciones moleculares y celulares afectadas fueron significativamente diferentes al comparar las células expuestas a AgNP10 y a AgNP60 (**Figura IV.14**).

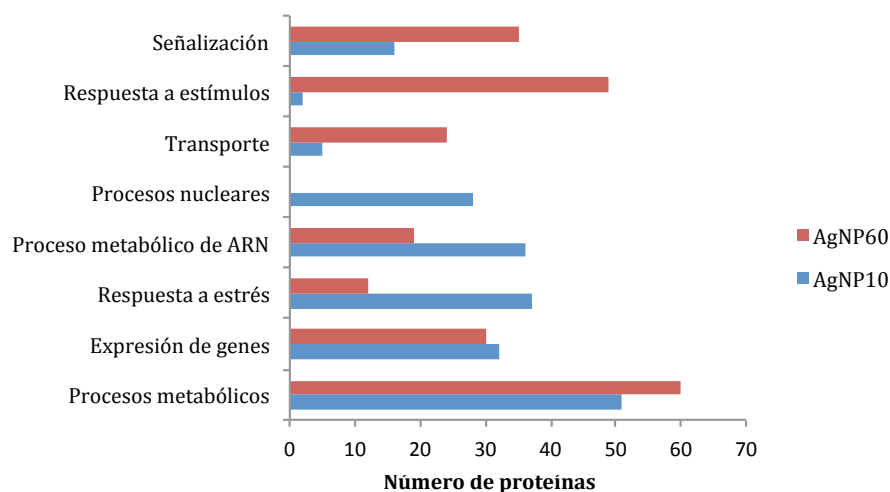


Figura IV.14. Funciones biológicas de las proteínas alteradas en células HepG2 expuestas a AgNP10 y AgNP60 utilizando la base de datos Gene Ontology.

Analizando la **Figura IV.14**, puede observarse que las proteínas involucradas en procesos nucleares solo se encontraron alteradas en las células expuestas a AgNP10, lo que concuerda con el hecho de que sólo las AgNPs de menor tamaño atraviesen la membrana nuclear hasta llegar al nucleolo, tal y como se puso de manifiesto en el estudio de localización celular. Por otro lado, las células expuestas a AgNP60 mostraron varias proteínas desreguladas e involucradas en respuesta a estímulos y al transporte. Otros procesos como el proceso metabólico de ARN, expresión génica o procesos metabólicos se alteraron de manera similar tras la exposición a ambos tipos de AgNPs. Sin embargo, las proteínas que se encontraron inhibidas o sobreexpresadas fueron diferentes. De esta forma, solo 4 proteínas fueron igualmente alteradas tras la exposición de las células HepG2 a los dos tipos de AgNPs, lo que pone de manifiesto, por un lado, los diferentes mecanismos de citotoxicidad activados en cada uno de los casos, así como la relevancia del tamaño en la evaluación de la citotoxicidad de las AgNPs en particular, y de los nanomateriales, en general.

Profundizando un poco más en el análisis de algunas de las proteínas alteradas en células expuestas a AgNP10, la proteína más desregulada fue NOLC1 ($R_{\text{Silac}} = -1,93$), también conocida como Nopp140. NOLC1 está involucrada en la nucleogénesis y la transcripción del gen rRNA (Chiu *et al.*, 2002). La inhibición de dicha proteína conduce a estrés nucleolar (James *et al.*, 2013), provocando la detención de la biogénesis ribosómica y, como consecuencia, la detención del ciclo celular y finalmente la apoptosis (Hein *et al.*, 2013). Por tanto, la inhibición de NOLC1 sería una de las causas de la disminución de viabilidad celular observada tras la exposición a AgNP10. Estos resultados concuerdan también con la sobreexpresión de la proteína RPL11 ($R_{\text{Silac}} = +1,45$), ya que tanto la detención del ciclo celular como la apoptosis inducida por estrés

nucleolar están mediadas por la liberación de este tipo de proteínas ribosómicas. Asimismo, la regulación previa de RPL11 aumenta la interacción entre RPL11 y MDM2, lo que lleva a la activación de p53 (Nishimura *et al.*, 2015) y promueve la detención del ciclo celular en la fase G1 (Hein *et al.*, 2013). Además, RPL11 no solo actúa como regulador de MDM2 y p53 (Olausson *et al.*, 2012), sino que también regula a la fosfoproteína c-Myc, la cual desempeña un papel fundamental en la progresión del ciclo celular y en los fenómenos de apoptosis. Por otro lado, la sobreexpresión de RPL11 induce la regulación negativa de c-Myc (Challagundla *et al.*, 2011) y aunque dicha proteína no se encontró en este experimento, sí encontramos otras proteínas inhibidas que están relacionadas con ella, tales como HSPH1 ($R_{\text{silac}} = -1.38$), cuya inhibición también induce la desregulación de c-Myc (Riggelen *et al.*, 2010). En base a estos resultados, se llegó a la conclusión de que la interrupción de la biogénesis ribosómica y la posterior detención del ciclo celular y/o apoptosis de las células expuestas a AgNP10 no se debe solo a la activación de p53 sino también a la inhibición de la proteína c-Myc (James *et al.*, 2014). Se encontraron también varias proteínas inhibidas, las cuales están involucradas en la maduración del rRNA y el ensamblaje del ribosoma, lo que afirma de nuevo que las AgNP10 provocan la disrupción de la biogénesis del ribosoma. Por ejemplo, la proteína SERBP1 ($R_{\text{silac}} = -1.30$) se encontró inhibida. Dicha proteína se ha identificado como un factor de procesamiento pre-ARNr (Tafforeau *et al.*, 2013). Asimismo, también se encontraron inhibidas RAC1 ($R_{\text{silac}} = -1.44$), una proteína de unión a GTP perteneciente a la familia Rho de pequeñas GTPasas que participa en la síntesis de rRNA (Xu *et al.*, 2013); NAT1 ($R_{\text{silac}} = -1.51$), que es una de las subunidades catalíticas de NATA y desempeña un papel crucial en la biogénesis de la subunidad ribosómica 60S (Wan *et al.*, 2013); HNRNPL ($R_{\text{silac}} = -1.41$) y HNRPRF ($R_{\text{silac}} = -1.37$) que interactúan con B23, una proteína nucleolar involucrada en la transcripción del rRNA (D'Agostino *et al.*, 2010); y RPS15A ($R_{\text{silac}} = -1.37$), una subunidad de la proteína ribosómica 40S que modula el ensamblaje y la traducción del ribosoma, y cuya inhibición suprime el crecimiento y la proliferación celular (Zhao *et al.*, 2015). Cabe destacar que ninguna de las proteínas alteradas comentadas aquí y relacionadas con estrés nucleolar y la biogénesis de los ribosomas se encontraron alteradas en las células expuestas a AgNP60, lo que podría explicarse por la incapacidad de las AgNP60 de atravesar la membrana nuclear e interactuar con el nucleolo.

Por otro lado, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) juega un papel importante en los efectos citotóxicos primarios de diferentes metales (Cabezas-Sánchez *et al.*, 2016). Por lo tanto, en las células expuestas a AgNPs, se esperaba encontrar alteraciones en la expresión de proteínas involucradas en mecanismos de desintoxicación o defensa del estrés oxidativo, así como proteínas involucradas en la generación de ROS. Corroborando este hecho, se encontraron proteínas involucradas en el estrés oxidativo tras la exposición a AgNPs. Curiosamente, estas

proteínas fueron diferentes para ambos experimentos. Por ejemplo, una de las proteínas más desreguladas que se encontró tras la exposición a AgNP10 fue GSTM1 ($R_{\text{Silac}} = -1.88$), conocida por estar involucrada en la desintoxicación de compuestos electrofílicos y por neutralizar el efecto de los antioxidantes en el sistema celular. Su inhibición perjudica la metabolización y la desintoxicación de los fármacos (Appiah-Opong *et al.*, 2009). Por el contrario, encontramos sobreexpresadas las proteínas IDH2 ($R_{\text{Silac}} = +1.39$), ALDH2 ($R_{\text{Silac}} = +1.34$) y EPRS ($R_{\text{Silac}} = +1.31$) en células expuestas a AgNP10, que son proteínas cuya sobreexpresión está relacionada con la adaptación (Young *et al.*, 2016) y protección contra el estrés oxidativo (Park *et al.*, 2016; Poon *et al.*, 2005).

Tras la exposición a AgNP60, también se encontraron proteínas sobreexpresadas que desempeñan un papel protector en células que sufren estrés. Tal es el caso de HSD10 ($R_{\text{Silac}} = +1.93$), que es una enzima mitocondrial que cataliza la oxidación de una amplia variedad de alcoholes, ácidos grasos y esteroides. Esta proteína resulta ser crucial para el mantenimiento de la homeostasis celular (Carlson *et al.*, 2015). Otra proteína alterada fue KPNB1 ($R_{\text{Silac}} = +1.44$), miembro de la familia de proteínas de la carioferina, que juega un papel importante en las rutas de importación y exportación nuclear, y cuya sobreexpresión ha demostrado ser sensible al choque térmico y al estrés oxidativo (Dai *et al.*, 2015). Otras proteínas alteradas como GNAI2 ($R_{\text{Silac}} = +1.54$), CHCHD3 ($R_{\text{Silac}} = +1.53$), RPS9 ($R_{\text{Silac}} = +1.52$) y HSPA8 ($R_{\text{Silac}} = +1.44$), se encontraron sobreexpresadas y están relacionadas con vías sensibles al estrés y necesarias para la proliferación celular normal (Deng *et al.*, 2016; Lindström & Zhang, 2008; Tsolakidou *et al.*, 2010; Urquhart *et al.*, 2016); al igual que RPS11 ($R_{\text{Silac}} = +1.32$), ATP5B ($R_{\text{Silac}} = +1.48$) y LMNA ($R_{\text{Silac}} = +1.47$), que se consideran marcadores para detectar estrés celular (Yong *et al.*, 2015), fosforilación oxidativa (Lynam-Lennon *et al.*, 2014) y daño oxidativo en el núcleo (Zuela *et al.*, 2012). En cuanto a las proteínas involucradas en la generación de ROS, la proteína LDHA ($R_{\text{Silac}} = -1.84$) se encontró inhibida y la proteína G6PD sobreexpresada ($R_{\text{Silac}} = +1.48$). Si bien la inhibición de LDHA reduce los niveles de ATP y favorece la generación de ROS, aumentando el estrés oxidativo (Le *et al.*, 2010), la sobreexpresión de la proteína G6PD promueve una mayor expresión de enzimas prooxidativas como el óxido nítrico sintasa y la oxidasa NADPH, generando una mayor acumulación de ROS (Lee *et al.*, 2011).

De acuerdo con todo esto, sería lógico haber encontrado muchas evidencias de daño en el ADN inducido por la exposición a AgNPs en nuestro experimento SILAC. Esto fue así, sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la mayoría de las proteínas alteradas que se encontraron y, por lo tanto, los mecanismos asociados a la respuesta y reparación del daño del ADN, fueron diferentes dependiendo del tamaño de partícula utilizado. Para las células expuestas a AgNP10, se encontró inhibida la proteína H1FO ($R_{\text{Silac}} = -1.48$), que comúnmente se encuentra inhibida tras producirse daño en el ADN, favoreciendo así la ralentización de su síntesis (Lu *et*

al., 2009). Por el contrario, la proteína CULB4 ($R_{\text{Silac}} = +1.42$), que se sobreexpresa como defensa contra la senescencia celular inducida por el estrés, fue encontrada sobreexpresada. A su vez, dicha proteína regula otra proteína llamada HUWE1, la cual se encuentra involucrada en la reparación al daño del ADN (Yi *et al.*, 2015). Asimismo, la proteína PCNA ($R_{\text{Silac}} = +1.83$) se encontró sobreexpresada. PCNA es una proteína nuclear activa involucrada en la replicación, recombinación y reparación del ADN y su sobreexpresión sirve como un marcador de reparación del ADN e, indirectamente, como un indicador de daño celular (Moore *et al.*, 2004). Otra proteína sobreexpresada fue DDX5 ($R_{\text{Silac}} = +1.42$), la cual se requiere selectivamente para la inducción de la expresión de p21 dependiente de p53 y la detención del ciclo celular después del daño en el ADN (Nicol *et al.*, 2013). Además, la respuesta al daño del ADN se coordina mediante la traducción selectiva de ARNm mediada por altos niveles de la proteína EIF4G1, que también se encontró sobreexpresada tras la exposición a AgNP10 ($R_{\text{Silac}} = +1.65$) y a AgNP60 ($R_{\text{Silac}} = +1.46$) (Badura *et al.*, 2012).

En las células expuestas a AgNP60, se encontraron muchas proteínas sobreexpresadas tales como KHSRP ($R_{\text{Silac}} = +1.42$), la cual también se desreguló en células expuestas a AgNP10 ($R_{\text{Silac}} = +2.12$), que participa en la cascada de señalización involucrada en la regulación de la respuesta celular al daño del ADN (Briata *et al.*, 2016); SFPQ ($R_{\text{Silac}} = +1.34$), proteína de unión a ADN y ARN involucrada en la transcripción y reparación del daño al DNA (Lu *et al.*, 2018) y que forma un heterodímero con la proteína NONO ($R_{\text{Silac}} = +1.31$), la cual está involucrada en la etapa inicial de respuesta a roturas de doble cadena (Salton *et al.*, 2010); FUS ($R_{\text{Silac}} = +1.44$) y LMNA ($R_{\text{Silac}} = +1.47$) que participan en diferentes vías para la reparación del ADN (Sama *et al.*, 2014; Zuela *et al.*, 2012), y YBX1 ($R_{\text{Silac}} = +1.32$) capaz de proteger las células contra agentes que dañan el ADN (Kim *et al.*, 2013). De la misma forma, también se encontraron algunas proteínas alteradas que sugieren la activación de la vía de respuesta al estrés integrada (ISR), como otro mecanismo de defensa contra el daño celular inducido por las AgNPs. Esta vía se activa en células eucariotas en respuesta a una variedad de cambios fisiológicos y diferentes condiciones patológicas para restaurar la homeostasis celular (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). La activación de ISR promueve con frecuencia la formación de agregados de ribonucleoproteínas llamados gránulos de estrés. Estos gránulos de estrés ayudan a la célula a conservar energía y a protegerla de la apoptosis. En nuestro experimento, se encontró una sobreexpresión de la proteína RhoA ($R_{\text{Silac}} = +1.32$) en células expuestas a AgNP10. RhoA es una proteína que generalmente aparece sobreexpresada bajo estrés y es necesaria para la formación de los gránulos de estrés mencionados anteriormente (Tsai & Wei, 2010). Estos gránulos de estrés están formados por agregados citoplasmáticos de proteína y ARN (grupos de proteínas) que se

ensamblan en respuesta al estrés celular y, si no se eliminan adecuadamente, terminan causando toxicidad a las células (Shao *et al.*, 2017). Algunas de estas proteínas incluyen a la proteína CAPRIN1 ($R_{\text{Silac}} = +1.39$) (sobrexpresada tras la exposición a AgNP10) y a la proteína SND1 ($R_{\text{Silac}} = +1.80$), que se encontró sobreexpresada en células expuestas a AgNP60. Otro componente de traducción e iniciación encontrado en los gránulos de estrés es EIF4G1, proteína sobreexpresada tanto en células expuestas a AgNP10 ($R_{\text{Silac}} = +1.65$) como a AgNP60 ($R_{\text{Silac}} = +1.46$) (Rozelle *et al.*, 2014).

En base a estos resultados, puede concluirse que únicamente las AgNP10 inducen estrés nucleolar y detienen la biogénesis ribosómica, mientras que ambos tipos de AgNPs inducen estrés oxidativo, daño en el ADN y provocan la activación de mecanismos de defensa en las células expuestas, aunque éstos sean diferentes. De esta forma, también se esperó encontrar varias proteínas alteradas que estuvieran involucradas en la proliferación celular, desregulación del ciclo celular y apoptosis, ya que son consecuencias posteriores de tales procesos. De hecho, en células expuestas a AgNP10, se encontraron proteínas inhibidas tales como BTF3 ($R_{\text{Silac}} = -1.55$), YBX1 ($R_{\text{Silac}} = -1.42$), HDLBP ($R_{\text{Silac}} = -1.46$), DNAJB11 ($R_{\text{Silac}} = -1.32$) y HSPA9 ($R_{\text{Silac}} = -1.30$). La inhibición de estas proteínas está asociada a una disminución de la proliferación celular (Lim *et al.*, 2017; Symes *et al.*, 2013), una reducción de la regulación del ciclo celular (Starenki *et al.*, 2015) y un aumento de la apoptosis (Xiang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). Además, se observó la sobreexpresión de la proteína CACYBP ($R_{\text{Silac}} = +2.12$), igualmente asociada a la inhibición de la proliferación celular (Ning *et al.*, 2007).

En células expuestas a AgNP60 también se encontraron inhibidas varias proteínas estructurales que comúnmente se sobreexpresan en células de cáncer, ya que están estrechamente relacionadas con la proliferación y la migración celular. Este es el caso de la proteína TUBA1C ($R_{\text{Silac}} = -1.43$), un componente de la tubulina que se considera un oncogen y aparece significativamente sobreexpresado en tejidos tumorales (Wang *et al.*, 2017). La proteína RDX ($R_{\text{Silac}} = -1.36$), inhibida en células expuestas a AgNP60, funciona como un reticulante citoesquelético de membrana en estructuras de superficie celular ricas en actina y, por lo tanto, se considera esencial para la organización del citoesqueleto, la movilidad celular, la adhesión y la proliferación (Hoeftlich & Ikura, 2004). Otra proteína desregulada fue DDX39A ($R_{\text{Silac}} = -1.35$), una nueva helicasa de ARN cuya inhibición suprime la proliferación celular (Nakata *et al.*, 2017). La proteína KPNA1 que también se encontró desregulada ($R_{\text{Silac}} = -1.30$), promueve la proliferación celular a través de la regulación positiva de c-Myc y la regulación negativa de FOXO3a (Huang *et al.*, 2013) y TRAS ($R_{\text{Silac}} = -1.31$). Esta proteína induce selectivamente la migración (Williams *et al.*, 2013). También se encontraron inhibidas la proteína PSMD1 ($R_{\text{Silac}} = -1.56$) y PSMD3 ($R_{\text{Silac}} = -1.44$) en células expuestas a AgNP10, y USP14 ($R_{\text{Silac}} = -1.45$) tras la exposición a AgNP60. Estas alteraciones inducen la disfunción del proteasoma de ubiquitina

(Phukan *et al.*, 2016), inhibiendo la proliferación celular e induciendo apoptosis (Adams *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2016). Por otro lado, en las células expuestas a AgNP10 se encontró una alteración de CANX ($R_{\text{Silac}} = +1.50$) y KHSRP ($R_{\text{Silac}} = +2.12$), cuya sobreexpresión se correlaciona positivamente con la regulación positiva de proteínas pro-apoptóticas (Shi *et al.*, 2015) y con la muerte celular apoptótica (Guérin *et al.*, 2008).

En base a todos los resultados comentados, se han propuesto unos mecanismos de toxicidad en células HepG2 expuestas a AgNP10 y AgNP60, que se han esquematizado en la **Figura IV.15** y **Figura IV.16**, respectivamente.

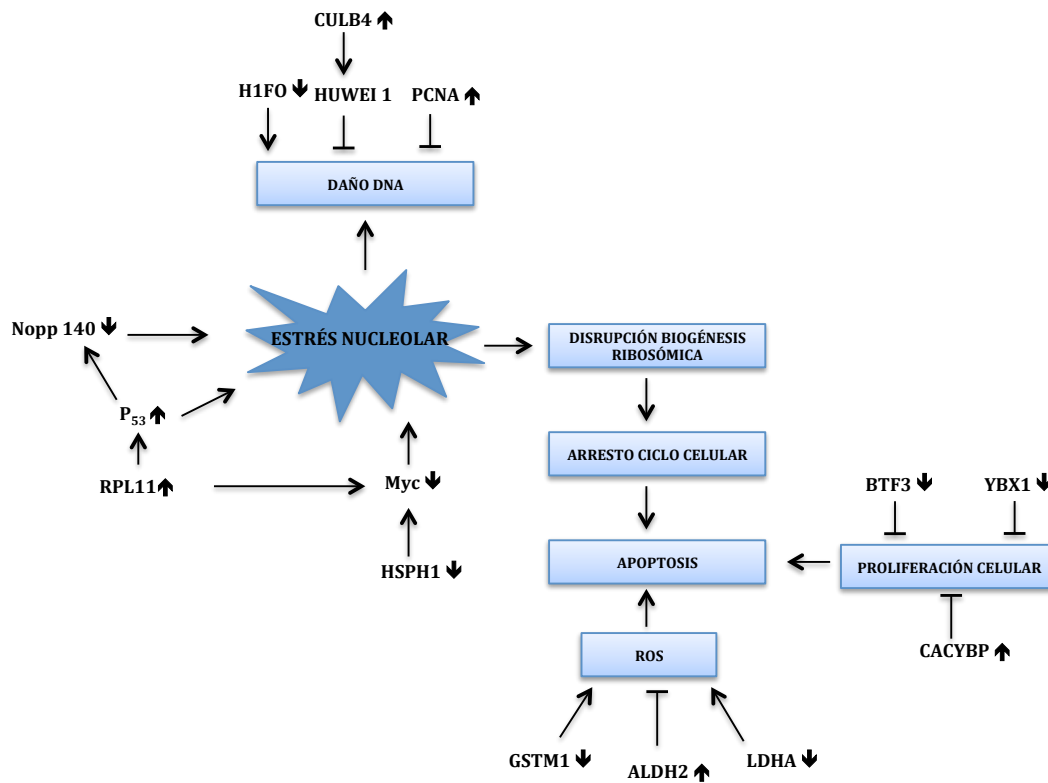


Figura IV.15: Esquema del mecanismo molecular asociado a la toxicidad de AgNP10 en células HepG2.

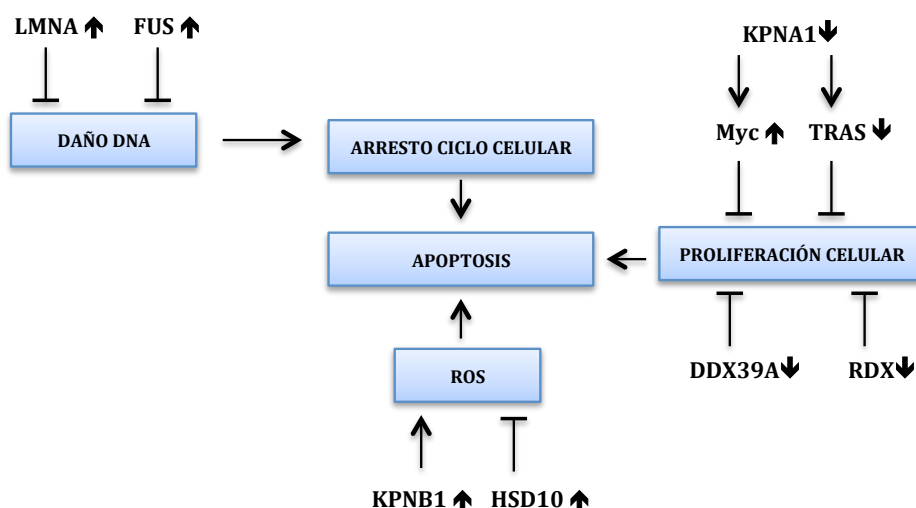


Figura VI.16: Esquema del mecanismo molecular asociado a la toxicidad de AgNP60 en células HepG2.

IV.1.5. Efecto de las AgNP10 en proteínas de núcleo y mecanismos relacionados con la síntesis y estabilidad del ADN

En el estudio anterior se demostró que las AgNP10 internalizan en el núcleo localizándose, concretamente, en el nucleolo, y causando así estrés nucleolar y disrupción de la biogénesis ribosómica. Debido a estos resultados, se planteó profundizar sobre el efecto de las AgNP10 en el núcleo celular, realizando un nuevo experimento SILAC enfocado de manera específica a las proteínas nucleares. Para ello, se realizó previamente una purificación de las proteínas de núcleo según el método explicado en la sección III.6.a.6 *Materiales y Métodos*, lo que permitió explorar los mecanismos de toxicidad asociados con el daño al ADN, ya que esta información es crucial a la hora de comprender de una forma más profunda los mecanismos biomoleculares involucrados en la toxicidad de las AgNP10.

En este nuevo ensayo SILAC se identificaron un total de 1237 proteínas, de las cuales 374 pasaron los criterios establecidos para la cuantificación de proteínas, que incluyen la identificación de al menos dos péptidos únicos con un valor de MASCOT > 46, ($p < 0.01$). Utilizando como valor de corte un R_{SILAC} de 1.50 para las proteínas cuantificadas, se encontraron alteradas 45, de las cuales 21 estaban inhibidas y 24 sobreexpresadas. Tal y como se muestra en la **Tabla IV.4**, la media de la desviación estándar relativa (RSD) de las proporciones obtenidas de las réplicas fue inferior al 20%, lo que indicó una buena reproducibilidad entre los experimentos.

Tabla IV.4. Proteínas nucleares alteradas en la evaluación del potencial citotóxico de las AgNP10.

Número GI	Nombre	Nombre común	R _{SILAC}	RSD
13124881	core-binding factor subunit beta isoform 1	CBFB	-5,55	17,36
33469922	DNA replication licensing factor MCM7 isoform 2	MCM2	-3,70	3,07
22748747	protein LSM12 homolog	LSM12	-2,94	4,16
28212272	nucleolar protein 9	NOP9	-2,50	7,43
4506005	serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subu	PPP1CB	-2,27	6,72
4759098	transformer-2 protein homolog beta isoform 1	TRA2B	-2,27	17,51
4758616	transcription factor AP-1	JUN	-2,22	0,37
217330641	protein IWS1 homolog	IWS1	-2,00	17,93
10801345	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	-1,96	14,95
15487670	nuclear RNA export factor 1 isoform 1	NXF1	-1,96	15,70
394582093	DNA replication licensing factor MCM3 isoform 1	MCM3	-1,85	7,16
332635087	phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein iso	PICALM	-1,72	15,37
87196351	ATP-dependent RNA helicase DDX3X isoform 1	DDX3X	-1,61	6,27
379317177	nucleolar RNA helicase 2 isoform 2	DDX21	-1,56	17,85
121114298	cullin-4B isoform 1	CUL4B	-1,56	12,44
7706501	WW domain-binding protein 11	WBP11	-1,54	7,10
4506411	ran GTPase-activating protein 1	RANGAP1	-1,54	9,43
31543164	THO complex subunit 6 homolog isoform 1	THOC6	-1,54	10,14
224586884	DNA-binding protein A isoform b	ID1	-1,52	15,53
5174447	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	RACK1	-1,50	14,52
148596949	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	-1,50	10,45
40556376	putative oxidoreductase GLYR1	GLYR1	1,50	10,19
4502101	annexin A1	ANXA1	1,50	13,20
14043070	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform b	HNRNPA1	1,51	19,98
4507555	thymopoietin isoform alpha	TMPO	1,52	19,94
123173757	ribonucleoprotein PTB-binding 1	RAVER1	1,55	19,27
319996623	putative RNA-binding protein 15 isoform 2	RBM15	1,58	10,58
4506713	ubiquitin-40S ribosomal protein S27a precursor	RPS27A	1,58	13,68
4504239	histone H2A type 1	HIST1H2AA	1,58	9,60
91208426	pre-mRNA-processing-splicing factor 8	PRPF8	1,59	18,93
45827706	protein quaking isoform HQK-5	QKI	1,59	17,74
4502709	cyclin-dependent kinase 1 isoform 1	CDK1	1,66	10,98
118601081	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	1,69	10,11

6005747	E3 ubiquitin-protein ligase RING2	RNF2	1,71	16,91
20149709	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like isoform 1	HNRNPLL	1,72	15,67
75677351	sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	SUDS3	1,73	19,36
133908629	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1 isoform a	SMARCD1	1,74	10,76
24234688	stress-70 protein, mitochondrial precursor	HSPA9	1,81	17,80
102469037	transcription factor jun-D	JUND	1,88	17,46
14110417	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 isoform b	HNRNPD	1,92	14,64
390608669	prohibitin-2 isoform 3	PHB2	2,23	14,00
42544123	splicing factor 1 isoform 3	SF1	2,29	19,15
5901962	histone acetyltransferase KAT7 isoform 1	KAT7	2,63	17,75
13123776	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	DMAP1	2,66	17,86
117189975	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 isoform	HNRNPC	2,90	6,67

Las proteínas diferencialmente expresadas se agruparon de acuerdo con su función biológica utilizando la base de datos *Gene Ontology* (GO) (**Figura IV.17**).

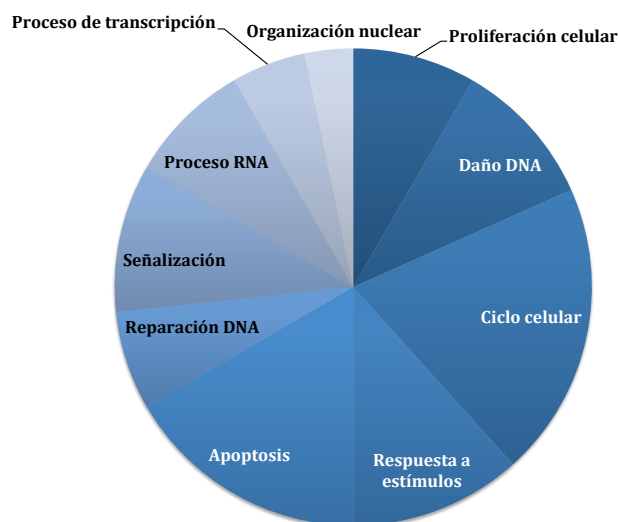


Figura IV.17: Funciones biológicas de las proteínas nucleares alteradas en células HepG2 expuestas a AgNP10 (*Gene Ontology* database).

La exposición a AgNP10 afectó principalmente a proteínas implicadas en la replicación, daño y reparación del ADN, proliferación celular, ciclo celular, apoptosis, mecanismos de defensa celulares o a la organización nuclear. El nucleolo es la estructura más prominente del núcleo de

la célula; es el sitio donde ocurre la transcripción del ARN ribosómico (ARNr), procesamiento previo al ARNr y ensamblaje de la subunidad del ribosoma. La proteína NOLC1 se encontró alterada en este experimento y está involucrada en el proceso de nucleogénesis y la transcripción del gen de rRNA (Chiu *et al.*, 2002). Una inhibición de la misma ($R_{\text{silac}} = -1,49$) induce la detención de la biogénesis de los ribosomas (Hein *et al.*, 2013) dando lugar al estrés nuclear (James *et al.*, 2013). De acuerdo con estos resultados, similares a los encontrados en el estudio SILAC anterior, se encontraron una serie de proteínas involucradas en el daño del DNA. Entre ellas, se encontraron las proteínas MCM7 ($R_{\text{silac}} = -3,70$) y MCM3 ($R_{\text{silac}} = -1,85$). Ambas pertenecen a la familia de proteínas de mantenimiento de los mini-cromosomas (MCM), que son clave para la replicación previa del ADN y sirven como marcadores para la proliferación celular (Giaginis *et al.*, 2010; Ishimi, 2018). La inhibición de tales proteínas provoca una detención en el ciclo celular, específicamente en la fase G1, que impide la replicación del ADN (Bai *et al.*, 2016). Asimismo, la proteína CBFb ($R_{\text{silac}} = -5,55$), juega un papel crítico tanto en el proceso de embriogénesis como en el de hematopoyesis (Kundu *et al.*, 2002) y se encontró altamente inhibida. Dicha proteína no se une al ADN directamente; sin embargo, induce un cambio conformacional en la proteína RUNX1, que provoca un aumento en su capacidad de unión al ADN y evita que se descomponga (Zhang *et al.*, 2003). La proteína cullin 4B (CUL4B) ($R_{\text{silac}} = -1,56$) controla el inicio de la replicación del ADN, entre otras funciones clave. Esto sugiere que CUL4B actúa como un “guardián del genoma” para protegerlo de la replicación incontrolada. Por tanto, las células deficientes en CUL4B se replican continuamente durante el mismo ciclo celular, ya que controla la proteína CDT1, necesaria para el inicio de la replicación del ADN, al degradarla. Cuando CDT1 no se degrada, la replicación del ADN ocurre continuamente (Courtney *et al.*, 2011). Ciertas proteínas ribosómicas como, por ejemplo, la proteína RPS27A ($R_{\text{silac}} = +1,58$) desempeña un papel crítico en la coordinación de la señalización de p53 con la biogénesis ribosómica. La sobreexpresión de esta proteína produce la degradación de p53 mediada por MDM2, lo que conduce a la detención de la biogénesis ribosómica y, por tanto, produce daño al ADN, así como la detención del ciclo celular (Nosrati *et al.*, 2015). También se encontraron proteínas sobreexpresadas como causa de un intento de reparación del ADN dañado. Entre ellas, se encuentra la ADN metiltransferasa 1 (DMP1) ($R_{\text{silac}} = +2,66$), co-represor que estimula la metilación del ADN en los sitios de reparación de rotura de la doble cadena (Lee *et al.*, 2010); la proteína reguladora SWI/SNF (SMARCD1) ($R_{\text{silac}} = +1,74$) que desempeña un papel en la reparación (Chai *et al.*, 2005) y la replicación del ADN (Cohen *et al.*, 2010) y la proteína histona H2A (HIST1H2AA) ($R_{\text{silac}} = +1,58$). Las histonas juegan un papel central en la regulación de la transcripción, la reparación y la replicación del ADN así como en la estabilidad cromosómica.

Por otro lado, se encontraron alteradas ciertas proteínas de unión al ARN. Por ejemplo, la proteína TRA2B ($R_{\text{silac}} = -2,27$), la cual presenta diversas funciones en la expresión génica. Por ejemplo, Kuwano *et al.* 2015 estudió que una inhibición de dicha proteína en células HCT116 disminuía la expresión de Bcl-2 provocando apoptosis. La proteína EIF3 ($R_{\text{silac}} = -1,96$), componente del complejo del factor de iniciación eIF-3, se necesita para iniciar la síntesis de proteínas y la traducción del ARN mensajero (ARNm) implicado en la proliferación celular, ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Marchione *et al.*, 2013). A su vez, la proteína ARN helicasa dependiente de ATP DDX3X (DDX3) ($R_{\text{silac}} = -1,63$), está relacionada con la proteína EIF3 para promover la traducción de los ARNm seleccionados. Una reducción de la expresión de DDX3 causa una disminución de la proliferación celular y provoca cambios en la expresión de la ciclina D1 y p21, proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular (Lee *et al.*, 2008). Asimismo, la proteína de unión al ARN (RBM15), ligeramente sobreexpresada ($R_{\text{silac}} = +1,58$), está relacionada con las proteínas DBP5 y NXF1, esta última encontrada inhibida ($R_{\text{silac}} = -1,96$) en este experimento. La unión de ambas proteínas es necesaria para la exportación eficiente del ARNm desde el núcleo al citoplasma (Müller-McNicoll *et al.*, 2016). El factor de transcripción AP-1 ($R_{\text{silac}} = -2,22$), participa en una amplia variedad de procesos celulares, incluido el crecimiento celular, la diferenciación celular y la apoptosis (Hernández *et al.*, 2008). Autores como Shaulian & Karin, 2001 mostraron que el complejo AP-1 controla la viabilidad y muerte celular a través de su capacidad de regular la expresión de supresores tumorales, tales como p53, p21 y p16. Holmstrom *et al.*, 2008, demostraron que una inhibición de AP-1 provoca una disminución de la proteína DDX21, inhibida en este experimento ($R_{\text{silac}} = -1,56$) y, como consecuencia, una inhibición de la progresión del ciclo celular en la fase G/S. Por tanto, estos datos sugieren que la alteración del ciclo celular provocado por la inhibición del factor AP-1 puede deberse a su interferencia con la función de la proteína DDX21.

Considerando la relación entre el ciclo celular y la apoptosis, no es sorprendente que algunas de las proteínas que se encontraron afectadas por la exposición a AgNP10 estén relacionadas con la regulación del ciclo celular. Por ejemplo, CDK1 es una proteína quinasa que juega un papel importante en el control del ciclo celular, concretamente en la transición de la fase G2/M y la mitosis. Varios estudios han demostrado el papel relevante de CDK1 en algunas formas de apoptosis (Sánchez-Cabezas *et al.*, 2016). Por lo tanto, una sobreexpresión de la misma ($R_{\text{silac}} = +1,60$) promovería la entrada y progresión de la mitosis celular. Un grado de sobreexpresión similar se encontró para la proteína RNF2 (E3 ubiquitina-proteína ligasa RING2) ($R_{\text{silac}} = +1,71$), la cual está involucrada en la vía de ubiquitinación de proteínas. La degradación mediada por ubiquitina regula muchos procesos celulares, incluida la progresión del ciclo celular, la diferenciación o la transducción de señales. Dicha proteína se activa en respuesta al estrés

oxidativo ya que controla la expresión de genes que están involucrados en la desintoxicación y eliminación de ROS, mejorando así la capacidad antioxidante celular (Nguyen *et al.*, 2009).

En este experimento se ha mostrado también sobreexpresión de ciertas proteínas como resultado de la activación de mecanismos de defensa contra el efecto tóxico de las AgNP10. Tal es el caso de las proteínas de choque térmico (HSP), las cuales constituyen un grupo de proteínas chaperonas que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas, así como la protección del proteoma contra el estrés (Stricher *et al.*, 2019). Así, la proteína HSPA9 se encontró altamente sobreexpresada ($R_{\text{silac}} = +1.89$) lo que sugiere que la exposición a AgNP10 induce estrés celular y, por tanto, provoca respuestas protectoras celulares como mecanismo de defensa contra dicho efecto. Otros estudios mostraron un aumento de la regulación de HSP en células expuestas a AgNPs (Foldbjerg *et al.*, 2012; Kawata *et al.*, 2009). Varios tipos de ribonucleoproteínas nucleares (hnRNP), concretamente HNRNPC ($R_{\text{silac}} = +2.90$), HNRNPD ($R_{\text{silac}} = +1.92$), HNRNPLL ($R_{\text{silac}} = +1.72$) y HNRNPUL2 ($R_{\text{silac}} = +1.69$) también se encontraron sobreexpresadas. Este tipo de proteínas ayudan a controlar la maduración de los ARN nucleares recién formados en ARNAm, lo estabilizan durante su transporte celular y controlan su traducción. Además, esta familia de proteínas juega un papel importante en la reacción de sumoilación como un elemento clave en la respuesta al daño del ADN desencadenada por p53, actuando como cofactor de p53 en respuesta al daño del ADN (Chaudhury *et al.*, 2010). Otra proteína que actúa como respuesta es la histona acetiltransferasa (HBO1), que juega un papel crucial en la replicación de ADN y la proliferación celular (Zou & Mallampalli, 2013) y que también apareció sobreexpresada en el experimento ($R_{\text{silac}} = +2.63$). En células humanas, HBO1 es necesaria para el ensamblaje pre-replicativo previo durante la fase G1 y durante la fase S se requiere para activar la replicación del ADN. Por ejemplo, Chen *et al.* 2020, mostraron que una sobreexpresión de esta proteína en células epiteliales promueve la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y mejora la acetilación de la proteína H3K14, lo que implica una prevención de la apoptosis. De igual forma ocurre con el factor de transcripción JUND, ligeramente sobreexpresado tras la exposición a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = +1.88$), que actúa protegiendo a las células de la senescencia dependiente de p53 y de la apoptosis.

Por último, cabe destacar algunas proteínas que actúan como mecanismo de defensa a través de la proteína c-Myc, que desempeña un papel fundamental en la progresión y arresto del ciclo celular. Por ejemplo, la proteína prohibitina 2 (PHB2), perteneciente a la familia de las prohibitinas (PHB), está involucrada en múltiples funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético, la proliferación, la apoptosis y la senescencia (Peng *et al.*, 2015). Concretamente, PHB regula en el núcleo la activación transcripcional y el ciclo celular. Una

sobreexpresión de PHB2 ($R_{\text{silac}} = +2.23$) induce la regulación positiva de la proteína c-Myc. De la misma forma, la proteína RACK 1 ($R_{\text{silac}} = -1.51$) juega un papel esencial en la regulación de varias vías de señalización involucradas en muchos procesos biológicos clave. Una inhibición de dicha proteína activa la señalización a través de la proteína tirosina quinasa (Src), induce la proteína c-Myc y ciclina D1 y acelera la progresión del ciclo celular en la fase G1/S (Mamidipudi *et al.*, 2007).

Todos estos resultados obtenidos en los ensayos bioanalíticos demuestran que el tamaño de las AgNPs puede inducir la activación de mecanismos biomoleculares únicos y, por lo tanto, efectos particulares que no serían activados por las mismas AgNPs de tamaño de partícula diferente. Incluso los efectos observados tras la exposición cuando se usan diferentes tamaños pueden ser inducidos por diferentes vías. Asimismo, se confirma que las AgNP10, debido a su pequeño tamaño, son capaces de internalizar en el núcleo, producir estrés nuclear y daño al ADN y, como consecuencia, activar mecanismos de reparación del ADN dañado. Por lo tanto, todos los estudios realizados en este primer apartado ponen de relieve el papel que juega el tamaño de las AgNPs en su potencial citotóxico en un sistema *in vitro*. Estos resultados, además, concuerdan con los obtenidos por otros autores. Por ejemplo, Carlson *et al.* 2008, observaron un aumento de la apoptosis en la producción de citoquinas y quimiocinas (IL-8, IL-1BETA), en el factor de necrosis (TNF-alfa) y una producción de ROS en macrófagos tratados con AgNPs de menor tamaño (4 nm) en comparación con tamaños mayores (20 y 70nm). Gliga *et al.* 2014 evaluaron la actividad citotóxica dependiente del tamaño de las AgNPs de 10 nm recubiertas con PVP y AgNPs de 10, 40 y 75 nm revestidas con citrato en células humanas de pulmón (BEAS-2B). Estos resultados revelaron que tanto las AgNPs de 10nm recubiertas con citrato como las recubiertas con PVP a concentraciones de 20 y 50 mg.L⁻¹ durante 24 h, inhibieron la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana celular. Sin embargo, no se observaron efectos citotóxicos en las de mayor tamaño (40 y 75 nm). Se observó una citotoxicidad dependiente del tamaño similar en otros estudios *in vitro* (Liu *et al.*, 2010a; Mishra *et al.*, 2016; Ávalos *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020).

IV.2. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA BASADA EN LA-ICP-MS PARA EL ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE METALES EN LARVAS DE PEZ CEBRA

El interés por el estudio de la distribución elemental, fundamentalmente de metales de transición, en muestras biológicas para estudios de toxicidad ha ido en progresivo aumento en estos últimos años (Pozebon *et al.*, 2017; Hsiao *et al.*, 2019; Sartori *et al.*, 2020). Hoy en día, conseguir un análisis cuantitativo robusto por LA-ICP-MS es un objetivo prioritario pero aún

difícil de alcanzar. La cuantificación de elementos traza por ablación láser, al igual que en otras técnicas, requiere de una calibración adecuada y de materiales de referencia certificados. Sin embargo, en la actualidad obtener dichos materiales para todo tipo de muestras sólidas, especialmente biológicas, sigue siendo un reto, lo que implica que el estudio de metodologías que permitan realizar una correcta calibración y cuantificación sea de sumo interés. Por esta razón, se desarrolló un método de calibración que nos permitiera evaluar la captación y distribución de una mezcla de metales (Ag, Cd y Hg) en larvas de pez cebra.

IV.2.1. Verificación del equipo LA-ICP-MS

Antes de llevar a cabo cualquier optimización es necesario comprobar que el equipo funciona correctamente. Para ello, se empleó un material de referencia certificado (BCR 664), descrito en la sección III.7.a. de Materiales y métodos. Esta matriz es completamente distinta a la que presenta la muestra biológica de interés (larvas de pez cebra), por lo que los resultados no fueron extrapolables. La elección de este CRM fue debido a la inexistencia de materiales certificados de composición similar a la matriz biológica empleada en nuestro estudio, y tan solo se pretendía comprobar que los parámetros del acoplamiento LA-ICP-MS estaban correctamente sintonizados en términos de sensibilidad y calibración de masas. Como ya se explicó en la sección de Materiales y métodos, se prepararon varias secciones del CRM y se fueron modificando los parámetros experimentales hasta obtener la máxima sensibilidad en los dos isótopos monitorizados (^{206}Pb y ^{111}Cd) y una RSD < 10% entre las distintas secciones, con un total de 9 medidas en todos los cortes, tal y como se recoge en la **Tabla IV.5**. Los parámetros seleccionados para obtener estos valores óptimos fueron: frecuencia de ablación (20 Hz), tamaño de cráter (200 μm) y velocidad de ablación (200 $\mu\text{m.s}^{-1}$).

Tabla IV.5. Análisis del CRM BCR 664 mediante LA-ICP-MS para los isótopos ^{111}Cd y ^{206}Pb .

^{111}Cd	Media (cps)	RSD (%)	^{206}Pb	Media (cps)	RSD (%)
Corte 1	36.869	4,3	Corte 1	4.240.438	7,2
Corte 2	34.634	6,7	Corte 2	3.634.858	5,7
Corte 3	30.087	6,5	Corte 3	3.447.993	4,7

Otra de las comprobaciones necesarias que se llevaron a cabo en el equipo LA-ICP-MS, fue la calibración de masas. Este proceso se realiza generalmente con una disolución conocida denominada “tune”. En este caso, no se pudo realizar esta calibración ya que no se trabaja en medio acuoso, y se obtiene una señal transitoria, por lo que se realizó un estudio comparativo

de las relaciones isotópicas para $^{111}\text{Cd}/^{112}\text{Cd}$ y $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ experimentales con la relación de las abundancias relativas naturales. Se tomaron estos dos elementos para hacer dicha comprobación, ya que cubre el rango de masas en el que se quiere trabajar y entre otras razones porque son isótopos, en principio, libres de interferencias en la matriz del CRM empleado. Los resultados reflejaron unos valores del 2% de RSD en la relación isotópica del $^{111}\text{Cd}/^{112}\text{Cd}$ y de un 6% para el $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$.

IV.2.2. Optimización de los parámetros experimentales del acoplamiento LA-ICP-MS

Se decidió emplear, siguiendo el procedimiento experimental explicado en la sección III.7.b. de Materiales y métodos, una gelatina de pescado comercial (Bloom 200), y una mezcla de Ag, Cd y Hg en gelatina en el rango de concentraciones 0,1-2 mg.L⁻¹ para evaluar la sensibilidad, la homogeneidad y el rango dinámico del equipo en la matriz empleada.

Para llevar a cabo los análisis sobre las muestras de larvas de pez cebra se debieron optimizar previamente los parámetros de ablación, ya que la matriz es completamente distinta a la del CRM (BCR 664), fundamentalmente porque el material de referencia, además de ser un material más duro, presenta un grosor mucho mayor que la fina capa de gelatina depositada.

En primer lugar, se ensayó una primera forma de deposición de la gelatina que consistió en verter, con una pipeta, 50 µL de la gelatina caliente directamente sobre el portamuestras de vidrio. Sin embargo, al aplicar las mismas condiciones que para el BCR 664, se comprobó cómo el láser destruyó el portamuestras. Estos resultados, hasta cierto punto esperables, pusieron de manifiesto la necesidad de optimizar los parámetros del láser para cada muestra. Por ello, se cambiaron las condiciones a un tamaño de cráter final de 50 µm, una velocidad de ablación de 50 µm.s⁻¹ y una frecuencia de 10 Hz, consiguiendo así una sensibilidad razonable y evitando la perforación del portamuestras. Sin embargo, los estudios de reproducibilidad mostraron valores muy deficientes (> 20%), lo que se explica por la irregular distribución de la gelatina en el portamuestras. Por esta razón, se ideó otra forma de depositar la gelatina de forma que quedase fijada sobre una superficie más definida para así poder conseguir una buena homogeneidad. Para ello, se elaboraron unos pequeños pocillos sobre una cinta adhesiva, la cual se pegó sobre el portamuestras y este, a su vez, sobre la celda de ablación (**Figura IV.18**). La gelatina, con la correspondiente concentración de cada elemento, se adicionó en caliente sobre cada pocillo. Tras 24 h de espera, la muestra se encontraba lista para ser analizada.

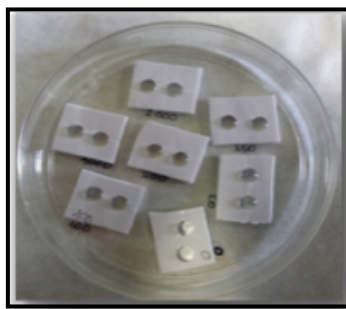


Figura IV.18. Pocillos sobre cinta adhesiva empleados para las medidas mediante LA-ICP-MS.

Los primeros ensayos, por tanto, trataron de modificar la frecuencia de ablación entre 10 Hz y 20 Hz para obtener una posible mejora en la sensibilidad, lo que ocurrió de forma drástica para el caso de la Ag y el Hg (se obtuvo una sensibilidad de casi el doble al pasar de 10 a 20 Hz) y de un 30% para el Cd. Además, los resultados mostraron que, utilizando 20 Hz con esta forma de deposición de la muestra, el láser no incidía sobre el portamuestras. Asimismo, con esta estrategia se consiguió una distribución mucho más homogénea obteniéndose valores de RSD menores del 5% en comparación con los que se obtenían con la deposición directa (**Figura IV.19**). Por último, se obtuvo una capa más gruesa de la misma, permitiendo así utilizar una frecuencia de ablación mayor y, de esta forma, poder aumentar la sensibilidad. En base a todo esto, se seleccionaron los pocillos como forma óptima para depositar la gelatina.

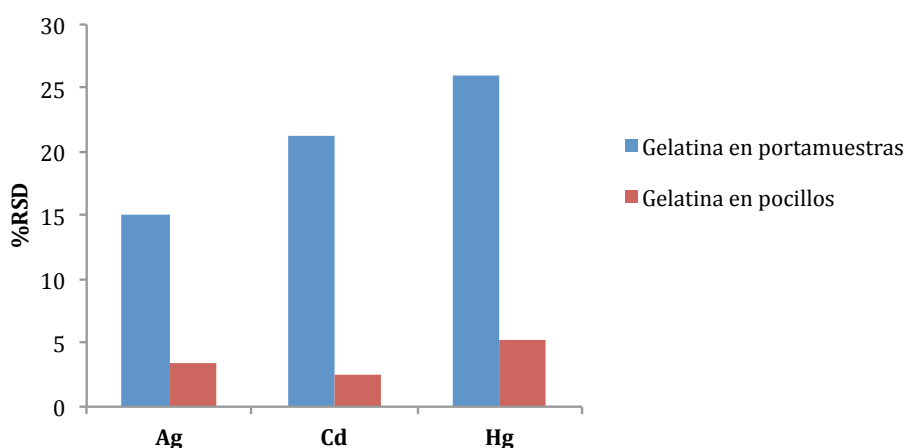


Figura IV.19. Representación gráfica de los RSD de los isótopos ^{107}Ag , ^{111}Cd y ^{202}Hg para muestras de gelatina depositadas en pocillos o directamente en el portamuestras. $[\text{Ag}, \text{Cd}, \text{Hg}] = 50 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Una vez seleccionada la frecuencia de ablación, se optimizó el tamaño del cráter y la velocidad de barrido. Ambos parámetros se optimizaron entre los valores de 25 y 50 μm para el tamaño

de cráter, y de 25 y 50 $\mu\text{m.s}^{-1}$ para la velocidad de barrido. La **Figura IV.20** muestra que cuanto mayor era el tamaño de cráter y la velocidad de ablación, mayor era también la sensibilidad alcanzada, ya que la cantidad de material ablacionado también era mayor. En cuanto a la homogeneidad, expresada en términos de RSD, fue muy parecida para ambas condiciones, siendo menor del 5%. Sin embargo, hay que señalar que a pesar de que se obtiene una mayor sensibilidad con valores de 50 μm de tamaño de cráter y 50 $\mu\text{m.s}^{-1}$ de velocidad de ablación, los valores seleccionados para los siguientes estudios fueron 25 μm y 25 $\mu\text{m.s}^{-1}$ ya que, como se verá más adelante, para obtener una buena resolución de las imágenes fue necesario utilizar valores de tamaño de cráter menores con el fin de poder ablacionar un mayor número de líneas. Por tanto, se llegó a una situación de compromiso en la que se pudieran obtener imágenes con una buena calidad y a su vez obtener suficiente sensibilidad para poder desarrollar una estrategia de semi-cuantificación óptima.

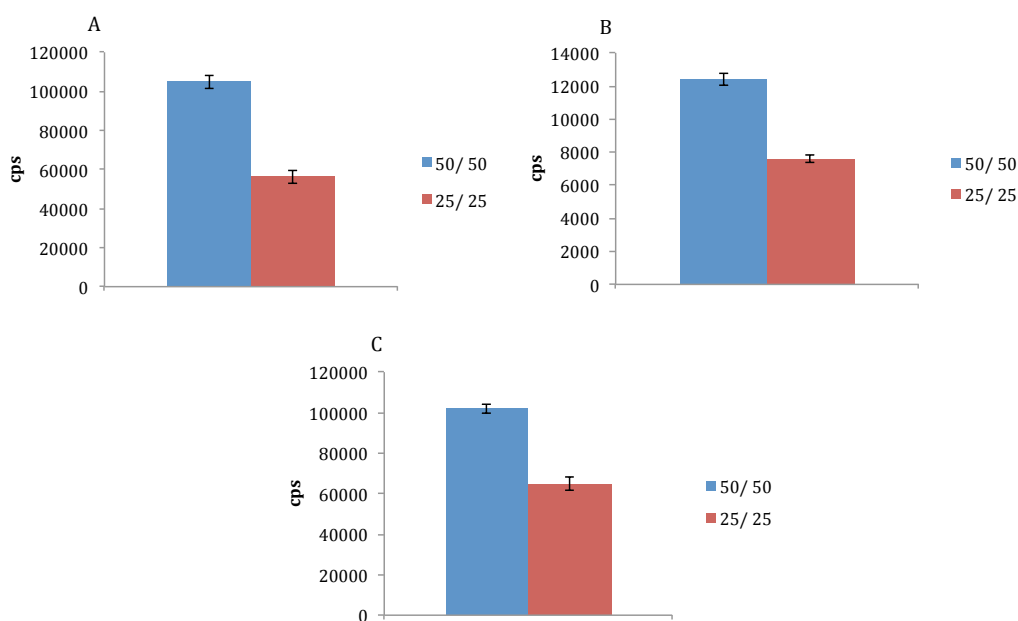


Figura IV.20. Representación gráfica de los isótopos A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg adicionados a gelatina depositada sobre pocillos. Tamaño de cráter: 50 μm (azul); 25 μm (rojo); Velocidad de ablación: 50 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (azul); 25 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (rojo). Frecuencia: 20 Hz. $[\text{Ag}, \text{Cd}, \text{Hg}] = 50 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Otra comprobación necesaria fue la de validar si la homogeneidad se mantenía en toda la superficie del pocillo, tanto en el centro como en los bordes, para evitar que no se produjera la formación de gradientes de composición a causa de la evaporación preferencial de alguno de los componentes, lo que generaría sitios más concentrados y por lo tanto con mayor o menor tensión. Este fenómeno es conocido como efecto Marangoni (Sala *et al.*, 2017). Los análisis se llevaron a cabo por duplicado en dos patrones de diferente concentración (50 y 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$),

realizando para cada una de ellos 5 líneas de ablación en el centro del pocillo y 5 líneas de ablación en los extremos, obteniendo así un total de 20 valores por cada muestra de gelatina. Finalmente con todos estos valores se calculó la homogeneidad.

La **Figura IV.21** muestra que los resultados obtenidos de homogeneidad resultaron ser aceptables para ambas concentraciones, con un 5% de variación para la Ag y el Cd; en el caso del Hg, se apreció una variación más elevada, en torno a un 10%, debido a que es un elemento con una elevada presión de vapor y presenta efecto memoria, lo que hace que la señal fluctúe en mayor medida, estando a su vez más afectado por un posible efecto de fraccionamiento (Niehoff *et al.*, 2015).

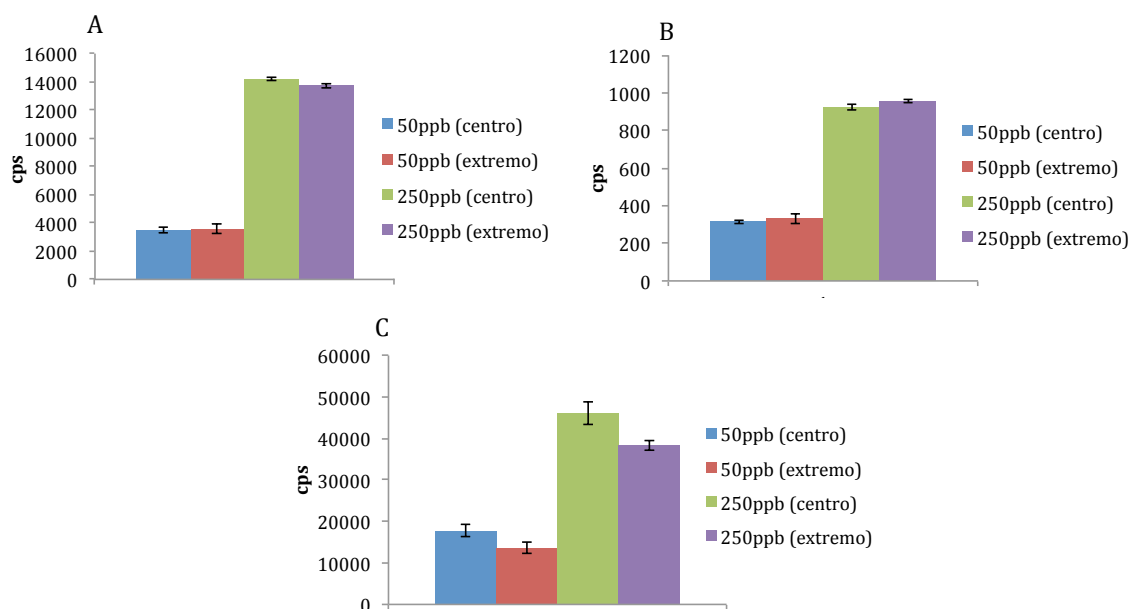


Figura IV.21. Evaluación del efecto Marangoni en dos muestras de gelatina de pescado.

A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg .

Otro parámetro que se debió evaluar para llevar a cabo el análisis mediante LA-ICP-MS fue el flujo del gas transportador. En este trabajo se utilizó una mezcla de He y Ar. La razón de utilizar una mezcla de ambos en vez de únicamente Ar fue que este último es un gas de mayor masa atómica que favorece las colisiones entre las especies del gas y entre las del gas y la nube de ablación, por lo que aumenta la formación de partículas aglomeradas y, por tanto, aumentan así las pérdidas debido a los impactos y la inercia. Sin embargo, el He es un gas más ligero con una conductividad térmica más elevada que el Ar, lo que da lugar a procesos de condensación más cortos en el plasma. Esto provoca la formación y la mejora del transporte de partículas más pequeñas produciendo un aumento de la sensibilidad (Horn *et al.*, 2003). Por ejemplo, autores

como Koch *et al.* 2004 o Luo *et al.* 2017, entre otros, demostraron que utilizando como gas transportador una mezcla de ambos gases se conseguía reducir notablemente los efectos de fraccionamiento, ya que se conseguía una mayor eficiencia en el transporte del aerosol hacia el plasma, además de mejorar la sensibilidad, especialmente en la determinación de elementos traza. Teóricamente, cuanto mayor sea el caudal del gas, mayor es la sensibilidad ya que entra una mayor cantidad de muestra al plasma. Sin embargo, un elevado flujo puede hacer también que el plasma se extinga. En este caso, se probaron diferentes flujos de He, desde 0.6 L.min⁻¹ hasta 1 L.min⁻¹, siendo 0.8 L.min⁻¹ el valor seleccionado por proporcionar mejores resultados en términos de sensibilidad, homogeneidad y estabilidad de la señal. El flujo de Ar se mantuvo constante en 1.05 L.min⁻¹, que fue el inicialmente utilizado para los ensayos mediante ICP-MS. El volumen de gelatina depositado en el pocillo también se optimizó, para lo cual se probaron tres valores diferentes: 30, 50 y 60 µL, siendo el valor seleccionado 50 µL; volúmenes más bajos formaron una capa de gelatina demasiado fina y, por tanto, el haz láser ablacionó el soporte de vidrio, mientras que volúmenes mayores provocaron una notoria falta de homogeneidad entre el centro y los bordes del pocillo, es decir, favorecieron el efecto Marangoni.

Con los parámetros finalmente optimizados para la gelatina (gas en la cámara de ablación 0,8 mL.min⁻¹ He; gas transportador al plasma 1,05 mL.min⁻¹ Ar; frecuencia 20 Hz, velocidad de barrido 25 µm.s⁻¹; tamaño de cráter 25 µm) se realizó una comparación de la señal obtenida en la gelatina de pescado y en el CRM BCR 664. Los resultados se muestran en la **Figura IV.22** para los isótopos ¹¹¹Cd y ²⁰⁶Pb: en concentración 6 mg.L⁻¹ de Cd y 50 mg.L⁻¹ de Pb tanto en el CRM BCR664 como en la gelatina, por tratarse de la concentración de estos elementos en el CRM.

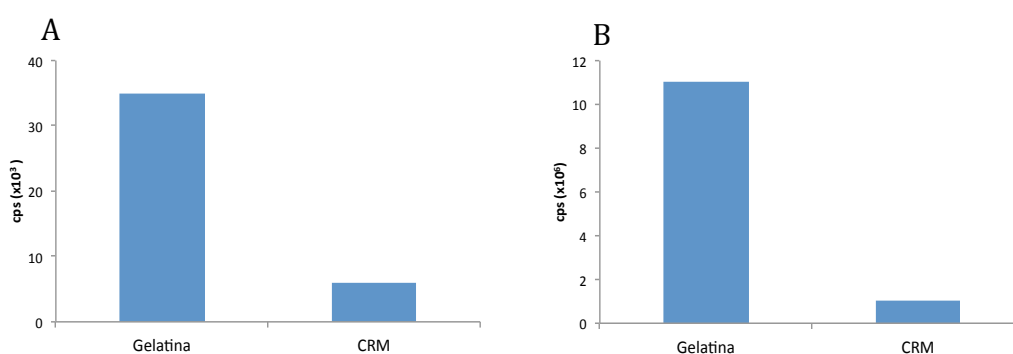


Figura IV.22. Sensibilidad (cps) en las matrices de gelatina de pescado y CRM BCR664. A) ¹¹¹Cd, B) ²⁰⁶Pb.

Los resultados demostraron claramente la importancia de optimizar los parámetros del equipo al analizar distintos tipos de muestras, ya que la sensibilidad depende mucho del tipo de matriz que está siendo ablacionada. En concreto, en este análisis se observó cómo la gelatina exhibió una mayor sensibilidad con estas condiciones de medida que el CRM, que es un vidrio,

material inorgánico mucho más duro y que, por tanto, se desprende mucha menos cantidad de analito que en la gelatina en las mismas condiciones de ablación. Aunque es un resultado esperado, nos ha parecido de interés mencionarlo aquí, ya que la optimización de los parámetros en función de la matriz es un punto clave en esta técnica.

IV.2.3. Estrategias de calibración utilizando gelatina de pescado como matriz biológica

Inicialmente, se evaluó la linealidad para los tres elementos estudiados (Ag, Cd y Hg) empleando la gelatina de pescado como matriz. Para ello, se realizó un calibrado con 7 muestras de gelatina de concentración creciente (0, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), empleando las condiciones óptimas desarrolladas en el punto anterior. Cabe destacar la dificultad intrínseca de conseguir que un calibrado se ajuste a una recta con un equipo de ablación láser, debido a todos los factores que afectan a la exactitud de la medida y que se han comentado en la Introducción y el Anexo. Entre ellos, destacan los efectos no estequiométricos que se producen durante la vaporización (fraccionamiento elemental), el transporte del aerosol ablacionado, la atomización y la ionización en el plasma. Se hicieron 7 líneas de ablación en cada pocillo, de 37 s de duración cada una, haciendo una media de todas ellas. Se analizaron 2 pocillos por muestra de gelatina, haciendo la media de ambos, y siendo este último dato el que se empleó para construir las curvas de calibrado externo. Estas curvas de calibrado además, se midieron en dos días diferentes, tal y como aparece reflejado en la **Figura IV.23**.

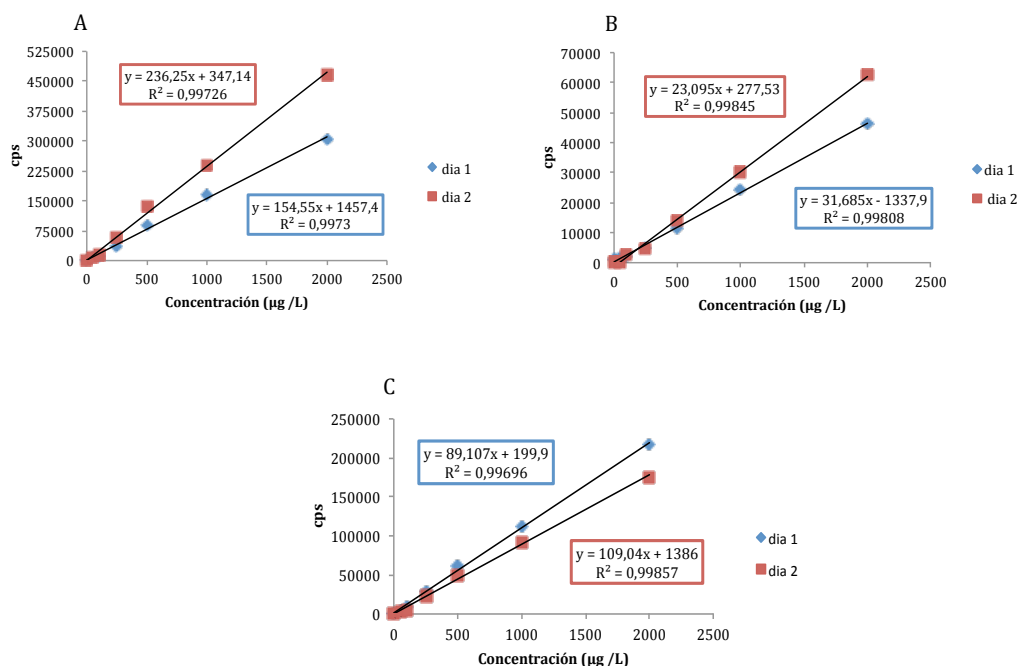


Figura IV.23. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

Los resultados obtenidos presentaron una buena linealidad con un coeficiente de correlación (R^2) mayor a 0,99 en todos los casos. Sin embargo, se observó una variación significativa en la pendiente al hacer el calibrado en distintos días. Estos resultados sugirieron, por tanto, la idoneidad de realizar una calibración interna para corregir así posibles variaciones en la ablación, transporte del aerosol, cambios en el dispositivo láser o en las condiciones del ICP-MS (obstrucción de los conos, condiciones de vacío u otros problemas).

Un patrón interno (PI) óptimo debe comportarse de forma similar al analito durante el proceso de ablación, durante el transporte y en el proceso de ionización, pero a su vez, debe ser un elemento que no se encuentre en la muestra a concentración detectable y debe tener una masa y un potencial de primera ionización similares al del elemento bajo estudio. Con estas exigencias se busca que los iones de ambas especies (el PI y el elemento estudiado) tengan un nivel de ionización similar en el plasma, y un comportamiento parecido en el sistema de filtrado hacia el analizador (Bonta *et al.*, 2014). Un PI que ha sido ampliamente utilizado en ablación láser cuando se trabaja con tejidos biológicos es el ^{13}C (Becker *et al.*, 2008; Austin *et al.*, 2011). Sin embargo, esta señal no es completamente fiable ya que el ^{13}C atmosférico también puede contribuir a la señal y generalmente se distribuye de manera heterogénea a través de las muestras. Además, el carbono tiene un alto potencial de ionización (11,26 eV) y, por lo tanto, una menor eficiencia de ionización (Bonta *et al.*, 2015) en comparación a los metales Ag, Cd y Hg. Estos inconvenientes ya fueron mencionados de forma más detallada en la introducción, y, por estas razones se descartó su uso como PI.

Teniendo esto en cuenta, se decidió probar con el indio (In), ya que es un metal altamente ionizable, y es un elemento comúnmente utilizado como PI en ICP-MS. Al adicionarlo a la gelatina de pescado se obtuvieron buenos resultados en la corrección de los elementos estudiados, tal y como muestra la **Figura IV.24**.

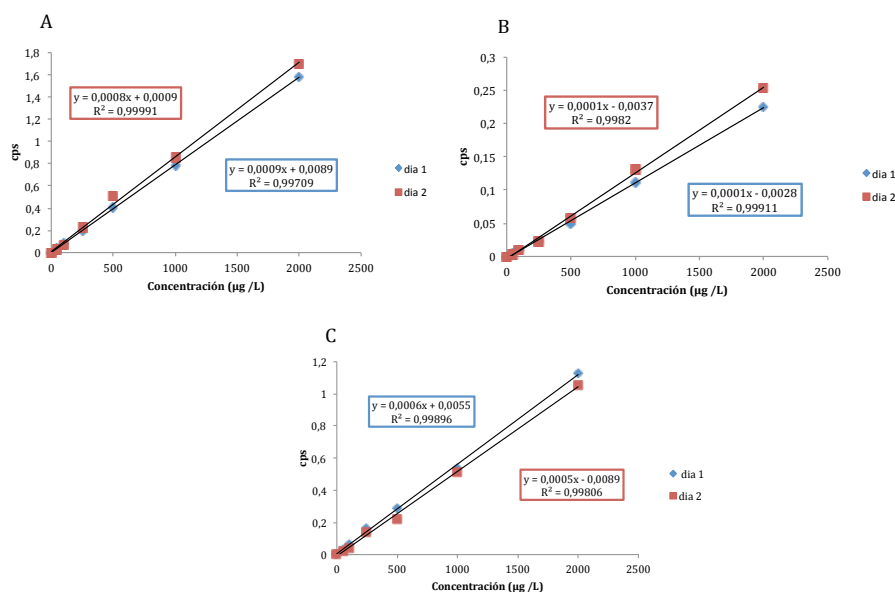


Figura IV.24. Rectas de calibrado de patrón interno (In como PI) de los isótopos A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

Sin embargo, cuando se adicionó a una muestra de larva control, se observó que la señal no permanecía constante ni homogénea. Esta situación podría deberse a una interferencia isobárica con el isótopo ^{115}Sn que podría estar interfiriendo en las medidas, ya que con el ICP-MS empleado no es posible diferenciar entre isótopos con una diferencia masa/carga (m/z) menor de la unidad. Por ello, se decidió buscar otra alternativa como PI. Autores como Konz *et al.* 2013, y muchos otros han descrito estrategias basadas en depositar una delgada capa de oro metálico (sputtering) sobre la superficie de la muestra, y utilizar la señal del ^{197}Au para la normalización de la señal mostrando resultados satisfactorios. Por tanto, se decidió probar con el oro metalizado tras comprobar que tiene un potencial de ionización (9.23 eV) comparable a los elementos de interés (7.58 eV, 8.99 eV y 10.44 eV para Ag, Cd y Hg, respectivamente). Para evaluar la idoneidad de este procedimiento, es necesario comprobar que este método crea capas metálicas homogéneas sobre la superficie de la muestra. Por esta razón, se optimizaron dos variables muy influyentes en la deposición catódica que son la intensidad de corriente y el tiempo de metalización. Para la intensidad de corriente se probaron cuatro valores diferentes: 15, 20, 30 y 40 mA, y cada uno de ellos se probó durante un tiempo de 20, 30, 40 y 60 s. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando una intensidad de corriente de 30 mA durante 40 s, consiguiendo así una señal más homogénea en la gelatina. Con estas condiciones se llevaron a cabo calibrados en la gelatina de pescado recubierta con oro metalizado. En las **Figuras IV.25** y **IV.26** se muestran los calibrados externos y los calibrados de patrón interno en dos días diferentes, comparándose las pendientes obtenidas para cada uno de ellos.

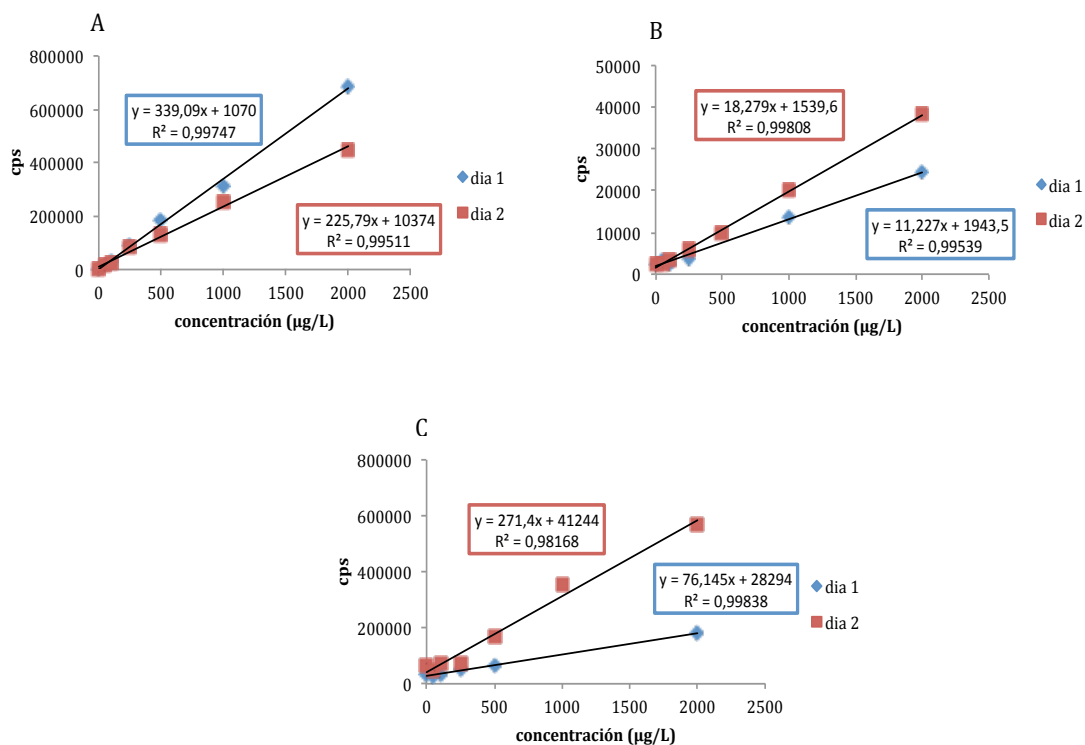


Figura IV.25. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

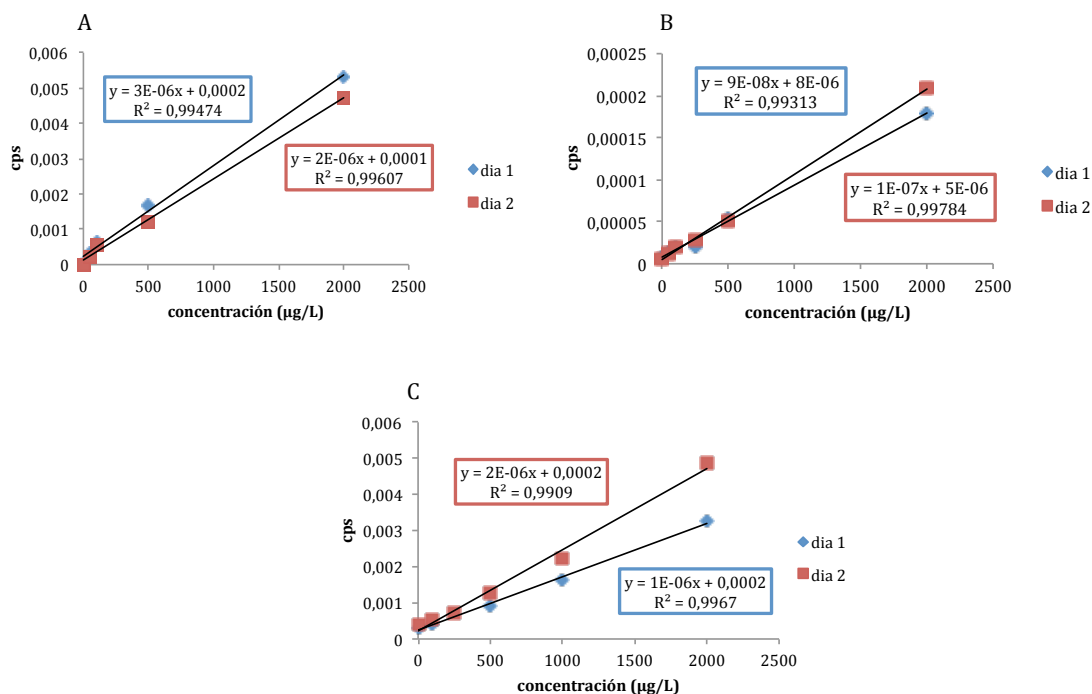


Figura IV.26. Rectas de calibrado interno (Au metalizado como PI) de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

Nuevamente, la linealidad fue buena en todos los casos. Al comparar ambos tipos de calibrados, se observó una clara mejoría en la calibración con patrón interno para la Ag, obteniéndose pendientes comparables estadísticamente (**Tabla IV.6**). El Cd y el Hg, sin embargo, mostraron pendientes significativamente diferentes para distintos días, aún empleando el Au metalizado como PI con una probabilidad (valor de p) muy inferior a 0.05 (considerando un nivel de significación del 95%), lo que indica que para estos elementos la corrección no fue adecuada. En el caso del Hg fue más notoria la diferencia, lo que llevó a plantear que pudiera haber sucedido una amalgama entre el Au metálico y el Hg de la gelatina, ya que el Hg tiene una gran afinidad por el Au, con el que combina fácilmente y produce una amalgama cuando hay exceso o bien de Au o bien de Hg. La cantidad de Au depositada fue elevada, por lo que esta hipótesis podría ser la causa (Hou *et al.*, 2015).

Tabla IV.6. Análisis estadístico de las pendientes de las rectas de calibración externa y de patrón interno (Au metalizado como PI) en dos días diferentes ($p \geq 0.05$).

Curvas de calibración	Externo	Oro metalizado	Externo	Oro metalizado	Externo	Oro metalizado
Ag			Cd		Hg	
1 día	154,5 ± 3,6	7,90.10 ⁻⁴ ± 3,39.10 ⁻⁶	23,1 ± 0,4	1,13.10 ⁻⁴ ± 1,51.10 ⁻⁶	109,1 ± 1,8	5,57.10 ⁻⁴ ± 8,02.10 ⁻⁶
2 día	236,2 ± 5,5	8,08.10 ⁻⁴ ± 1,48.10 ⁻⁵	42,2 ± 1,3	1,18.10 ⁻⁴ ± 1,82.10 ⁻⁶	62,4 ± 1,4	5,27.10 ⁻⁴ ± 4,48.10 ⁻⁶
P	0,0008	0,2312	0,0007	0,0833	0,0009	0,0529

Por ello, se ideó una nueva estrategia basada en la adición de Au (III) en disolución, del mismo modo que se adicionan los demás elementos en la gelatina, es decir, disolviendo el Au (III) en la gelatina líquida antes de su solidificación. En primer lugar, se realizó una optimización de la cantidad idónea de Au (III), utilizando blancos de gelatina a los cuales se les añadió este metal en distintas concentraciones, con el fin de ver cuál de ellas proporcionaba una señal más constante y homogénea. Se buscaron concentraciones que se encontrasen dentro del rango de trabajo probado para los demás elementos, es decir, entre 50 y 2000 µg.L⁻¹. Por ello, se seleccionaron tres concentraciones diferentes: 250, 500, y 1000 µg.L⁻¹ de Au (III). Las señales registradas se recogen en la **Figura IV.27**. En esta gráfica se observa cómo la estabilidad de la señal mejoró a medida que aumentó la concentración de Au (III) en disolución en la gelatina, es decir, la señal más estable se obtuvo con una concentración de 1000 µg.L⁻¹ de Au (III). Por esta razón, se seleccionó dicha concentración para construir los calibrados de patrón interno, igual que se han descrito los anteriores.

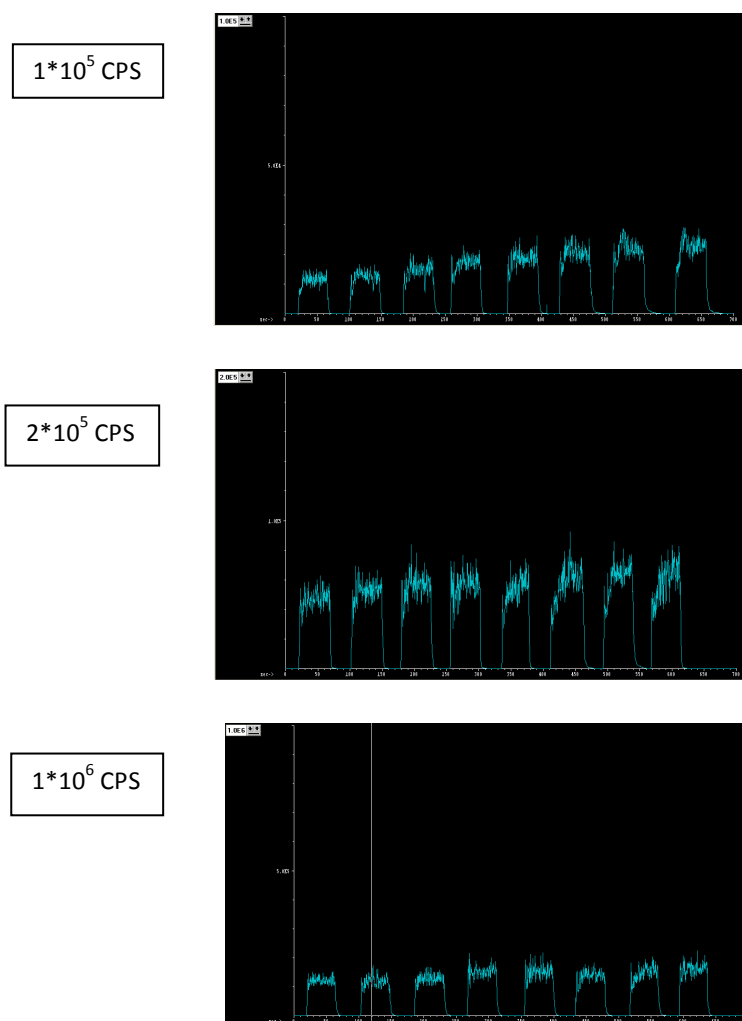


Figura IV.27. Señales (cps) de $^{197}\text{Au(III)}$ en gelatina.
A) $[\text{Au}] = 250 \mu\text{g.L}^{-1}$; B) $[\text{Au}] = 500 \mu\text{g.L}^{-1}$; C) $[\text{Au}] = 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Los calibrados externos y de patrón interno con este PI se muestran en las **Figuras IV.28 y IV.29**.

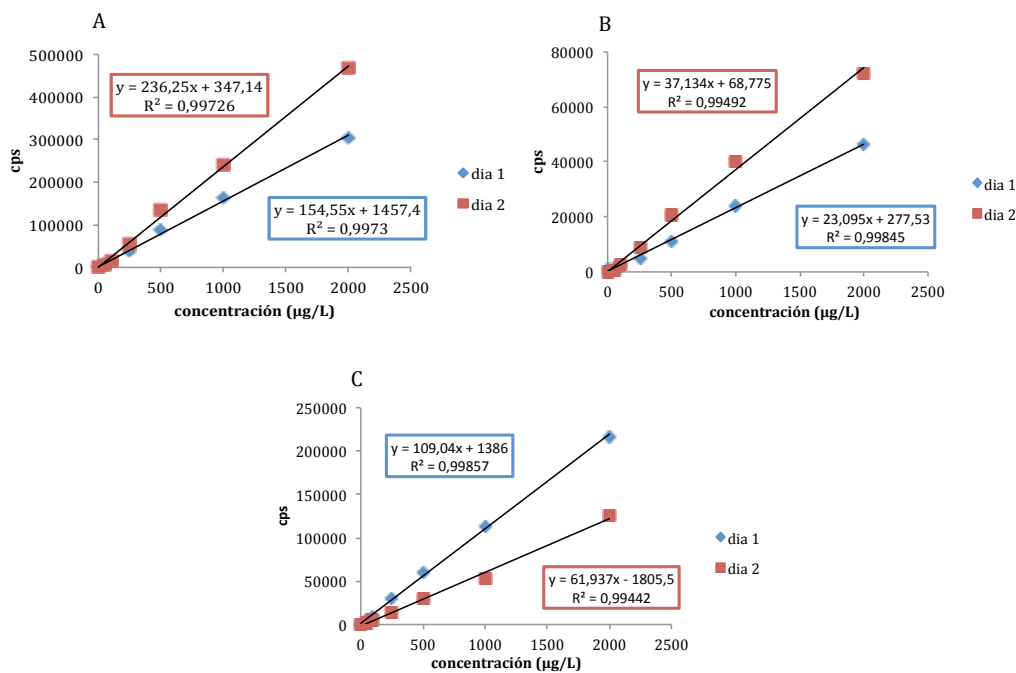


Figura IV.28. Rectas de calibrado externo de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

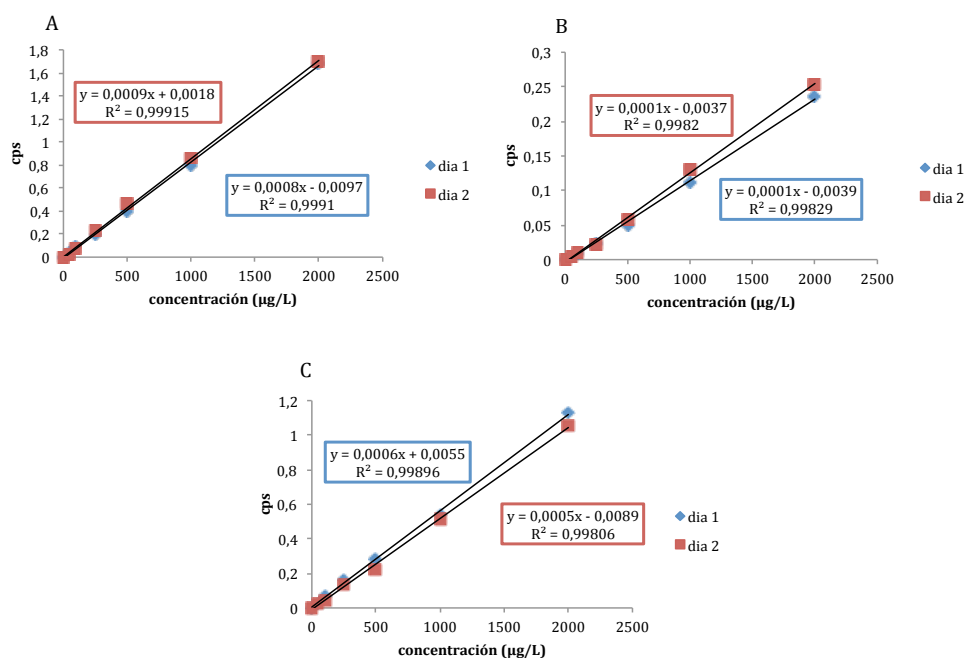


Figura IV.29. Rectas de calibrado de patrón interno (^{197}Au (III) en disolución) de los isótopos: A) ^{107}Ag , B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg en dos días diferentes.

Como se puede ver en las dos figuras anteriores, esta estrategia corrigió posibles variaciones entre 2 días consecutivos de forma mucho más eficiente que el Au metalizado. Esta apreciación

se comprobó mediante la comparación estadística de las pendientes (**Tabla IV.7**), siendo la pendiente ahora comparable para los tres elementos estudiados, con un valor de p superior a 0.05 para el calibrado de patrón interno en todos los casos.

Tabla IV.7. Análisis estadístico de las pendientes de las rectas de calibración externa y de patrón interno (AuIII como PI) en dos días diferentes ($p \geq 0.05$).

Curvas de calibración	Externo	Oro en disolución	Externo	Oro en disolución	Externo	Oro en disolución
Ag			Cd		Hg	
1 día	$154,5 \pm 3,6$	$2,56 \cdot 10^{-6} \pm 1,07 \cdot 10^{-7}$	$23,1 \pm 0,4$	$1,01 \cdot 10^{-7} \pm 2,36 \cdot 10^{-9}$	$109,1 \pm 1,8$	$2,24 \cdot 10^{-6} \pm 1,07 \cdot 10^{-7}$
2 día	$236,2 \pm 5,5$	$2,29 \cdot 10^{-6} \pm 8,32 \cdot 10^{-8}$	$42,2 \pm 1,3$	$8,56 \cdot 10^{-8} \pm 3,56 \cdot 10^{-9}$	$62,4 \pm 1,4$	$1,46 \cdot 10^{-6} \pm 4,90 \cdot 10^{-8}$
P	0,0008	0,0934	0,0007	0,0062	0,0009	0,0005

Por tanto, y a pesar de que en la bibliografía se suele utilizar el Au metalizado como estándar interno, para este estudio en concreto resultó más adecuado el uso del Au (III) en disolución por varios motivos: i) cumple su función como patrón interno corrigiendo las fluctuaciones del sistema de ablación y del ICP-MS; ii) su manipulación en el laboratorio resulta más sencilla y económica, iii) la concentración empleada es mucho más adecuada ya que la conocemos exactamente (no siendo así en el caso del la deposición de oro metalizado) por lo que los experimentos son más reproducibles; iv) el nivel de concentración empleado con la adición de Au (III) es más cercano al de los elementos analizados, por lo que las pendientes que se obtienen al dividir las intensidades son mayores, lo que implica mayor discriminación en la concentración. Por todo ello, la estrategia de calibración seleccionada en los experimentos futuros se basó en un calibrado de patrón interno, empleando Au (III) como PI a una concentración constante de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$.

IV.2.4. Estudio de estabilidad en un tiempo prolongado

Una vez evaluado y seleccionado el método de calibración, se llevó a cabo un estudio de estabilidad de la señal de los elementos y del PI, pero no sólo ablacionando una serie de líneas para la construcción de una recta de calibrado, sino simulando una muestra real, es decir, ablacionando un número más elevado de líneas consecutivas de gelatina enriquecidas con los tres elementos y el PI. El número de líneas ablacionadas se seleccionó de acuerdo al número de líneas necesarias para ablacionar una superficie equivalente a una larva completa, que oscila entre 30-40 líneas, dependiendo del tamaño de la misma. El barrido de una larva completa puede tardar hasta 3-4 h, por lo que es necesario conocer si la intensidad obtenida sufre oscilaciones importantes a lo largo de ese intervalo de tiempo. Como era de esperar, y muestra la **Figura IV.30.**, la señal no se mantuvo constante en el tiempo para ninguno de los

tres elementos, pero al hacer la corrección con la señal del ^{197}Au , se observó una evidente estabilización de la misma para la ^{107}Ag y para el ^{111}Cd . Sin embargo, para el ^{202}Hg se observó que el PI no corrigió de forma tan eficiente las variaciones de la señal. Esto es debido seguramente a que los blancos de Hg son algo elevados y en cada línea ablacionada el valor va siendo mayor debido al efecto memoria que presenta este elemento (Brown *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2020). Aún así, en todos los casos la señal se estabilizó de manera notable.

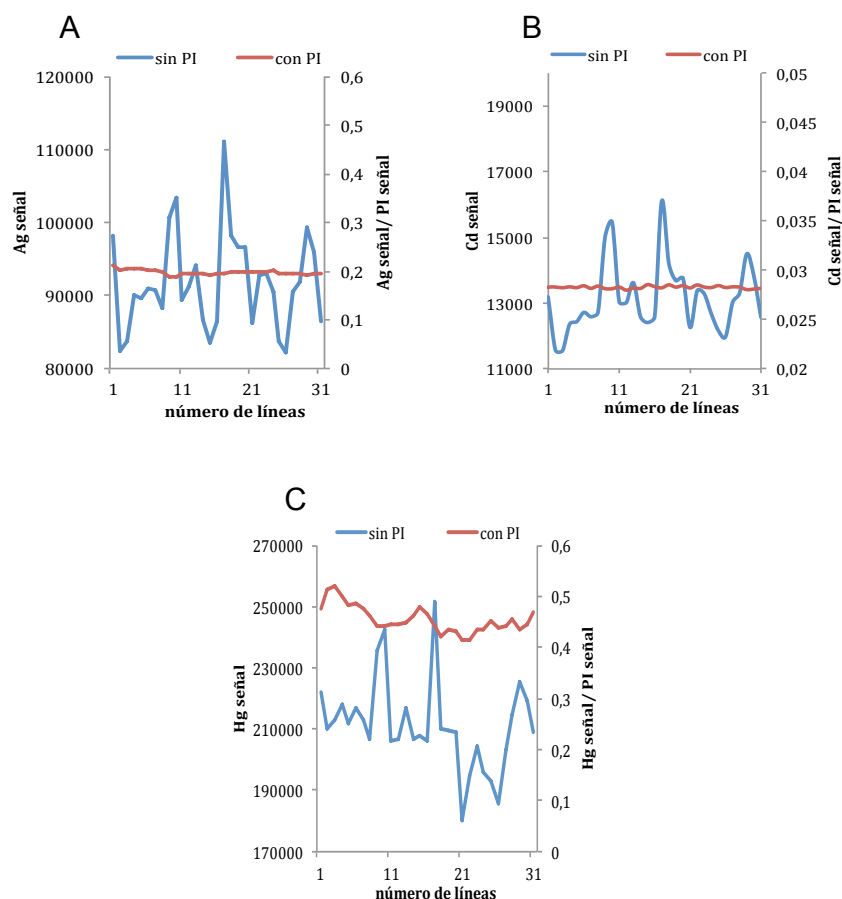


Figura IV.30. Comparación de la estabilidad de la señal (cps) para A) ^{107}Ag ; B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg , con y sin Au (III) como PI. $[\text{Ag}, \text{Cd}, \text{Hg}] = 250 \mu\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Au}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$. El eje "x" corresponde al número de líneas ablacionadas, el "y" izquierdo a los valores de intensidad sin corregir, y el eje "y" derecho a los valores corregidos con la señal del ^{197}Au .

IV.2.5. Evaluación de la eficiencia del transporte en LA-ICP-MS

La composición elemental de las partículas depende del tamaño, lo que significa que las partículas mayores se pueden depositar selectivamente en el tubo de conexión debido a la

difusión, la sedimentación gravitacional o la deposición inercial; por el contrario, pequeñas partículas pueden adherirse a la pared; finalmente, aquellas con tamaños apropiados pueden ser transportadas favorablemente hasta el plasma (Zhang *et al.*, 2016). Por este motivo, la eficiencia del transporte de masa relativa es un factor importante que debe tenerse en cuenta en cualquier método por LA-ICP-MS. Tal y como se ha explicado en la sección III.7.d. de Materiales y métodos, cada vez que se realiza un calibrado de Ag, Cd o Hg en gelatina de pescado para su posterior medida por LA-ICP-MS, se guardaron parte de las disoluciones de cada uno de los puntos del mismo para ser analizados en ICP-MS tras una digestión ácida. Estos resultados nos ayudaron a evaluar la recuperación de la cantidad de dichos metales añadidos a las disoluciones de los puntos de calibrado que se analizaron mediante esta técnica, y también para estimar el nivel de pérdida en el proceso de ablación, debido fundamentalmente al transporte desde la celda de ablación hasta el plasma; aunque también pueden influir otros motivos, que ya han sido comentados a lo largo de la memoria.

Para realizar estas medidas directas de la gelatina por ICP-MS, se desarrolló un método de digestión asistida por microondas de gelatina, en donde se estudiaron parámetros tales como el porcentaje de HNO_3 (%), la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), y el tiempo (s). Las condiciones finales elegidas se mostraron en el apartado III.7.c de Materiales y métodos. En estas condiciones, los porcentajes de recuperación de los elementos fueron $(95 \pm 7)\%$ para ^{107}Ag , $(90 \pm 7)\%$ para ^{111}Cd y $(85 \pm 10)\%$ para ^{202}Hg . En todos los casos las recuperaciones fueron cuantitativas, aunque en el caso del Hg hay una pérdida mayor por todos los problemas que este elemento acarrea en un sistema LA-ICP-MS.

A continuación, se procedió a evaluar la eficiencia del transporte de la gelatina en el acoplamiento LA-ICP-MS. Para ello, se prepararon los diferentes patrones de gelatina (0,50, 100, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y se depositaron en los pocillos correspondientes, se dejó solidificar y se midieron por LA-ICP-MS. De esas mismas muestras de gelatina, se cogió una alícuota y se digirió con el método de digestión optimizado, para posteriormente medirla por ICP-MS. De esta forma, se evaluó la correlación de las concentraciones determinadas por las mediciones LA-ICP-MS e ICP-MS tras la digestión ácida, mediante la comparación de las señales obtenidas por ambos equipos para cada uno de los puntos. La correlación entre ambos se muestra en la **Figura IV.31**.

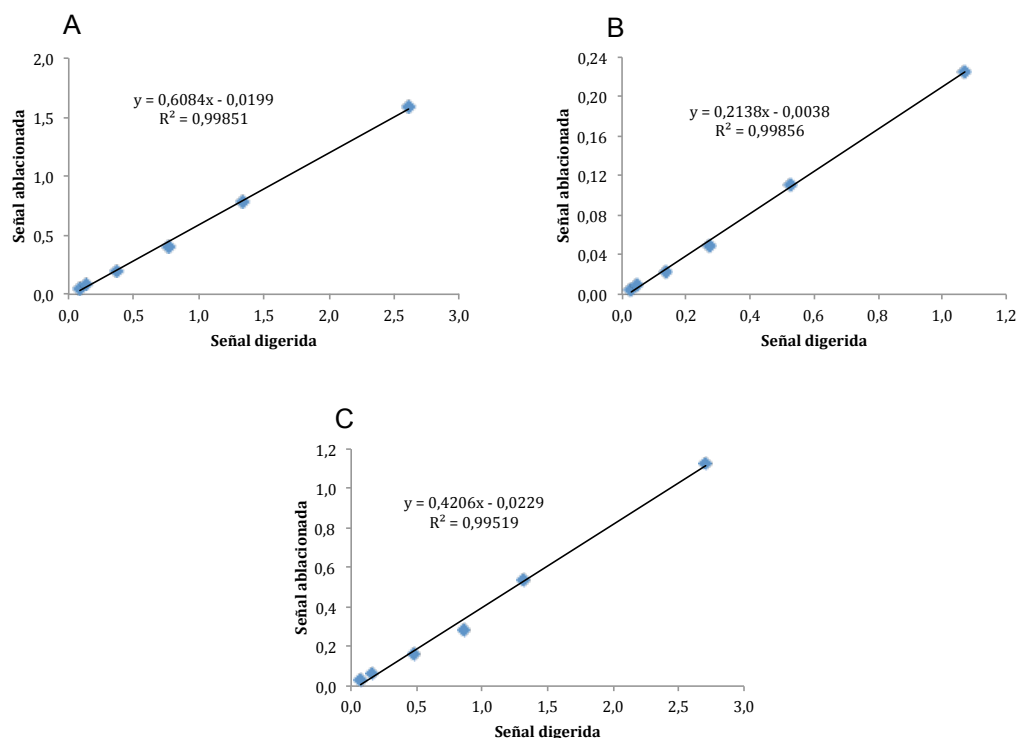


Figura IV.31. Correlación entre las señales obtenidas por ICP-MS tras la digestión ácida y las señales obtenidas por LA-ICP-MS. A) ^{107}Ag ; B) ^{111}Cd y C) ^{202}Hg . Las señales han sido normalizadas con la señal del ^{197}Au ; $[\text{Au III}] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Los resultados mostraron una excelente linealidad con valores de R^2 superiores a 0,99 en todos los casos, lo que significa una buena correlación de los dos métodos. El porcentaje de eficiencia de transporte se calculó comparando las señales normalizadas obtenidas tanto por el proceso de ablación como de digestión, obteniendo un 70% de eficiencia para la Ag, 60% para el Cd y 50% para el Hg. A pesar de las pérdidas elevadas observadas para todos los elementos, se obtuvo una buena correlación lineal al ser corregidos con la señal del PI. Autores como Bonta *et al.* 2016, realizaron este mismo estudio para el desarrollo de un método de cuantificación de varios elementos en tejidos biológicos utilizando la técnica LA-ICP-MS, que consiste en la deposición de gotas de disolución patrón sobre cortes de papel de filtro. Los resultados obtenidos fueron mejores, obteniendo porcentajes de recuperación en torno al 80%. Sin embargo, a pesar de la importancia de este factor, muy pocos autores lo han cuantificado; solo algunos estudios mencionan la presencia de partículas a lo largo de las líneas de conexión entre el sistema LA e ICP-MS debido a la deposición de partículas más grandes del aerosol, de manera similar a las pérdidas observadas cuando se nebulizan muestras líquidas (Miliszkievicz *et al.*, 2017). Una forma de intentar reducir estas pérdidas podría ser reducir la longitud de la línea de transferencia entre la cámara de ablación y la entrada al plasma, e incluso plantear un sistema

para termostatar dicha línea y evitar así deposición de partículas procedentes de los elementos más pesados. Es una de las mejoras que planteamos desde este estudio para realizar en un futuro.

IV.2.6. Cálculo de los límites de detección del sistema LA-ICP-MS

Durante el desarrollo de un método de cuantificación, es necesario conocer cuál es la mínima concentración de analito que puede ser distinguida con nitidez. Por esta razón fue necesario calcular el límite de detección (LOD) de los distintos metales en la matriz de gelatina de pescado. En general, para cualquier estándar sólido en LA-ICP-MS, la muestra deber ser ablacionada en varios sitios para dar una respuesta representativa (García *et al.*, 2009). En dicho estudio, se midieron siete líneas a lo largo de los pocillos para cada estándar. La intensidad de cada línea se normalizó con la señal obtenida del Au (III). Los LOD se calcularon de acuerdo con la recomendación de la IUPAC aplicando la expresión: “3 SD del blanco dividido por la pendiente obtenida para la curva de calibración”. De esta forma, los LODs obtenidos para Ag y Cd fueron 2 y 30 ng.g⁻¹, respectivamente, mientras que 130 ng.g⁻¹ fue el LOD obtenido para el Hg, un orden de magnitud mayor. Esta diferencia se atribuyó principalmente a un aumento de la señal de fondo debido al efecto de memoria que dicho metal presenta, como ya se ha comentado anteriormente.

IV.2.7. Distribución de los elementos Ag, Cd y Hg en las larvas de pez cebra

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue monitorizar la distribución de los tres metales estudiados en larvas de pez cebra mediante la obtención de imágenes. Para obtener la imagen de una larva de pez cebra mediante LA-ICP-MS se realizaron líneas cubriendo toda la muestra. El número de líneas dependió de la longitud y posición de la larva sobre el portamuestras. Las larvas empleadas en este estudio se expusieron a estos tres metales durante 48 h en concentraciones de 0,1 µg.L⁻¹ de Ag, 10 µg.L⁻¹ de Cd, y 25 µg.L⁻¹ de Hg (Zarco-Fernández *et al.*, 2018). Esta es la razón por la que el método se ha desarrollado previamente para estos tres elementos, además de que cubría una zona del espectro de masas elementales amplio, criterio importante a la hora de optimizar un método de ICP-MS.

Inicialmente, la muestra se ablacionó utilizando un tamaño de cráter de 50 µm y una velocidad de ablación de 50 µm.s⁻¹. Uno de los parámetros adicionales a tener en cuenta es la distancia entre líneas adyacentes. Dicha distancia depende del valor de tamaño de cráter utilizado. Inicialmente se probó a utilizar una distancia entre líneas de 50 µm ya que de esta forma las líneas no solapaban entre sí; los análisis se realizaron en modo de adquisición “Full Quant” del software, el cual realiza una medida de 3 puntos centrales por pico, lo que implica un tiempo

de análisis por masa de 0,3 s. La **Figura IV.32** muestra a la izquierda la imagen de la larva de pez cebra captada por la cámara del láser, y a la derecha la distribución del ^{111}Cd a lo largo de la misma.

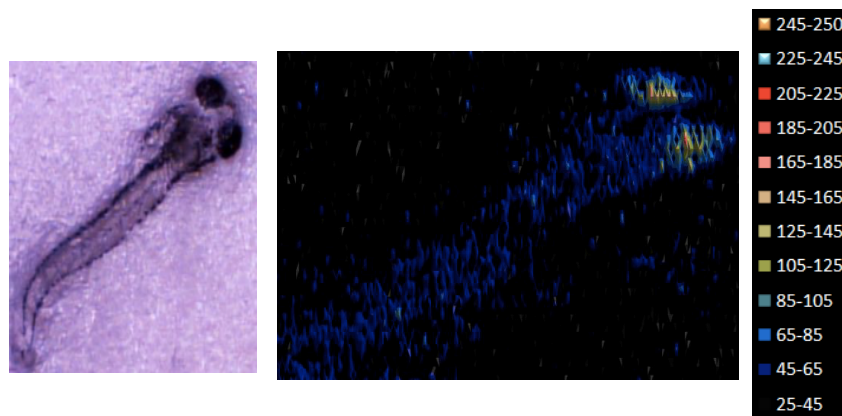


Figura IV.32. Fotografía de la disposición de la larva en el interior de la cámara de ablación (izquierda) y distribución espacial del ^{111}Cd (derecha).

Con estos valores, se observó una imagen poco nítida, por lo que se aumentó el número de líneas de ablación con la finalidad de obtener un mayor número de datos para la construcción de la matriz y, de esta forma, aumentar la resolución de la imagen. Para aumentar el número de líneas es necesario disminuir el tamaño de cráter y, como consecuencia, la velocidad de ablación. Por tanto, se disminuyó a $25\mu\text{m}$ el tamaño de cráter y a $25\mu\text{m.s}^{-1}$ de velocidad de ablación, dejando una distancia entre líneas de $25\mu\text{m}$. También se modificó el modo de adquisición de los datos empleando el modo "TRA", que integra el punto central por cada pico, con un tiempo de análisis de 0,1 s por isótopo, por lo que el equipo nos dio una señal analítica cada 0,1 s, ofreciendo así un mayor número de puntos por línea de ablación y, por tanto, una mejor resolución de la imagen.

En estas condiciones se realizó el mapeo de otra larva de pez cebra, obteniéndose una imagen más definida que en el caso anterior tal y como se muestra en la **Figura IV.33**. Esta vez se monitorizó el ^{202}Hg . En cualquier caso, hay que tener presente que el láser con el que trabajamos no es un láser de femtosegundos, (con tiempos de pulso ultrarápidos), sino de nanosegundos (lo que proporciona menor resolución de las imágenes) además de que el equipo ICP-MS acoplado no puede bajar de un tiempo de residencia de 0,1 ms por isótopo; ambos factores constituyen dos limitaciones de este método a la hora de obtener imágenes bien definidas. Aún así, en esta imagen se ve una mejor definición en la distribución, por lo que, aun a riesgo de perder sensibilidad, se decidió mantener los parámetros en los valores mencionados para llegar a un equilibrio entre ambas variables.

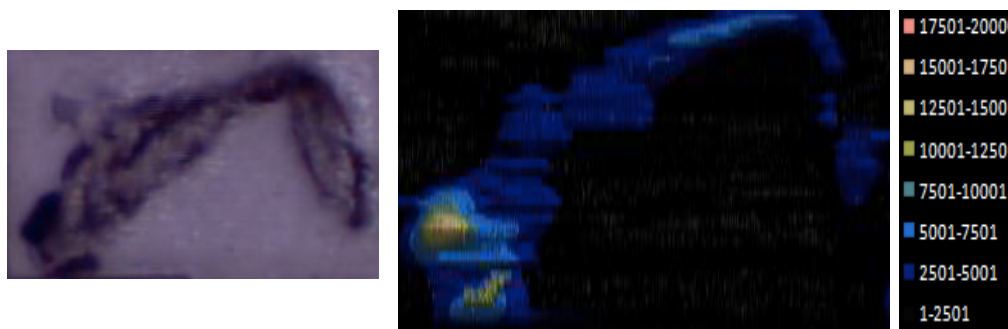


Figura IV.33: Fotografía de la disposición de la larva en el interior de la cámara de ablación (izquierda) y distribución espacial del ^{202}Hg (derecha).

El último ajuste de los parámetros realizado fue la distancia entre líneas, ya que a menor distancia se consigue una mejor resolución de la imagen, pero teniendo cuidado de evitar el solapamiento de las mismas. De esta forma, se comprobó que utilizando una distancia entre líneas de 25 μm se perdía información ya que, en los extremos de cada línea, quedaban zonas sin ablacionar. Por esta razón, se disminuyó a 20 μm la distancia entre líneas. Con todos estos parámetros optimizados, y resumidos en la **Tabla IV.8** se procedió a realizar el mapeo de una larva control (sin exposición a los elementos estudiados) y otra expuesta durante 48 h. Las imágenes se muestran en las **Figuras IV.34- 36**.

Tabla IV.8. Condiciones finales de ablación de las larvas de pez cebra para realizar el mapeo.

PARÁMETROS ABLACIÓN LÁSER	CONDICIONES
Modo adquisición de datos	"Time Resolved Analysis" (TRA)
Isótopos	^{107}Ag , ^{111}Cd , ^{202}Hg , ^{197}Au
Modo ablación	Single line
Energía (%)	95-98
Frecuencia de repetición (Hz)	20
Velocidad de ablación ($\mu\text{m}/\text{s}$)	25
Tamaño de cráter (μm)	25
Distancia entre líneas (μm)	20

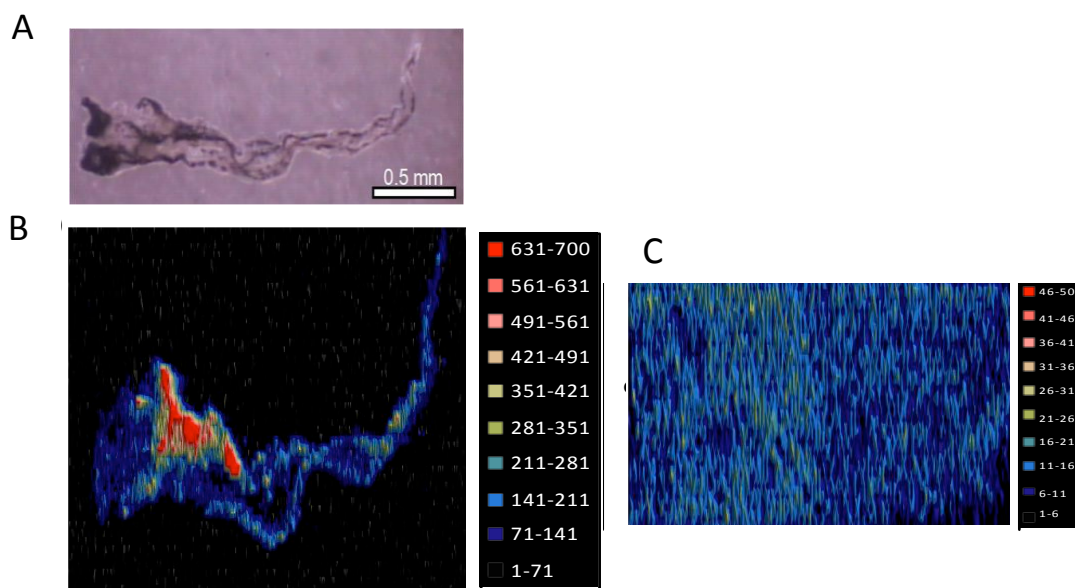


Figura IV.34. A) Fotografía de la larva en el interior de la cámara de ablación, B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva expuesta durante 48 h $[\text{Ag}] = 0,1 \mu\text{g/L}$ C) Imagen de una larva control para ^{107}Ag . Las unidades del eje y agrupadas en colores son cuentas por segundo.

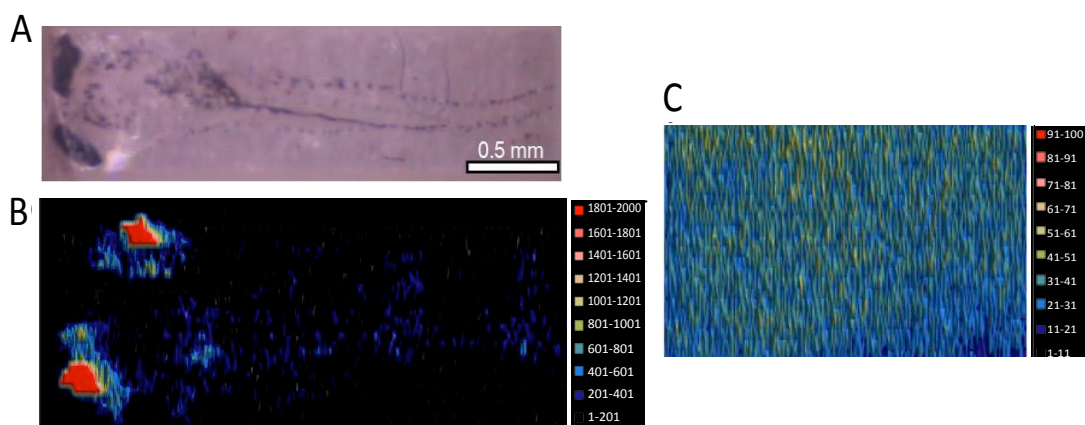


Figura IV.35. A) Fotografía de la larva en el interior de la cámara de ablación, B) Distribución espacial de ^{111}Cd en una larva expuesta durante 48 h. $[\text{Cd}] = 10 \mu\text{g/L}$. C) Imagen de una larva control para el ^{111}Cd . Las unidades del eje y agrupadas en colores son cuentas por segundo.

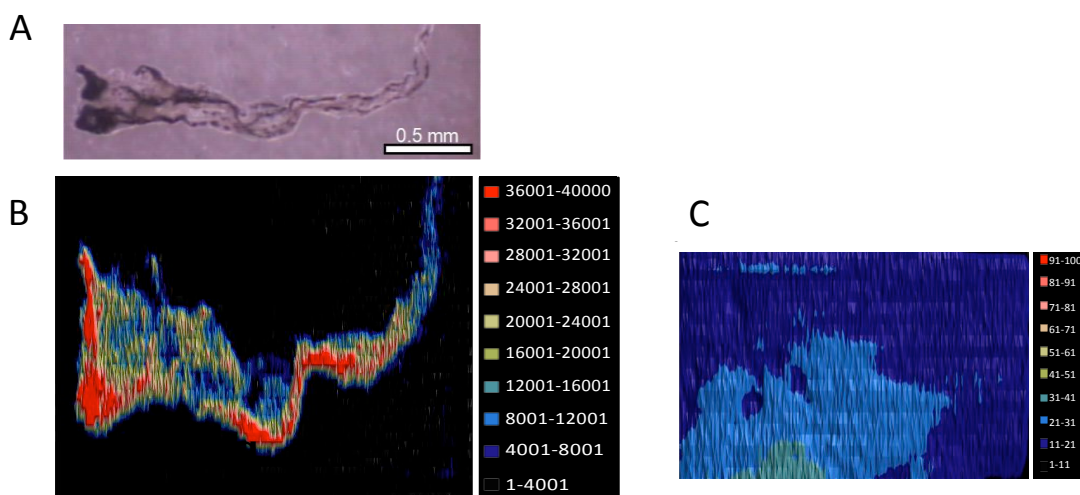


Figura IV.36: A) Fotografía de la larva en el interior de la cámara de ablación, B) Distribución espacial de ^{202}Hg en una larva tras ser expuesta durante 48 h. $[\text{Hg}] = 25 \mu\text{g/L}$. C) Imagen de una larva control para el ^{202}Hg . Las unidades del eje y agrupadas en colores son cuentas por segundo.

Se observan claras diferencias en la distribución de los tres elementos estudiados: así, la Ag se acumula principalmente en la zona de la cabeza con una intensidad máxima de aproximadamente 700 cps, mientras que el Cd se acumula preferentemente en los ojos con una intensidad de 2000 cps, aproximadamente. El Hg se acumula, fundamentalmente, en la parte de la cabeza, pero también a lo largo del tubo digestivo de la larva. Además, la intensidad obtenida para este elemento es mucho mayor a los anteriores, en torno a los 40000 cps en las zonas más intensas, corroborando así que el mercurio es un elemento altamente bioacumulable, tal y como la bibliografía ha reflejado en numerosas ocasiones (Cuello *et al.*, 2012; Varien-Ramos *et al.*, 2017; Zarco-Fernández *et al.*, 2018).

Existen trabajos de distribución espacial elemental en otras especies similares a los obtenidos en esta Tesis doctoral y que son totalmente comparables. Por ejemplo, Niehoffet *et al.*, 2015, analizó la absorción de Hg en la especie *Drosophila melanogaster*, encontrando niveles de Hg en la cabeza que exceden mucho de la cantidad administrada, lo que indica una acumulación elevada de este metal en este tipo de organismos; Santos *et al.* 2009, llevaron a cabo la distribución de Cd y Hg entre otros, en secciones longitudinales de tejidos de caracol marino (*Nassarius reticulatus*). Todos los elementos se acumularon principalmente en la glándula digestiva, siendo el Cd y Hg los metales que produjeron una mayor acumulación. La distribución de Hg en el hígado en la especie *Lepisosterus usoculatus* también se visualizó empleando la técnica LA-ICP-MS, estableciendo una relación directa entre los altos niveles acumulativos de dicho elemento tóxico con la formación de agregados de macrófagos (Barst *et al.*, 2011);

Monperrus *et al.*, 2020 llevaron a cabo la distribución de Hg en angulas utilizando la misma técnica, encontrando una elevada acumulación principalmente en el corazón y los músculos. Bohme *et al.*, 2015 también analizaron la distribución Ag y otros metales en embriones de pez cebra, encontrando una mayor acumulación del mismo en el espacio perivitelino y el corión del embrión.

IV.2.8. Semi-cuantificación de Ag, Cd y Hg en larvas de pez cebra mediante LA-ICP-MS

Antes de realizar cualquier estrategia de cuantificación es necesario evaluar el efecto matriz de las larvas del pez cebra, ya que la matriz influye en el proceso de ablación de la muestra debido a las propiedades variables del material, lo que puede conllevar a una variación importante de la señal e interferencias. Para ello, se doparon dos larvas control con un patrón de concentración $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ enriquecida con Au (III) en disolución ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$) como PI. El procedimiento experimental viene detallado en el apartado III.7.f. de Materiales y métodos. Se obtiene una recuperación del patrón añadido a la larva del 85% para el Hg y del 90% para la Ag y el Cd, valores altamente satisfactorios. Este mismo experimento se cuantificó también en un calibrado externo, obteniéndose recuperaciones entre 40-70%, valores muy deficientes y claramente inferiores a los obtenidos con el uso del PI. Estos datos fueron tratados estadísticamente, realizando un análisis de varianza (ANOVA) mediante el programa "Statgraphics Centurion XVII". La **Figura IV.37** muestra cómo varían las señales obtenidas para cada uno de los metales en la gelatina y en la larva control sin adicionar y adicionando el PI. Se confirmó el efecto significativo de la matriz sin usar PI, ya que las señales obtenidas fueron muy diferentes en la gelatina y en la larva (línea azul), mientras que usando la calibración de patrón interno prácticamente no se apreció diferencia entre la gelatina y la larva en los tres metales, es decir, se corrigió de forma favorable el efecto matriz (línea roja). De esta forma, se confirmó, una vez más, que el Au (III) en disolución es un estándar interno necesario y adecuado en nuestro procedimiento.

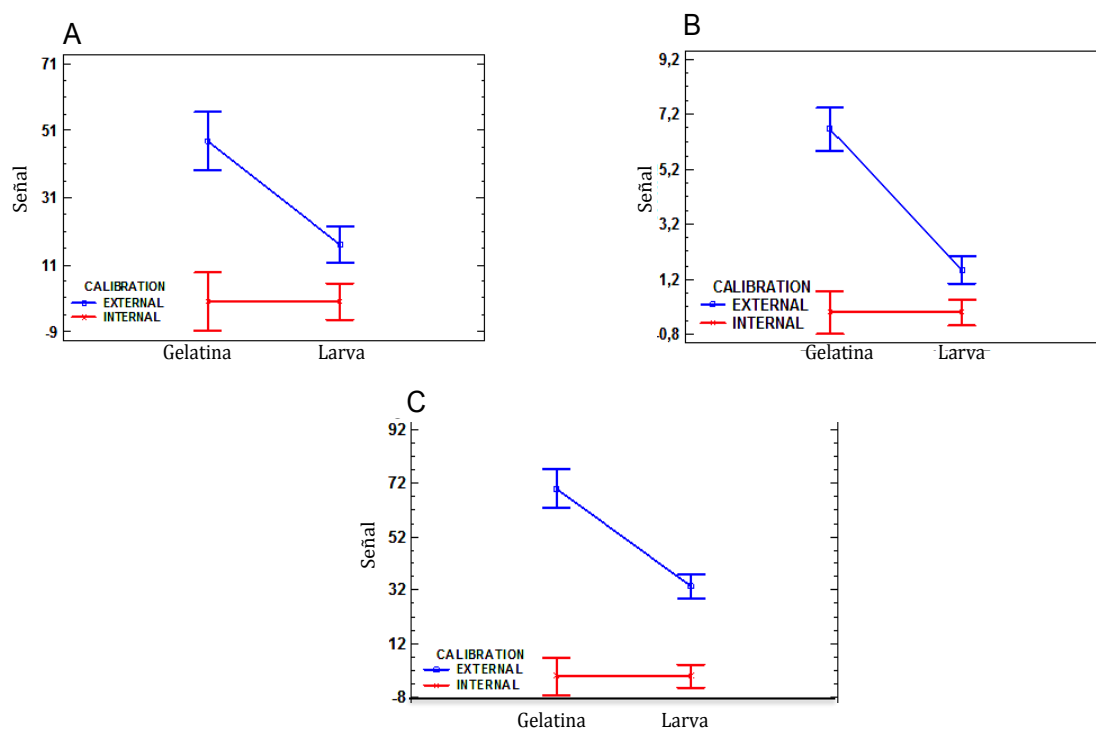


Figura IV.37. Análisis ANOVA. Influencia del efecto matriz entre la matriz calibrante (gelatina) y la muestra (larva) sin y con patrón interno. A) Ag, B) Cd and C) Hg. $[Ag, Cd, Hg] = 50 \mu g.L^{-1}$; $Au = 1000 mg.L^{-1}$. Las señales corresponden a cuentas por segundo dividido por un factor de 1000.

Finalmente, se realizó una semi-cuantificación de los tres metales en diferentes larvas de pez cebra expuestas, comparando los valores que nos da empleando el método LA-ICP-MS y el método de digestión y análisis por ICP-MS. Los valores obtenidos mediante análisis directo se obtuvieron en un trabajo previo (Zarco-Fernández *et al.*, 2018). Los valores están recogidos en la **Tabla IV.9**.

Tabla IV.9. Concentraciones de Ag, Cd and Hg medidas por LA-ICP-MS en larvas de pez cebra expuestas a los metales Ag, Cd, Hg ($n=3$, larvas individuales) comparado a los valores medidos por ICP-MS tras una digestión previa ($n=3$, grupos de 15 larvas).

	Ag	Cd	Hg
Digestión ($ng.g^{-1}$)	7 ± 5	500 ± 20	7450 ± 120
Ablación ($ng.g^{-1}$)	8 ± 5	380 ± 170	3500 ± 720

Se observa que el valor obtenido para la Ag por LA-ICP-MS es del 110% del valor obtenido

mediante digestión. Es necesario resaltar la elevada RSD obtenida por ambos métodos, lo que indica una alta variabilidad de la absorción de Ag, muy probablemente debido a la pequeña concentración de exposición ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) y al pequeño valor acumulado. Los resultados para el Cd son también comparables teniendo en cuenta la incertidumbre de ambos valores, situándose la recuperación en un 80% del valor de digestión. Sin embargo, la recuperación obtenida para el Hg solo llega al 50%, lo que pudiera deberse en buena medida a la pérdida que se observaba en el transporte hacia el plasma y que se ha discutido previamente. También aquí pudiera estar influyendo el fraccionamiento no estequiométrico de manera más notable al tratarse de un elemento con elevada presión de vapor (Niehoff *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos fueron contrastados con otros autores que también emplearon estrategias de cuantificación por LA-ICP-MS similares a la nuestra. Por ejemplo, Kayar *et al.* 2016, empleó la estrategia de calibración basada en el uso de patrones de naturaleza igual o semejante a la propia muestra de interés para la cuantificación de Cd y Hg en muestras de PVC proporcionando recuperaciones entre 80-90% para el Cd, pero, sin embargo, para el Hg se obtuvieron recuperaciones en torno al 50%, de forma similar a nuestros resultados. Para el Cd y el Hg hay otros estudios realizados en muestras de caracoles y mejillones cuya matriz es más similar a las larvas de pez cebra (Santos *et al.*, 2009). Estos autores presentaron diferentes estrategias de cuantificación obteniendo un 75% de recuperación para el Cd y un 90% para el Hg en mejillones. En caracoles se obtuvo un 90% para el Cd y un 130% para el Hg. Sin embargo, cuando prescindieron de los estándares de laboratorio sintéticos, esas recuperaciones fueron superiores al 120% en todos los casos, lo que indica una sobre-cuantificación de estos elementos. Bohme *et al.* 2015 propusieron una calibración basada en geles de agarosa para la cuantificación de nanopartículas de plata y plata iónica en organismos *Danio rerio* y *Daphnia magna*. Al igual que nuestro caso, compararon los valores obtenidos por ablación láser con los obtenidos por digestión ácida. Los resultados mostraron recuperaciones del 100% para la Ag en el organismo *Danio rerio* y una sobrecuantificación del 233% para el organismo *Daphnia magna*.

Por último, hay que señalar también la elevada incertidumbre obtenida por LA-ICP-MS en los tres elementos cuando se compara con la digestión. En primer lugar, hay que tener presente que en LA-ICP-MS, las muestras son 3 larvas individuales, mientras que para la digestión y análisis por ICP-MS se trata de tres réplicas, conteniendo cada una de ellas 15 larvas. Por ello, y considerando que se trata de organismos vivos, es lógico obtener una mayor incertidumbre con la técnica LA-ICP-MS. Además, el acoplamiento LA-ICP-MS empleado en la cuantificación elemental sufre de una mayor incertidumbre, aspecto que está bien reflejado en la bibliografía (Pisonero *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009; Izmer *et al.*, 2012; Niehaus *et al.*, 2015).

En base a todo lo anterior, se propone esta metodología desarrollada por LA-ICP-MS como una herramienta para monitorizar y estudiar la distribución de los elementos estudiados en muestras biológicas; en nuestro caso, larvas de pez cebra, pero que es extensible a otras matrices biológicas, realizando las optimizaciones necesarias en cada caso. Además, también se puede emplear como una estrategia de *semi-cuantificación* para conocer los niveles de concentración que presentan y la diferencia de concentración según la zona del organismo donde se hayan fijado o acumulado. Preferimos hablar de semi-cuantificación debido a la variabilidad obtenida en la comparación con un método directo en el que se destruye la muestra como es el caso de la digestión y análisis por ICP-MS. También hay que considerar aquí que, al tratarse de una muestra tan pequeña, no se hicieron cortes longitudinales en la misma por lo que muy probablemente la muestra no haya sido ablacionada de manera homogénea en toda su longitud. Sin embargo, consideramos interesante dar las concentraciones obtenidas por LA-ICP-MS ya que dan una idea del nivel de concentración de los elementos en las muestras ablacionadas, aparte de mostrar las zonas donde hay más acumulación. Adicionalmente, podemos decir que concuerdan bastante bien con lo que se ha publicado hasta ahora para este tipo de metodologías.

IV.3. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE LAS AgNP10 y AgNP60 EN UN SISTEMA IN VIVO (LARVAS DE PEZ CEBRA)

Este último apartado incluye, tanto resultados analíticos basados en la metodología LA-ICP-MS desarrollada y descrita en el punto IV.2., como estudios bioanalíticos basados en una adaptación de la técnica SILAC, empleada en células HepG2 en el punto IV.1.

IV.3.1. Estudio de la distribución y semi-cuantificación de AgNP10 y AgNP60 en larvas de pez cebra.

IV.3.1.1. Homogeneidad, linealidad y eficiencia en el transporte al plasma

El primer estudio realizado fue la evaluación de la homogeneidad. Este estudio tiene una relevancia especial en el caso de las nanopartículas, ya que hay que verificar la estabilidad de las mismas y la ausencia de formación de aglomerados durante el proceso de solidificación de la gelatina. Por ello, se tomó la gelatina dopada con las AgNPs (10 nm y 60 nm), depositada en los correspondientes pocillos aplicando el procedimiento experimental detallado en el apartado de III.7.b. de Materiales y métodos y se evaluó nuevamente la sensibilidad y la homogeneidad de la parte central y los extremos en un mismo pocillo en términos de RSD. Los resultados obtenidos para la homogeneidad, mostraron un error relativo en torno al 5% para ambas

nanopartículas en la zona de los extremos. En el centro, las barras de error fueron ligeramente más elevadas, pero aún así no superaron el 10% en ninguno de los casos por lo que se consideró aceptable para continuar con posteriores estudios. A continuación, se estudió la linealidad en la gelatina de pescado preparándose estándares de gelatina con diferentes concentraciones de AgNP10 y AgNP60 (50-1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). La linealidad se muestra en las **Figuras IV.38** y **IV.39** para las AgNPs de los dos tamaños estudiados, con y sin adición de $^{197}\text{Au(III)}$ como PI (1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Se observó que para ambas NPs la adición del PI mejoraba claramente la comparabilidad de las pendientes obtenidas en días distintos, por lo que se decidió mantener el mismo procedimiento de calibración, incluido el empleo del Au (III) como PI.

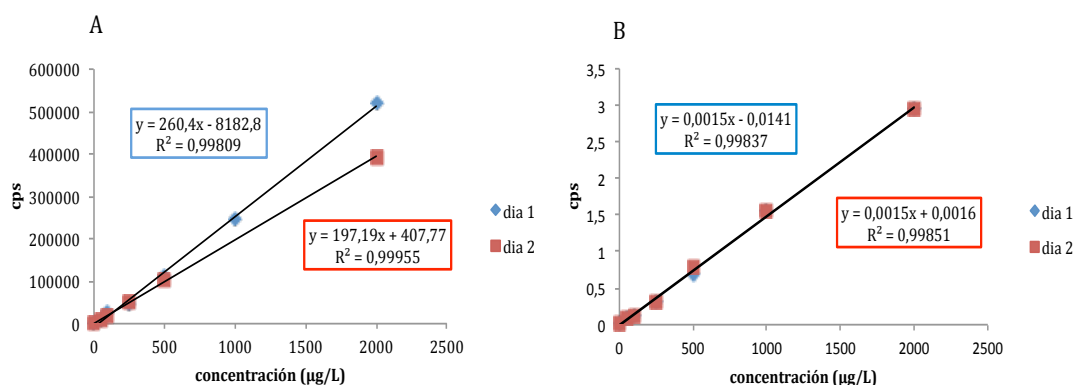


Figura IV.38. Rectas de calibrado de las AgNP10 en dos días diferentes: A) calibrado externo; B) calibrado de patrón interno con adición de $^{197}\text{Au (III)}$ 1 mg.L^{-1} .

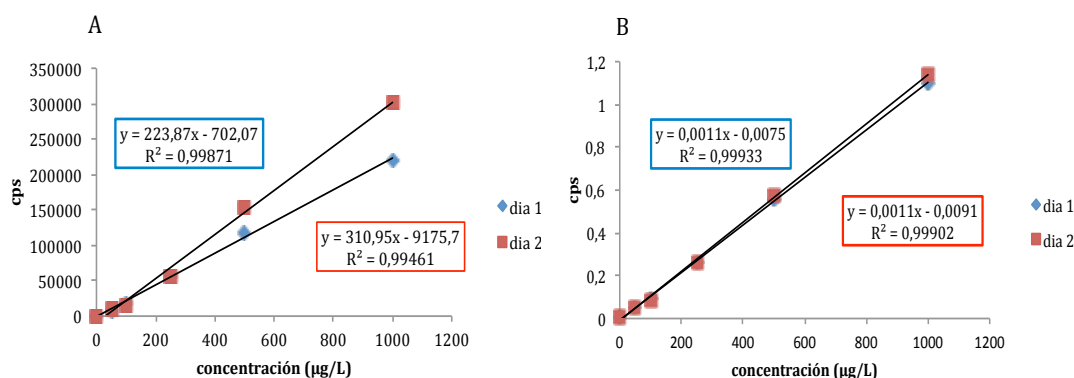


Figura IV.39. Rectas de calibrado de las AgNP60 en dos días diferentes: A) calibrado externo; B) calibrado de patrón interno con adición de $^{197}\text{Au (III)}$ 1 mg.L^{-1} .

En tercer lugar, se determinó la correlación de las concentraciones determinadas por las mediciones LA-ICP-MS e ICP-MS tras la digestión ácida de manera similar a como se hizo con la Ag iónica en IV.2. Para ello, recordemos que se comparan las señales obtenidas para cada uno de los puntos de calibrado por ambos equipos con el fin de evaluar la eficiencia de transporte de la muestra en el proceso de ablación. El porcentaje de eficiencia de transporte se calculó dividiendo la señal obtenida por el proceso de ablación y la obtenida por el proceso de digestión. En la **Figura IV.40** se puede observar la buena linealidad obtenida, con valores de R^2 superior a 0,99 en ambos casos.

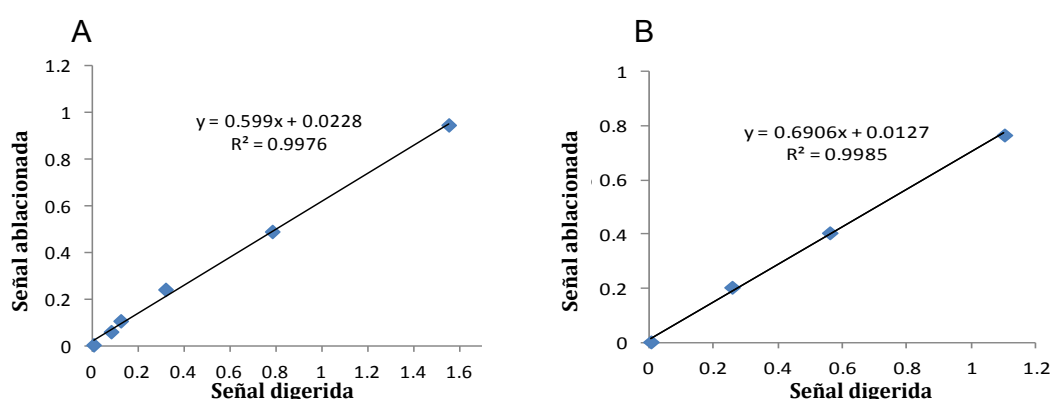


Figura IV.40. Correlación entre las señales obtenidas por ICP-MS tras la digestión ácida y las señales obtenidas por LA-ICP-MS. A) AgNP10; B) AgNP60. PI: [Au III] = 1 mg.L⁻¹.

En cuanto a la eficiencia en el transporte, se observó que para las AgNP10 la eficiencia fue del 65% y para las AgNP60 se redujo hasta un 50%. Si se comparan con la eficiencia obtenida en el transporte para la Ag iónica que fue del 70%, se puede apreciar una leve disminución para ambos tamaños de nanopartícula. La dependencia con el tamaño puede deberse al hecho de que se formen aglomerados en consonancia con los resultados obtenidos en el estudio de homogeneidad: tal y como se comprobó previamente, existe una mayor aglomeración en las AgNP60. Esto podría traducirse en una ablación incompleta, debido a que parte de la energía fuese absorbida por las NPs, dando lugar a una fusión superficial generando partículas más grandes durante el proceso de evaporación. A su vez, este hecho podría disminuir la eficiencia del transporte hacia el plasma, provocando deposición en la línea de transferencia, problema que ya se ha mencionado anteriormente y que constituye uno de los principales inconvenientes de esta técnica (Gunther & Hattendorf, 2001). Autores como Bohme *et al.* 2015 observaron comportamientos similares en otro tipo de nanopartículas. Concretamente,

estudiaron la absorción de nanopartículas de Al_2O_3 de tres tamaños diferentes en larvas de pez cebra, mostrando que las partículas de mayor tamaño provocaban una eficiencia en el transporte mucho peor, obteniendo recuperaciones en torno al 38% en comparación con el 70% obtenido en nanopartículas de menor tamaño. Por ello, esto supone, como ya hemos dicho antes un área que hay que seguir investigando y mejorando.

IV.3.1.2. Distribución y semi-cuantificación de las AgNPs de 10 y 60 nm en larvas de pez cebra

Con las condiciones seleccionadas y empleando los mismos parámetros del láser que para los elementos discutidos en la sección IV.2., se procedió a mapear muestras de larva de pez cebra previamente expuestas durante 48 h en un medio con 1 mg/L de AgNP10 o de AgNP 60. Las imágenes obtenidas se muestran en las **Figuras IV.41** y **IV.42**. Se observa claramente una mayor internalización de las AgNP10 en las larvas (un orden de intensidad mayor que para las AgNP60). Además, se aprecia una distribución diferente, ya que las AgNPs de menor tamaño se distribuyen de forma bastante regular a lo largo de todo el cuerpo, mientras que las AgNP60 se distribuyen sólo en el área de la cabeza. Por lo tanto, los patrones de captación y distribución de ambas AgNPs son muy diferentes, indicando una gran dependencia del tamaño. En ambos casos se realizó el mapeo de una larva control, es decir, una larva no expuesta a AgNPs, comprobándose que no dio ninguna señal de ^{107}Ag , por lo que se confirmó que las larvas no contienen estas especies endógenamente y que no hubo contaminación de las muestras.

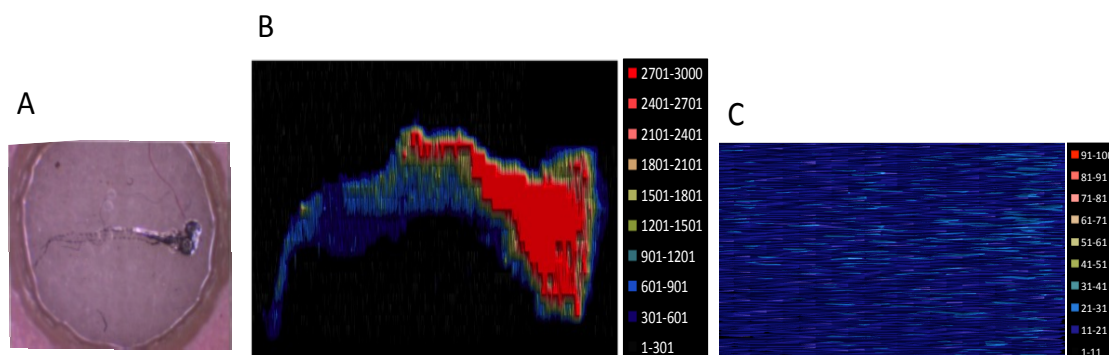


Figura IV.41. A) Fotografía de una larva de pez cebra en el interior de la cámara de ablación; B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva tras ser expuesta a 1 mg.L⁻¹ AgNP10. C) Imagen de una larva expuesta a un medio libre de Ag. Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.

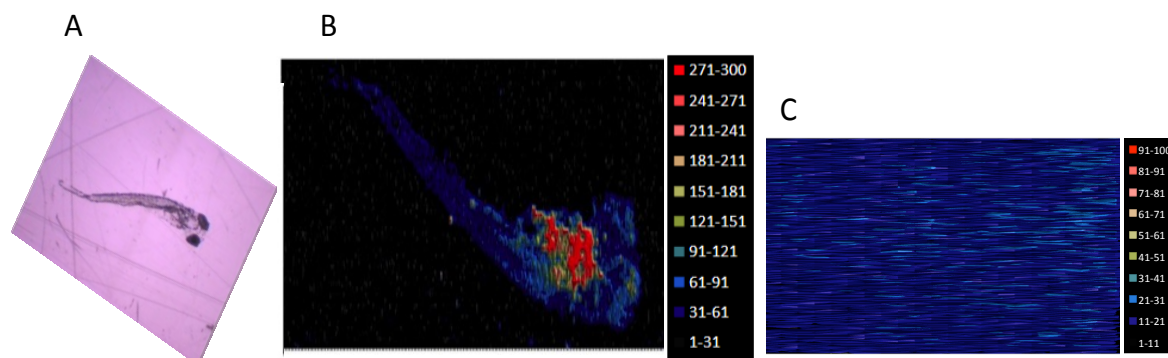


Figura IV.42. A) Fotografía de una larva en el interior de la cámara de ablación; B) Distribución espacial de ^{107}Ag en una larva tras ser expuesta a 1 mg.L^{-1} AgNP60. C) Imagen de una larva expuesta a un medio libre de Ag. Las unidades del eje y agrupadas por colores son cuentas por segundo.

Estos resultados concordaron con otros estudios previos. Por ejemplo, Xin *et al.*, 2015, demostraron una mayor absorción de las AgNPs de 4 nm en comparación con las de 10 nm, mostrando además una acumulación preferencial en la zona de la cabeza de ambos tipos de nanopartículas en comparación con el tronco.

Para terminar, se decidió calcular la concentración de Ag absorbida por las larvas tras la exposición a los dos tipos de AgNPs mediante una digestión ácida seguida del análisis por ICP-MS y compararla con el método LA-ICP-MS, de manera similar a lo que se mostró con los metales en el apartado IV.2. Tras la previa digestión ácida de las larvas y posterior análisis por ICP-MS se observó cómo para los dos tipos de AgNPs una larva no expuesta ($t = 0 \text{ h}$) presentó unos niveles muy bajos de Ag quedando toda en el medio de exposición, mientras que pasadas 48 h de exposición, estos niveles de Ag aumentaron considerablemente, sobre todo en el caso de las AgNP10. Es decir, se muestra cómo las larvas captan las nanopartículas a medida que transcurre el tiempo y, por tanto, la concentración adicionada en el medio va disminuyendo. En el caso de las nanopartículas de tamaño más pequeño, la absorción fue mayor como cabía esperar. Los resultados numéricos obtenidos tienen relación con el comportamiento observado en la distribución elemental de las imágenes de las larvas mostradas en el punto anterior (**Tabla IV.10**).

Tabla IV.10: Media de las concentraciones de AgNP10 y AgNP60 encontradas en tres grupos de 15 larvas (ng.g^{-1}) y en el medio ($\mu\text{g.L}^{-1}$) medido por ICP-MS tras digestión ácida.

AgNP10	Medio exposición ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Larvas (ng.g^{-1})
0 h	1013 ± 156	35 ± 5
48 h	430 ± 60	634 ± 145
AgNP60	Medio exposición ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Larvas (ng.g^{-1})
0 h	913 ± 145	14 ± 8
48 h	613 ± 75	175 ± 37

Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados anteriormente en los que se demostró que el tamaño de partícula es un factor clave en el proceso de absorción de las larvas. Por ejemplo, autores como Bar-llan *et al.* 2009 demostraron una mayor mortalidad de las larvas pez cebra expuestas a AgNPs de menor tamaño (3 nm), así como malformaciones morfológicas en los embriones debido a su mayor absorción. Liu *et al.* 2019 estudiaron que las AgNPs de menor tamaño, en este caso 20 nm, se absorbían mucho más que las de mayor tamaño (100 nm) y, por tanto, resultaban ser más tóxicas en el intestino y las branquias de las larvas. Para llevar a cabo la semi-cuantificación a partir de las imágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS, tal y como se hizo para los tres elementos en el apartado IV.2., se realizó antes el estudio del efecto matriz de la larva. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA, tal y como se muestra en la **Figura IV.43**.

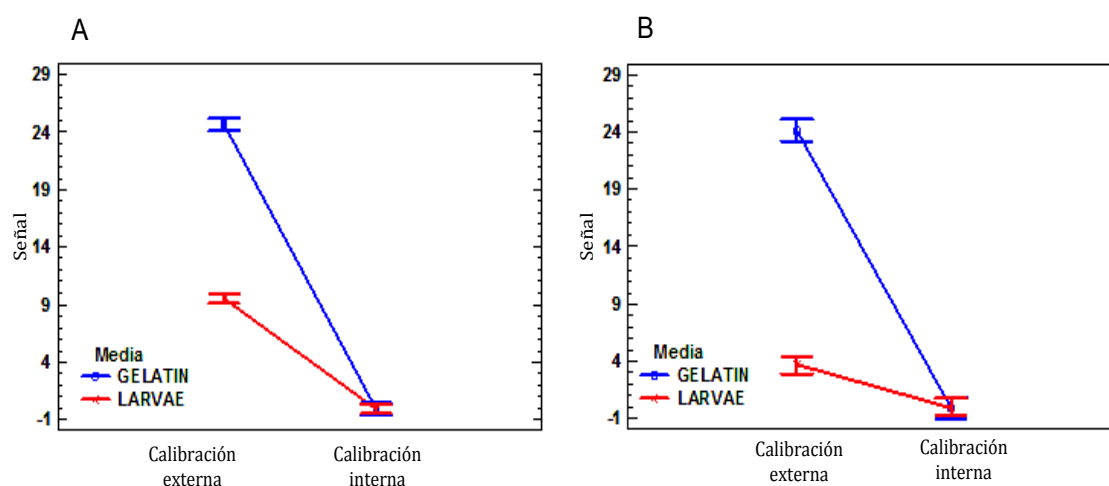


Figura IV.43. Análisis multifactorial ANOVA. Influencia del efecto matriz entre la matriz calibrante (gelatina) y la muestra (larva) sin y con patrón interno. A) AgNP10, B) AgNP60. Las señales corresponden a cuentas por segundo dividido por un factor de 1000.

El análisis estadístico confirmó el efecto significativo de la matriz al usar la calibración externa. Concretamente, se observó un efecto matriz mayor en la gelatina dopada con AgNP60 que en las AgNP10. Ya se mostró una mayor dependencia del tamaño en la homogeneidad obtenida, así como en el transporte, lo que puede agravarse en una matriz más compleja como es la larva. La adición de Au (III) como PI sigue siendo capaz de mitigar este efecto, como pasaba en el anterior estudio, pero no de una forma tan eficaz para las AgNPs de mayor tamaño. En vista de los resultados obtenidos se realizó la semi-cuantificación de las muestras expuestas durante 48 h y una posterior comparación con los resultados de la cuantificación tras la digestión. Comparando los valores obtenidos por ambos métodos y suponiendo que el valor de la digestión es el 100%, obtenemos una recuperación del 73% para las AgNP10 y del 55% para AgNP60, lo que implica unas concentraciones de $461 \pm 104 \text{ ng.g}^{-1}$ y $96 \pm 38 \text{ ng.g}^{-1}$, respectivamente. Estos valores concuerdan con la distribución observada mediante LA-ICP-MS, donde se mostraba una mayor acumulación de las AgNP10 en las larvas.

En base a todo lo expuesto, se puede afirmar que la técnica LA-ICP-MS es muy útil para conocer la distribución de elementos de interés así como de nanopartículas metálicas en muestras de larvas de pez cebra. Además, ha permitido desarrollar un método de calibración utilizando una gelatina de pescado para conocer la cantidad absorbida, demostrando que el Au en disolución resultó ser un patrón interno fácilmente manipulable y adecuado para corregir variaciones instrumentales, de medida y de la propia muestra.

IV.3.2. Evaluación de la expresión diferencial de proteínas en larvas de pez cebra expuestas a AgNPs

Los estudios toxicológicos en modelos *in vivo* son cada vez más frecuentes debido a la diversidad en la fisiología animal y la anatomía en modelos animales. Concretamente, las larvas de pez cebra (*Danio Rerio*) se han convertido en los últimos años en un excelente modelo *in vivo* ampliamente utilizado en estudios de toxicidad (Xia *et al.*, 2016; Abramenko *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Este modelo resulta de gran utilidad ya que se puede disponer de la secuencia completa de su genoma (Seth *et al.*, 2013), lo que facilita la realización de estudios de proteómica con el fin de entender en mayor extensión procesos específicos de animales vertebrados. Por esta razón, se consideró de sumo interés determinar los mecanismos biomoleculares de toxicidad implicados en la exposición a las AgNPs anteriormente seleccionadas en los ensayos *in vitro*. De esta forma, se llevó a cabo un estudio de proteómica cuantitativa basado en este caso en la estrategia super-SILAC, adaptación de la técnica SILAC empleada en células, para evaluar la expresión diferencial de proteínas afectadas tras la exposición a AgNP10 y AgNP60 empleando larvas de pez cebra como modelo *in vivo*.

IV.3.2.1. Optimización del método de extracción de proteínas de larvas de pez cebra

Dado que este estudio constituyó la primera vez que se ha utilizado la técnica super-SILAC empleando como modelo larvas de pez cebra, fue necesario optimizar previamente el método de extracción de proteínas de dichas larvas, permitiendo una máxima recuperación de las mismas con una buena reproducibilidad. Para ello, se realizaron varios ensayos en los que se evaluaron diferentes parámetros. Durante el experimento se optimizaron tres etapas clave: la disrupción de la muestra, las condiciones de lisis celular y la precipitación de proteínas. Se comenzó la optimización con la disrupción del tejido de las larvas, partiendo previamente de las condiciones utilizadas por Cuello *et al.*, 2012. Para ello, se probó una homogenización mecánica, una homogenización mediante una sonda de ultrasonidos (US) empleando 20 pulsos de 2 s con tiempos de espera de 5 s entre pulsos para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, y una combinación de ambas. La **Figura IV.44** muestra las fotografías de los geles (SDS-PAGE) con las bandas generadas en las diferentes condiciones estudiadas. En la **Figura IV.44A** se observa cómo la cantidad de proteína extraída fue muy superior utilizando una combinación de la disrupción mecánica y la sonda US que al emplear cada uno de los dos métodos por separado. Por esta razón, se eligió la combinación de ambas estrategias. Seguidamente, se optimizó el tampón de lisis total con composición: 20 mM tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 1% (v/v), Tritón x100 e inhibidores de proteasas, y un tampón de urea de composición: 8 M urea, 50 mM ditiotretol, 4% (p/v) CHAPs, 1% (v/v) Tritón x100 e inhibidores de proteasas. En este caso, el primero proporcionó mayor cantidad de proteína total extraída (**Figura IV.44B**), siendo, por tanto, seleccionado. Por último, se optimizó el método de precipitación de proteínas utilizando acetona como disolvente en todos los casos. Lo que se evaluó, en este caso, fue el efecto de la temperatura de adición e incubación. Para ello, se probaron diferentes temperaturas y condiciones, concluyendo que las condiciones más favorables para la precipitación de proteínas fueron en las que se adicionó acetona a 4 °C y se incubó durante 16 h a -20 °C (**Figura IV.44C**).

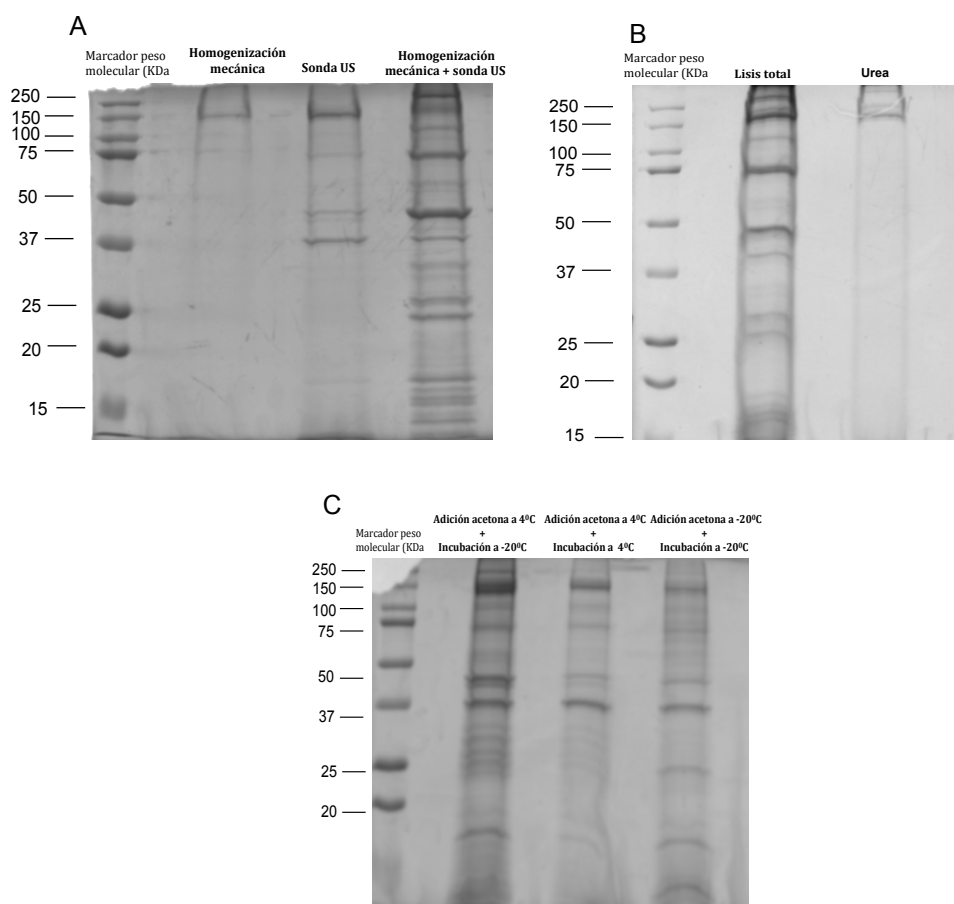


Figura IV.44. Fotografías de los geles SDS-PAGE empleados para separar las proteínas extraídas de larvas de pez cebra mediante las diferentes condiciones experimentales evaluadas: A) Disrupción de la muestra; B) Efecto del tampón de lisis; C) Precipitación de proteínas.

El esquema de la **Figura IV.45** muestra, de forma resumida, los diferentes pasos a seguir en el proceso de extracción de proteínas de las larvas de pez cebra, así como las distintas condiciones evaluadas y seleccionadas (cuadros en azul).

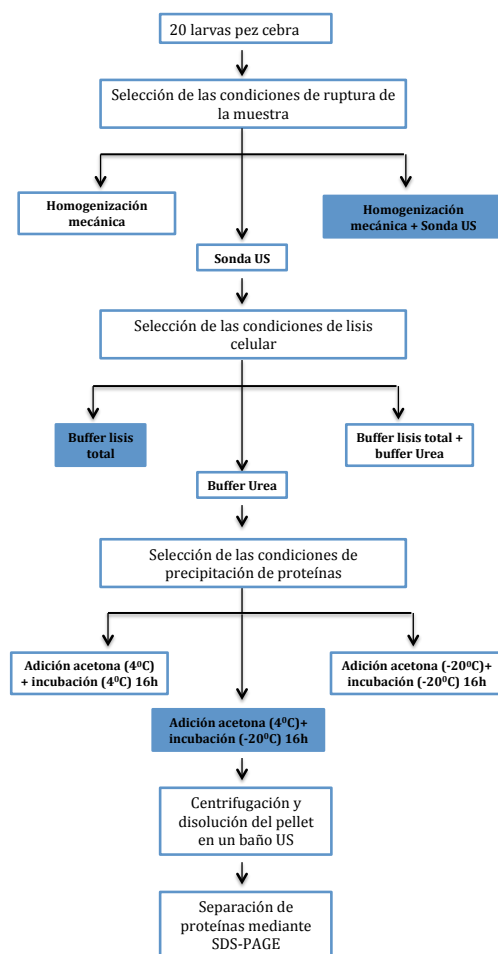


Figura IV.45: Esquema del procedimiento de extracción de proteínas de las larvas de pez cebra.

IV.3.2.2. Identificación de proteínas diferencialmente expresadas en larvas de pez cebra expuestas a AgNP10 y AgNP60

Una vez optimizado el método de extracción de proteínas, se realizó la estrategia super-SILAC (explicada en el apartado III.6.b de Materiales y métodos) con la finalidad de cuantificar proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras ser expuestas durante 72 h a AgNP10 y AgNP60 para, de esta forma, evaluar los mecanismos involucrados en su toxicidad en un modelo *in-vivo* en desarrollo. Se identificaron un total de 210 proteínas en muestras de larvas expuestas a AgNP10, 198 proteínas en muestras de larvas expuestas a AgNP60 y 262 proteínas en larvas control, con un nivel de confianza del 99% ($p < 0,01$). Se estableció como criterio que todas las proteínas consideradas válidas se hubieran identificado con al menos dos péptidos únicos, es decir, dos péptidos que no se compartieran por ninguna otra proteína. Utilizando como umbral de significación 1.30 para el cociente super-SILAC, que establece las proteínas que están

alteradas, en las larvas expuestas a AgNP10 se cuantificaron 41, de las cuales 9 se encontraron inhibidas y 11 sobreexpresadas (**Tabla IV.11**). En las larvas expuestas a AgNP60 se cuantificaron 48 proteínas, de las cuales 7 se encontraron inhibidas y 11 sobreexpresadas (**Tabla IV.12**).

Tabla IV.11. Proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras su exposición a AgNP10.

Número GI	Nombre de la proteína	Nombre común	R _{SILAC}	RSD
292619319	Retinol-binding protein 4, plasma like	RBP4	-5,88	9,23
18858427	muscle creatine kinase a	CKMA	-4,87	19,70
116325975	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5AF1	-3,84	4,97
300244539	tubulin, alpha 1, like 2	TUBA1B	-3,22	12,69
41054601	voltage-dependent anion-selective channel protein 2	VDAC2	-2,58	10,90
166795887	vitellogenin 1 precursor	VTG1	-1,96	3,54
18859301	guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	-1,72	6,76
18859505	tropomyosin alpha-1 chain	TPMA	-1,38	10,26
449310793	actin, cytoplasmic 2	ACTBB	-1,38	11,76
113678458	vitellogenin 2 isoform 1 precursor	VTG2	1,32	15,37
18858249	actin, alpha cardiac muscle 1	ACTC1B	1,34	18,63
47087061	aspartate aminotransferase 2a	GOT2A	2,14	14,36
38488700	bisphosphoglycerate mutase 1a	BPGM	2,20	9,81
153945848	myosin binding protein Hb	MYBPHB	2,21	15,74
45387533	actinin alpha 3b	ACTN3B	2,31	4,89
41053385	fast skeletal myosin alkali light chain 1	MYL1	3,19	17,42
160333682	heat shock cognate 71 kDa protein	HSP70	3,68	7,67
27545277	elongation factor 1-gamma	EEFG1	3,83	13,11
169234746	tenascin W precursor	TNN	4,53	13,15
18859297	parvalbumin-2	PVALB2	5,50	9,31

Tabla IV.12. Proteínas alteradas en larvas de pez cebra tras su exposición a AgNP60.

Número GI	Nombre de la proteína	Nombre común	R _{SILAC}	RSD
48762657	alpha-enolase	ENO1B	-3,70	9,69
528486709	voltage-dependent anion channel 3 isoform X1	VDAC2	-2,70	12,65
166795887	vitellogenin 1 precursor	VTG1	-2,38	3,54
41152439	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	-2,78	7,56
41152028	Prohibitin	PHB	-2,17	10,16
18858427	muscle creatine kinase a	CKMA	-1,41	19,70
292619319	Retinol-binding protein 4, plasma like	RBP4	-1,41	15,20
70778800	actin, alpha skeletal muscle	ACTC1B	1,30	11,67
66472252	slow myosin heavy chain 1	SMYHC1	1,39	15,97
238776848	myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle	MYHZ1.2	1,44	8,39
18859505	tropomyosin alpha-1 chain	TPMA	1,48	3,78
366039974	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5AF1	1,62	4,38
85662707	collagen alpha-1(II) chain precursor	COL27A1A	1,73	2,03
45387533	actinin alpha 3b	ACTN3B	1,85	4,89
153945848	myosin binding protein Hb	MYBPHB	2,71	0,92
41053385	fast skeletal myosin alkali light chain 1	MYL1	2,74	11,62
18858959	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	3,37	5,37
53749651	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIL1	3,68	3,27

Las proteínas diferencialmente expresadas se clasificaron de acuerdo con su función biológica utilizando la base de datos “Gene Ontology” (GO). En la **Figura IV.46** se muestran los procesos implicados para las proteínas desreguladas tras la exposición a cada una de las AgNPs. Se observaron alteradas proteínas estructurales relacionadas con el movimiento y el desarrollo, así como otras proteínas que participan en mecanismos de defensa, apoptosis o en el metabolismo de otras proteínas.

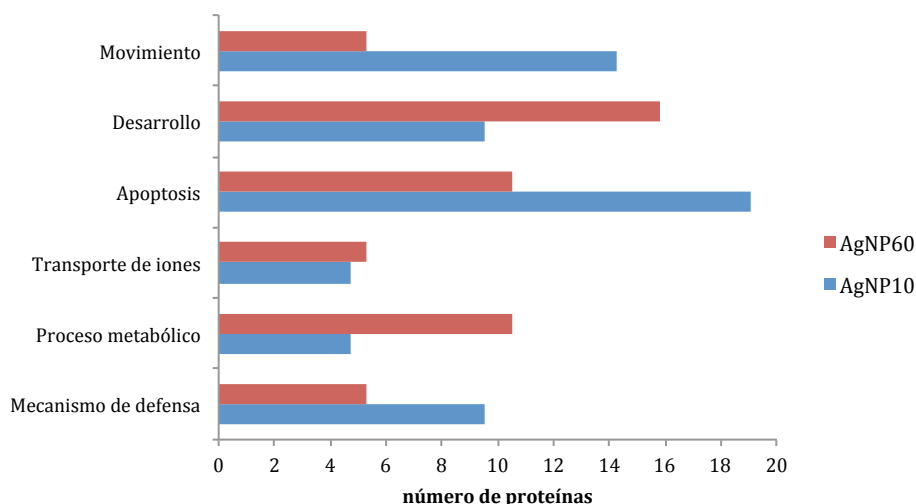


Figura IV.46. Funciones biológicas de las proteínas alteradas en larvas de pez cebra expuestas a AgNP10 y AgNP60 utilizando la base de datos Gene Ontology.

A grandes rasgos, se puede apreciar una alteración mayor en las proteínas que proceden de las larvas expuestas a AgNP10. Analizando en detalle las proteínas encontradas en este experimento, se pueden ver alteradas principalmente proteínas estructurales, lo que puede dar lugar a alteraciones morfológicas e histológicas.

En primer lugar, se encontró la proteína de unión a retinol 4 (rbp4), inhibida en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -5,88$) y AgNP60 ($R_{\text{silac}} = -1,48$). Esta proteína está asociada con malformaciones específicas del estadio del tubo neural craneal y del ojo. Niveles bajos de la misma pueden causar alteraciones morfológicas e histológicas (Bavik *et al.*, 1996). Cabe destacar que en las larvas expuestas a AgNP10, la alteración fue mayor que para la exposición a AgNP60, resultados que concuerdan con los previos realizados sobre células HepG2. Estos resultados también son similares a los obtenidos por otros autores. Por ejemplo, Osborne *et al.* 2013 determinaron la toxicidad en embriones de pez cebra expuestos a nanopartículas de Ag de 10 y 35 nm, llegando a la conclusión de que los embriones que sobrevivieron a la exposición de AgNPs tuvieron anomalías morfológicas, como colas dobladas, cabeza pequeña y una disminución del saco vitelino. La proteína parvalbúmina-2 (pvalb2) que apareció sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = +5,50$), está involucrada en la relajación tras la contracción del organismo mediante la regulación de Ca^{2+} . Su sobreexpresión se ha asociado previamente con varios trastornos del sistema nervioso y algunas formas de cáncer (Cates *et al.*, 2002). Una alteración de la misma provoca una disminución de la longitud, el área de superficie y la densidad de las mitocondrias por homeostasis de Ca^{2+} , provocando así daño mitocondrial (Lichvarova *et al.*, 2018). Asimismo, una alteración en la homeostasis está

relacionada con la generación de ROS (Hansson *et al.*, 2008), siendo este último un efecto involucrado con la muerte celular inducida por AgNP10 observada ya previamente en el modelo *in vitro*. Además, las condiciones de estrés oxidativo debido a la exposición a AgNPs pueden acelerar la degradación de proteínas por autofagia (Cuello *et al.*, 2012). Curiosamente, en este experimento se encontró la proteína vitogenina 1 (vtg1) relacionada con funciones autofágicas, y la cual se encuentra inhibida en las larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -1,96$) y AgNP60 ($R_{\text{silac}} = -2,38$). La alfa tubulina 1, inhibida tras la exposición a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -3,22$), pertenece a la familia de la tubulina, uno de los componentes principales de los microtúbulos, componente principal del citoesqueleto. Dicha proteína desempeña un papel esencial en la ovogénesis y la embriogénesis del pez cebra (Liu & Lessman, 2007). Concretamente, una inhibición de ésta debería afectar al comportamiento locomotor de las larvas, así como a su desarrollo neuronal (Chen *et al.*, 2012), hecho que también podría relacionarse con las imágenes obtenidas por láser, en las cuales, se mostraba una mayor acumulación de dichas AgNPs en la zona de la cabeza. Powers *et al.* 2011, por ejemplo, demostró que las AgNPs de menor tamaño (10nm) tras 24 horas de exposición provocaba una disminución en la actividad locomotora de las larvas de pez cebra mientras que las AgNPs de mayor tamaño (50nm) causaban hiperactividad. Otra proteína estructural alterada tras la exposición a ambos tipos de AgNPs fue la tropomiosina (tpma). En este caso, apareció inhibida en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -1,96$) y sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +1,48$). Dicha proteína se une a los filamentos de actina en las células no musculares y desempeña un papel central en la asociación con el complejo de troponina. Cuando el músculo está relajado, la tropomiosina bloquea en la actina los sitios de unión a la miosina, lo que previene la contracción muscular. Tanto la actina, inhibida en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -1,38$) y sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +1,30$), como la miosina de cadena ligera (myl1), sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = +3,19$) y AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +2,74$), o la miosina de cadena pesada, sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +1,44$), desempeñan funciones importantes en la miogénesis del pez cebra, así como en la regulación de ATP para generar el movimiento del organismo.

Además de proteínas estructurales, se han encontrado alteradas proteínas involucradas en el ciclo celular y/o apoptosis. Por ejemplo, la proteína prohibitina (phb) juega un papel importante en la proliferación y en la regulación del ciclo celular (Kling & Forlin, 2009). Bajos niveles de la misma ($R_{\text{silac}} = -2,17$) pueden inducir apoptosis por efecto de las AgNP60 (Tang, 2006). La proteína peptidil-prolil cis-trans isomerasa (pin1) ($R_{\text{silac}} = +3,68$), sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP60, es esencial para la supervivencia celular y para unirse a muchas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y la transcripción génica (Lavoie *et al.*, 2003). Una alteración de esta proteína puede dar lugar a un deterioro de los mecanismos que contribuyen a

la estabilización de proteínas en la célula, así como a otros procesos celulares esenciales (Carneiro *et al.*, 2015). Otra proteína alterada en larvas expuestas a AgNP10 fue la proteína eefg1 ($R_{\text{silac}} = +3.83$); diversos estudios sugieren que esta proteína puede afectar tanto a la síntesis de proteínas como a la organización del citoesqueleto. Una sobreexpresión de la misma acelera la muerte celular por apoptosis (Duttaroy *et al.*, 1998). La tenascina (tnc) ayuda a regular la proliferación, adhesión y la migración celular (Tucker *et al.*, 2006), su sobreexpresión tras la exposición a AgNP10, indica la activación de un mecanismo de defensa contra el efecto de dichas nanopartículas ($R_{\text{silac}} = +4.53$). La proteína ribosómica rpl10a se encontró inhibida en larvas expuestas a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = -2.78$). Se ha demostrado que una actividad reducida en las proteínas ribosómicas puede conducir a la deformación del cerebro y el tronco del cuerpo (Uechi *et al.*, 2006).

Del mismo modo, se vieron involucradas en la toxicidad de las AgNPs varias proteínas relacionadas con la producción de energía. Entre ellas, se encontró la proteína de choque térmico 71 KDa (hsp70) ($R_{\text{silac}} = +3.68$), chaperona molecular implicada en una amplia variedad de procesos celulares entre los que destaca la protección del proteoma contra el estrés (Streicher, 2019) o la maduración, el plegamiento y la degradación de proteínas (Miller & Fort, 2018). Una sobreexpresión de HSP70 atenúa las vías dependientes e independientes de caspasas e inhibe la apoptosis neuronal (Sabirzhanov *et al.*, 2012). Asimismo, la proteína creatina quinasa (ckma), altamente inhibida en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -4.87$), participa en procesos de transferencia de energía intracelular (Dickmeis *et al.*, 2001). Una inhibición podría producir cardiotoxicidad durante el desarrollo de las larvas (Li *et al.*, 2011). La proteína VDAC2, una de las más afectadas tras la exposición tanto a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -2.58$) como a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = -2.70$) pertenece a la familia de proteínas VDAC, las cuales, median el intercambio de metabolitos pequeños e iones entre el citosol y el espacio inter membrana de las mitocondrias, desempeñando un papel crucial en la regulación de las funciones metabólicas y energéticas de las mitocondrias. Algunos estudios han revelado que una inhibición de esta proteína podría afectar al metabolismo celular y a la función mitocondrial normal alterando la homeóstasis de calcio y provocando así la muerte celular (Barmatz & Mizrachi, 2012).

A su vez, también se vieron afectadas las funciones de la ATP sintasa de la mitocondria (atp5f1b), inhibida en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = -3.84$) y sobreexpresada en larvas expuestas a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +1.62$). Dicha proteína es la responsable de transferir protones fuera de la membrana interna para generar energía electroquímica (Du *et al.*, 2019). Su inactivación detiene la etapa de gastrulación durante el desarrollo embrionario (Pinho *et al.*, 2013), así como obstaculiza la fosforilación oxidativa, disminuyendo así los niveles de oxígeno y produciendo hipoxia (Chen *et al.*, 2013). Sin embargo, una sobreexpresión de la misma puede

actuar como un mecanismo de defensa tras un efecto tóxico moderado como el causado por las AgNP60. El colágeno (col27a1a) ($R_{\text{silac}} = +1,73$) es otra de las proteínas que predominan en la matriz extracelular y que se vió sobreexpresada por efecto de la exposición a las AgNP60. Dicha proteína contribuye al desarrollo del pez cebra y a la homeostasis del pez adulto (Jessen, 2015). Además, desempeña diversas funciones entre las que destaca la regeneración de tejidos (Fang et al., 2010), por lo que una sobreexpresión podría deberse a una activación del mecanismo de regeneración de los tejidos afectados tras la exposición a AgNP60. La proteína alfa-actinina 3b (actn3b), que regula la adhesión celular, la diferenciación celular, la motilidad celular dirigida y la señalización intracelular (Holterhoff *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2003), se encontró sobreexpresada tanto en larvas expuestas a AgNP10 ($R_{\text{silac}} = +2,31$) como en las que se expusieron a AgNP60 ($R_{\text{silac}} = +1,85$). Esta sobreexpresión puede deberse a un intento por los organismos de contrarrestar el efecto tóxico inducido por las AgNPs. Por último, se observó una sobreexpresión de la proteína lactato deshidrogenada (ldha) en larvas expuestas a AgNP60, cuya función, entre otras, es la de actuar como marcador para la detección de hipoxia. Algunos estudios sugieren que una sobreexpresión de esta proteína indica un grado elevado de hipoxia celular (Roesner *et al.*, 2016; Ton *et al.*, 2003).

La **Figura IV.47** muestra un resumen de los mecanismos de toxicidad que se proponen y que estarían implicados tras la exposición de las larvas de pez cebra a AgNPs de dos tamaños diferentes.

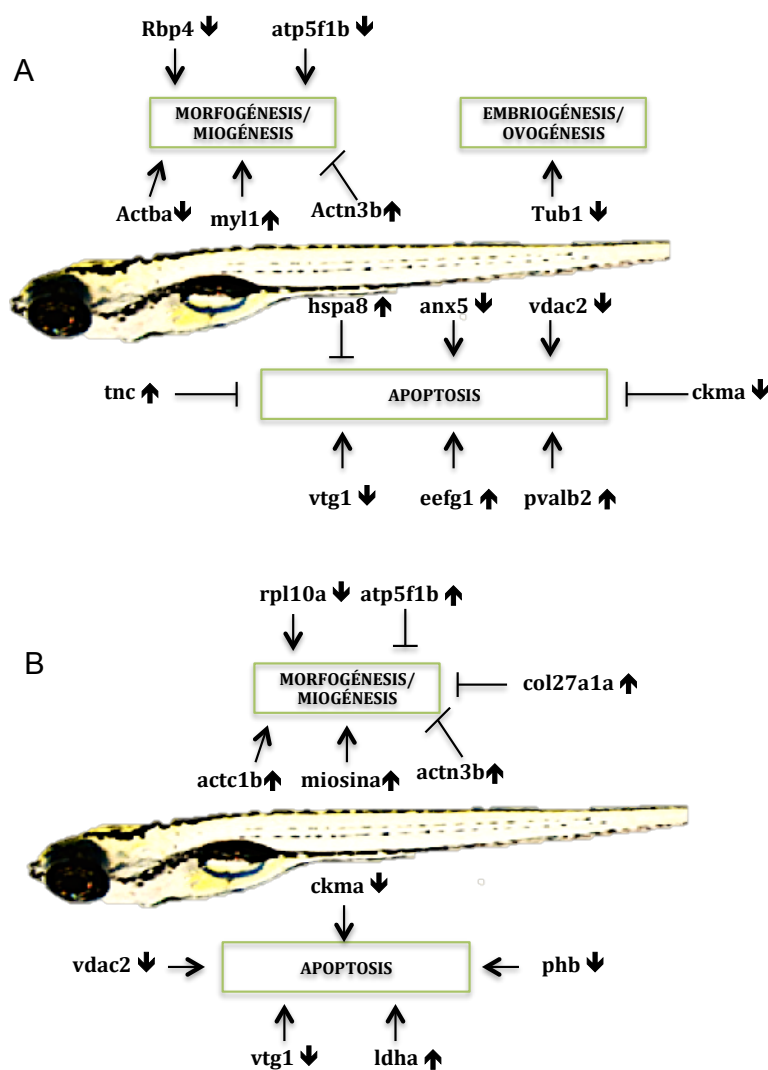


Figura IV.47. Mecanismos de toxicidad implicados en la toxicidad provocada por A) AgNP10 y B) AgNP60 de en larvas de pez cebra.

Tal y como muestra la **Figura IV.47**, se encuentran alteradas ciertas proteínas estructurales en ambos casos, lo que justifica alteraciones morfológicas e histológicas durante el desarrollo embrionario y celular de las larvas expuestas a AgNPs, así como al correcto funcionamiento de sus órganos en formación, especialmente el cerebro, tronco, ojos, aparato locomotor o corazón durante su formación. Cabe destacar que de las proteínas que se encuentran alteradas en ambos tipos de AgNPs, la alteración es más acusada cuando se expusieron las larvas a las AgNPs de menor tamaño. Estos resultados concuerdan con las imágenes obtenidas por ablación láser, en las cuales, se vio una mayor acumulación de las nanopartículas más pequeñas en las larvas, por lo que tendría sentido pensar que las AgNP10 producen una mayor toxicidad en el organismo al igual que pasaba con el sistema *in vitro*. Asimismo, estos resultados concuerdan con otros estudios. Por ejemplo, Xin *et al.* 2015 mostraron daños en el desarrollo neuronal en larvas

expuestas a AgNPS de 4 y 10nm, en donde se mostraba una mayor acumulación de las AgNPs más pequeñas en la cabeza de los embriones, mostrando anomalías, tales como, cabeza y ojo pequeño y defectos cardíacos. En otros casos, se encontraron otras proteínas alteradas para contrarrestar el efecto tóxico inducido por las AgNPs. Nuevamente, se observa que determinados mecanismos de defensa se ven más activados en el caso de la exposición a AgNP10, corroborando así su mayor toxicidad debido principalmente a su elevada acumulación. En otros casos, y al igual que ocurrió en el modelo *in vitro*, las alteraciones se dan por vías diferentes. De la misma forma, se encontraron varias proteínas relacionadas con la apoptosis o alteración del ciclo celular, lo que sugiere un aumento de la muerte celular por apoptosis, responsable de la activación de diferentes mecanismos de defensa en el organismo en desarrollo debido al tratamiento con AgNP10. Sin embargo, en larvas expuestas a AgNP60 se refleja en mayor medida la alteración de otras proteínas en las que se confirman daños mitocondriales, dando lugar al estado de hipoxia, que de forma similar induce a la generación de ROS y, por tanto, la muerte celular. Estos resultados también concuerdan con el estudio de Qiang *et al.* 2020, que observaron una transcripción de dos genes relacionados con la hipoxia y el transporte de membrana en embriones expuestos a AgNPs.

Como conclusión de los estudios realizados en este apartado IV.3., podemos decir que se aplicó el método de semi-cuantificación desarrollado en el punto IV.2. con el fin de conocer la distribución de las AgNP10 y AgNP60 en las larvas de pez cebra. Las imágenes obtenidas mostraron una mayor acumulación de las AgNPs más pequeñas. Estos resultados fueron complementados mediante la estrategia de proteómica cuantitativa (super-SILAC) empleando las larvas de pez cebra como modelo *in vivo* para evaluar el potencial citotóxico de las AgNPs y a su vez para elucidar los mecanismos biomoleculares responsables de los efectos tóxicos observados por cada uno de los tipos de AgNPs así como sus principales diferencias. La combinación de técnicas analíticas con técnicas de proteómica es, por tanto, una estrategia muy conveniente para obtener resultados complementarios en los estudios de toxicología.

V. CONCLUSIONES

Tras la realización de la presente Tesis doctoral ha quedado demostrada la utilidad de combinar la proteómica con técnicas analíticas para llevar a cabo los diferentes estudios toxicológicos. Tras la aplicación de las diferentes técnicas para evaluar la toxicidad de las AgNPs en función de su tamaño de partícula, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Desde un punto de vista **proteómico**, se ha mostrado cómo las AgNPs resultan ser citotóxicas para una gran variedad de líneas celulares en mayor o menor medida. Asimismo, mediante la técnica TEM se comprobó que las nanopartículas cumplían las especificaciones comerciales en términos de tamaño y forma. Por otro lado, se utilizó la técnica AF₄ para estudiar el comportamiento de las AgNPs en el medio celular, mostrando como el radio hidrodinámico aumentaba tras 72 h de exposición en comparación con el medio acuoso, lo que dio lugar a la formación de posibles aglomerados debido principalmente a la presencia de numerosas sales presentes en el medio. A continuación, los estudios de viabilidad celular en las células HepG2 nos llevaron al nivel de concentración óptimo para realizar los estudios de proteómica cuantitativa (5 mg.L⁻¹), observando una disminución de la viabilidad en torno al 50% para las AgNP10 y un 30% para las AgNP60, hecho que hizo extraer una primera conclusión de que el tamaño de partícula podía influir en su toxicidad. Seguidamente, se demostró mediante un ensayo de internalización celular por TEM, que las AgNPs de menor tamaño internalizaban en el núcleo mientras que las AgNP60 solo atravesaban la membrana plasmática, formando aglomerados en pequeñas vacuolas localizadas en el citoplasma. Estos resultados se complementaron de forma cuantitativa por ICP-MS mostrando que un sólo un pequeño porcentaje de AgNPs internalizaba en la célula, concretamente un 7% para las AgNP10 y un 5% para las AgNP60, respectivamente. Asimismo, los experimentos de proteómica cuantitativa *in vitro* (SILAC) han permitido identificar un total de 51 proteínas tras la exposición a AgNP10 y 52 proteínas tras la exposición a AgNP60 en células HepG2. Con respecto a las proteínas de núcleo se identificaron 45 proteínas tras la exposición a AgNP10. Las proteínas alteradas en ambos experimentos permitieron mostrar que únicamente las AgNP10 inducen estrés nucleolar y detienen la biogénesis ribosómica, mientras que ambos tipos de AgNPs inducen estrés oxidativo, daño en el ADN y provocan la activación de diferentes mecanismos de defensa en las células expuestas. Por otro lado, los experimentos de proteómica cuantitativa *in vivo* (super-SILAC) permitieron identificar un total de 20 proteínas tras la exposición a las AgNP10 y 18 proteínas tras la exposición a AgNP60, respectivamente. La aplicación de la estrategia super-SILAC necesitó de una optimización previa al ser la primera vez que esta técnica se aplicaba al modelo del pez

cebra. Las proteínas alteradas, en este caso, demostraron producir alteraciones morfológicas e histológicas durante el desarrollo embrionario y celular de las larvas expuestas a los dos tipos de AgNPs, así como la inducción de diversos problemas neuronales y locomotores. Además, se encontraron proteínas alteradas relacionadas con la muerte celular por apoptosis o alteración del ciclo celular tras la exposición a AgNP10, mientras que tras la exposición a AgNP60, algunas de las proteínas alteradas encontradas confirman daños mitocondriales.

- Desde un enfoque **analítico** se complementaron los resultados obtenidos en el punto anterior con la técnica LA-ICP-MS, mediante la cual se evaluó la acumulación de las AgNP10 y AgNP60 en las larvas de pez cebra a través de la obtención de imágenes. Para ello, previamente fue necesario desarrollar un método de calibración basado en el empleo de una gelatina de pescado de matriz similar a la muestra de interés, en el que se evaluaron diferentes parámetros del propio sistema de ablación e ICP-MS como el tamaño de cráter, velocidad y frecuencia de ablación, así como el volumen de muestra, el flujo del gas transportador o la homogeneidad de la muestra en términos de sensibilidad y reproducibilidad. Para poder llevar a cabo, a su vez, una estrategia de semi-cuantificación, se buscó un patrón interno adecuado que permitiese corregir fluctuaciones tanto instrumentales, de medida, como de la propia muestra, siendo el Au (III) en disolución el más eficiente para este estudio, además de ser fácilmente manipulable. Aplicando el método de calibración propuesto al estudio de acumulación de las AgNPs en las larvas de pez cebra, se observó claramente una mayor internalización de las AgNP10 en las larvas. Además, se apreció una distribución diferente en ambos casos, ya que las AgNPs de menor tamaño se distribuyen de forma bastante regular a lo largo de todo el cuerpo, mientras que las AgNP60 se distribuyen sólo en el área de la cabeza. Por lo tanto, el patrón de captación y distribución de ambas AgNPs son muy diferentes, lo que podría ser debido a la diferencia de tamaño entre ambas. Este estudio, además, se complementó con los resultados proteómicos *in vivo* (superSILAC), ya que una mayor acumulación de las AgNP10 en la larva podría estar relacionado con una mayor alteración proteica y, por tanto, una mayor toxicidad de las mismas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, por tanto, pueden ser empleados como referencia para concienciar y controlar las múltiples aplicaciones que tienen este tipo de nanopartículas, tanto en la industria alimentaria, agricultura, textiles, e incluso en aplicaciones biomédicas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abián, J. Carrascal, M. & Gay.M. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica* **2**, (2008).
- Abramenko, N.B., Demidova, T.B., Abkhalimov, EV., Ershov, B.G., Krysanov, E.Y. & Kustov, L.M. Ecotoxicity of different-shaped silver nanoparticles: Case of zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials* **347**, 89–94 (2018).
- Ackerman, C.M. *et al.* Multimodal LA-ICP-MS and nanoSIMS imaging enables copper mapping within photoreceptor megamitochondria in a zebrafish model of Menkes disease. *Metallomics* **10**, 474-485 (2018).
- Aguilar MA. Síntesis y caracterización de nanoparticulas de plata: Efecto sobre *colletotrichum Gloesporioides*. Tesis doctoral, (2009).
- Akter, M. Stability Enhancement of Silver Nanoparticles Through Surface Encapsulation via a Facile Green Synthesis Approach and Toxicity Reduction. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **30**, (2019).
- Allabashi, R., Stach, W., de la Escosura-Muñiz, A., Liste-Calleja, L. & Merkoç, A. ICP-MS: A powerful technique for quantitative determination of gold nanoparticles without previous dissolving. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 2003-2011 (2009).
- Antonio, D. *et al.* Assessing silver nanoparticles behaviour in artificial seawater by mean of AF4 and spICP-MS. *Marine Environmental Research* **111**, 162-9 (2015).
- Appiah-Opong, R., Commandeur, J. N. M., Istyastono, E., Bogaards, JJ & Vermeulen. N.P.E. Inhibition of Human Glutathione S-transferases by Curcumin and Analogues. *Xenobiotica: the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* **39**, 302–311 (2019).
- Arike, L. & Peil, L. Spectral Counting Label-Free Proteomics. *Methods In Molecular Biology* **1156**, 213–222 (2014).
- AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P. & Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanomaterials. *ACS Nano* **3**, 279–290 (2009).
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D. & Morales, P. Silver nanoparticles applications and toxic risks to human health and environment. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* **7**, 1-23 (2013).
- Ávalos, A., Haza, A.I., Mateo, D. & Morales, P. Effects of silver and gold nanoparticles of different sizes in human pulmonary fibroblasts. *Toxicological Mechanisms and Methods* **25**, 287-295 (2015).
- Ávalos, A., Morales, P & Haza, A.I. Manufactured silver and gold nanoparticles-induced

apoptosis by caspase-pathway in human cell lines. *Toxicological and Environmental Chemistry* **100**, 629-743 (2019).

-Austin, C., Hare, D., Rawling, T., McDonagha, A.M. & Doble, P. Quantification method for elemental bioimaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **25**, 722-725 (2010).

-Austin, C. *et al.* Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bioimaging of soft tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **26**, 1494 (2011).

-Badura, M., Braunstein, S., Zavadiln, J. & Schneider, R.J. DNA Damage and eIF4G1 in Breast Cancer Cells Reprogram Translation for Survival and DNA Repair mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 18767–18772 (2012).

-Bai, G., Smolka, M. B., Schimenti, M.B. & Chronic, J. C. DNA replication stress reduces replicative lifespan of cells by TRP53-dependent, microRNA-assisted MCM2-7 downregulation. *PLoS Genetics* **12** (2016).

-Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J. & Shah, S.I. Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **5**: 244-249 (2005).

-Bantscheff, M. Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1017 (2007).

-Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 939–96 (2012).

-Barmatz, V.S. & Mizrachi, D. VDAC1: from structure to cancer therapy. *Frontiers in Oncology* **2**, 164 (2012).

-Barst, B.D. *et al.* Laser Ablation ICP-MS Co-Localization of Mercury and Immune Response in Fish. *Environmental Science Technology* **45**, 8982–8988 (2011).

-Bartłomiejczyk, T., Lankoff, A. Kruszewski, M. & Szumiel, I. Silver nanoparticles–allies or adversaries?. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **20**, 48-54 (2013).

-Bastos, V. *et al.* The influence of Citrate or PEG coating on silver nanoparticle toxicity to a human keratinocyte cell line. *Toxicological Letters* **13**, 29-41 (2016).

-Braeuning, A. *et al.* Comparative proteomic analysis of silver nanoparticle effects in human liver and intestinal cells. *Journal of Applied Toxicology* **38**, 638-648 (2018).

-Bressan, E. *et al.* Silver Nanoparticles and Mitochondrial Interaction. *International Journal of*

Dentistry, **2013**, 8 (2013).

-Brzoska, K. *et al.* Adaptation of HepG2 cells to silver nanoparticles-induced stress is based on the pro-proliferative and anti-apoptotic changes in gene expression. *Mutagenesis*. 2015.

-Becker, J.S. *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. (3rd edición) Chichester (2007).

-Becker, J.S., Sela, H., Dobrowolska-Iwanek, J. & Zoriy, M. Recent Applications on Isotope Ratio Measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on Biological Samples and Single Particles. *International Journal of Mass Spectrometry* **270**, 1-7 (2008).

-Behera, S., Debata, A. & Nayak P.L. Biomedical applications of silver nanoparticles. *Journal of Asian Science Research* **1**, 27-56 (2011).

-Bhui, D.K., Bar, H., Sarkar, P., Sahoo, G.P., Prasad De, S. & Misra, A. Synthesis and UV-vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution. *Journal of Molecular Liquids* **145**, 33-37 (2009).

-Birka, M. *et al.* Diagnosis of nephrogenic systemic fibrosis by means of elemental bioimaging and speciation analysis. *Analytical Chemistry* **87**, 3321-3328 (2015).

-Böhme, S., Stärk, H.J., Kühnel, D. & Reemtsma, T. Exploring LA-ICP-MS as a quantitative imaging technique to study nanoparticles uptake in *Daphnia magna* and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 5477-5485 (2015).

-Bolea E., Jiménez-Lamana J. & Laborda F. Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**, 2723-2732 (2011).

-Bonta, M., Lohninger, H., Marchetti-Deschmann, M. & Limbeck, A. Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments. *Analyst* **139**, 1521-1531 (2014).

-Bonta, M., Hegedus, B. & Limbeck, A. Application of dried-droplets deposited on pre-cut filter paper disks for quantitative LA-ICP-MS imaging of biologically relevant minor and trace elements in tissue samples. *Analytica Chimica Acta* **908**, 54-62 (2016).

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

-Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J.J. & Hofmann, M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* **88**, 412-419 (2005).

- Briata, P., Bordo, D., Puppo, M., Gorlero, F., Rossi, M., Perrone-Bizzozero, N. & R. Gherzi. Diverse Roles of the Nucleic Acid Binding Protein KHSRP in Cell Differentiation and Disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Rna* **7**, 227–240 (2016).
- Brown, R.J.C., Kumar, Y., Brown, A.S. & Kim, K.H. Memory Effects on Adsorption Tubes for Mercury Vapor Measurement in Ambient Air: Elucidation, Quantification, and Strategies for Mitigation of Analytical Bias. *Environmental Science & Technology* **45**, 7812-7818 (2011).
- Brunelle, J.L., Green, R. Coomassie blue staining, 1st ed., Elsevier Inc. 2014.
- Brzóška, K., Grądzka, I. & Kruszewski, M. Silver, Gold, and Iron Oxide Nanoparticles Alter miRNA Expression but Do Not Affect DNA Methylation in HepG2 Cells. *Materials (Basel)* **29**, 2019.
- Burduşel A.C., *et al.* Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)* **31**, 681 (2018).
- Cabezas-Sánchez, P., García-Calvo, E., Cámara, C. & Luque-García, J.L. A quantitative proteomic approach for unveiling novel mechanisms associated with MeHg-induced toxicity: Effects on the methylation cycle. *Toxicological Research* **5**, 291–302 (2016).
- Cambier, S. *et al.* Fate and effects of silver nanoparticles on early lifestage development of zebrafish (*Danio rerio*) in comparison to silver nitrate. *Science of The Total Environment* **610-611**, 972-982 (2018).
- Campos, A., Danielsson, G., Farinha, A.P., Kuruvilla, J., Warholm, P. & Shotgun, C. Proteomics to unravel marine mussel (*Mytilus edulis*) response to long-term exposure to low salinity and propranolol in a Baltic Sea microcosm. *Journal of Proteomics* **137**, 97–106 (2016).
- Cardoso, P. C. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Hosp. Niños (B. Aires)* **58**, 19-28 (2016).
- Carlson, C. *et al.* Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B* **112**, 13608–13619 (2018).
- Carlson, E.A., Marquez, R.T.F., Du, Y., Wang, L. Xu. & Yan. S.S. Overexpression of 17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Type 10 Increases Pheochromocytoma Cell Growth and Resistance to Cell Death. *BMC Cancer* **15**, 166 (2015).
- Carneiro, M., Gutiérrez-Praena, D., Osório, H., Vasconcelos, V., Carvalho, A.P. & Campos, A. Proteomic analysis of anatoxin-a acute toxicity in zebrafish reveals gender specific responses and additional mechanisms of cell stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **120**, 93-101.

- Carrola, J. *et al.* Macrophage Metabolomics Reveals Differential Metabolic Responses to Subtoxic Levels of Silver Nanoparticles and Ionic Silver. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2020**, 1867–1876 (2020).
- Cates, M.S, Teodoro, M.L. & Phillips, G.N. Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophysical Journal* **82**, 1133–1146 (2002).
- Chai B.J. Huang B.R., Cairns and B.C. Laurent. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Development* **19**, 1656–1661 (2005).
- Chakraborty, C., Sharma, A.R., Sharma, G. & Lee, S.S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology* **14**, 65 (2017).
- Challagundla, K. B. *et al.* Ribosomal Protein L11 Recruits miR-24/miRISC to Repress c-myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 4007–4021 (2017).
- Chaudhury, A. *et al.* Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* **16**, 1449–1462 (2010).
- Chen, X. & Schluesener H.J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicological Letter* **176**, 1-12 (2008).
- Chen, C. & Chiang C. Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters* **62**, 3607-3609 (2008).
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L. & Zhou, B. Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Toxicological and Chemistry* **31**, 2338–2344 (2012).
- Chen, K., Cole, R. & Rees, R. Hypoxia-induced changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle proteome. *Journal of Proteomics* **78**, 477-485 (2013).
- Chen, L., Luo, L., Kang N., He, X., Li, T. & Chen, Y. The Protective Effect of HB01 on Cigarette Smoke Extract-Induced Apoptosis in Airway Epithelial Cells. *International Journal Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **15**, 15-24 (2020).
- Cheng, D., Yang, J. & Zhao Y. Antibacterial materials of silver nanoparticles application in medical appliances and appliances for daily use. *Chinese Medical Equipment Journal* **4**, 26-32 (2004).
- Chiu, C. M., Tsay, Y. G., Chang, C. J. & Lee, S. C. Nopp140 Is a Mediator of the Protein Kinase a Signaling Pathway That Activates the Acute Phase Response α 1-acid Glycoprotein Gene.

Journal of Biological Chemistry **277**, 39102–39111 (2002).

-Cho Y.M., Mizuta, Y., Akagi, J.-i., Toyoda, T., Sone, M. & Ogawa, K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *Journal of Toxicology Pathology* **31**, 73-80 (2018).

-Choi, O. & Hu, Z. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology* **42**, 4583–4588 (2008).

-Choi, J. E. *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology* **100**, 151–159 (2010).

-Choi, S.Y. *et al.* In vitro toxicity of serum protein-adsorbed citrate-reduced gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicology in Vitro* **26**, 229 (2012).

-Cohen, M.S., Stern, J. & Vanni, A.J. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surgical Infections* **8**, 397-403 (2007).

-Cohen, S.M. *et al.* BRG1 co-localizes with DNA replication factors and is required for efficient replication fork progression. *Nucleic Acid Research* **38**, 6909-6919 (2010).

-Contado, C. & Pagnoni, A. TiO₂ in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical Chemistry* **80**, 7594–7608 (2008).

-Contino, A., Macarrone, G., Zimbone, M. & Reitano, R. Tyrosine capped silver nanoparticles: A new fluorescent sensor for the quantitative determination of copper(II) and cobalt(II) ions. *Journal of Colloid and Interface Science* **462**, 216-222 (2016).

-Costa M.L., Escalera R., Manasfi M., de Souza L.F. & Mermelstein C.S. Cytoskeletal and cellular adhesion proteins in zebrafish (*Danio rerio*) myogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **36**, 1117-1120 (2003).

-Courtney G. Havens & Johannes C. Walter. 2011. Mechanism of CRL4 Cdt2, a PCNA-dependent E3 ubiquitin ligase. *Genes Development* **25**, 1568–1582 (2011).

-Coutiño, E.M.R., Ávila, L.L. & Arroyo, H.O. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* **36**, 39-54 (2017).

-Croteau, M.N., Misra, S.K., Luoma, S.N. & Valsami-Jones, E. Silver Bioaccumulation Dynamics in a Freshwater invertebrate after aqueous and dietary exposures to nanosized and ionic, Ag. *Environmental science and technology* **45**, 6600:6607 (2011).

-Cuello, S. Ramos, S. Madrid, Y., Luque-García, J.L. & Cámara, C. Differential protein expression of hepatic cells associated with MeHg exposure: deepening into the molecular mechanisms of toxicity. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 315–324 (2012).

- D'Agostino, L., Caracciolo, V. & Giordano, A. NSP 5a3a's Link to Nuclear-Cyto Proteins B23 and hnRNP-L Between Normal And Aberrant Breast Cell Lines. *Cell Cycle* **9**, 1131–1142 (2010).
- Dan, Y. *et al.* Characterization of Gold Nanoparticle Uptake by Tomato Plants Using Enzymatic Extraction Followed by Single- Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Analysis. *Environmental Science and Technology* **49**, 3007–3014 (2015).
- Dai, A. *et al.* Up-Regulation of KPNB1 Involves in Neuronal Apoptosis following Intracerebral Hemorrhage in Adult Rats. *Neurochemical Research* **40**, 2177–2187 (2015).
- Deeb, S.J., D'Souza, R.C.J., Cox, J., Schmidt-Supprian, M. & Mann, M. Super-SILAC Allows Classification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Subtypes by Their Protein Expression Profiles. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**, 77–89 (2012).
- Delorme-Axford, E., Guimarães, R., Reggiori, F., Klionsky, D.J. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. *Methods* **75**, 3–12 (2015).
- Deng, Q., Guo, T., Zhou, X., Xi, Y., Yang, X. & Ge, W. Cross-talk between Mitochondrial Fusion and the Hippo Pathway in Controlling Cell Proliferation during *Drosophila* Development. *Genetics* **203**, 1777–1788 (2016).
- Dickmeis, T. *et al.* Expression of brain subtype creatine kinase in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development* **109**, 409–412 (2001).
- Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J. & Tolosa, L. Using high-content screening technology for studying drug-induced hepatotoxicity in preclinical studies. *Expert Opinion on Drug Discovery* **12**, 201–211 (2016).
- Duttaroy, A., Bourbeau, D., Wang, X.L. & Wang, E. Apoptosis Rate Can Be Accelerated or Decelerated by Overexpression or Reduction of the Level of Elongation Factor-1 α . *Experimental Cell Research* **238**, 168–176 (1998).
- Echegoyen, Y. & Nerín, C. Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology* **62C**, 16–22 (2013).
- El Badawy, A. M. *et al.* Surface charge dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science and Technology* **45**, 283–287 (2011).
- Fabrega, J., Zhang, R., Renshaw, J.C., Liu, W-T. & Lead, J.R. Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria. *Chemosphere* **85**, 961–966 (2011).
- Fang, M., Adams, J.S., McMahan, B.L., Brown, R.J. & Thom, J. The expression patterns of minor fibrillar collagens during development in zebrafish. *Gene Expression Patterns* **10**, 315–322 (2010).

- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. & Whitehouse, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64 (1989).
- Ferreira da Silva, B., Pérez, S., Gardinally, P., Shingal, R.K., Mozeto, A.A. & Barceló, D. Analytical Chemistry of Metallic Nanoparticles in Natural Environments. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 528-540 (2011).
- Foldbjerg, R. *et al.* Global Gene Expression Profiling of Human Lung Epithelial Cells After Exposure to Nanosilver. *Toxicological Sciences* **130**, 145–157 (2012).
- Foriel, S., Willems, P., Smeitink, J., Schenck, A. & Beyrath, J. Mitochondrial diseases: *Drosophila melanogaster* as a model to evaluate potential therapeutics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **63**, 60–5 (2015).
- Frick, D.A. & Günther, D. Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **27**, 1294-1303 (2012).
- Gálvez, V. & Tanarro C. Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y salud en el trabajo* **56**, 6-12 (2010).
- EFSA Scientific Committee. Scientific Opinion. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal* **9**, 2140 (2011).
- García, C.C., Lindner, H., Niemax, K. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry—current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **24**, 14-26 (2009).
- García-Calvo, E., Cabezas-Sánchez, P. & Luque-García, J.L. In-vitro and in-vivo evaluation of the molecular mechanisms involved in the toxicity associated to CdSe/ZnS quantum dots exposure. *Chemosphere* **263** (2021).
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X. & Xing, M.M.Q. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance and toxicity. *International Journal of Nanomedicine* **9**, 2399–2407 (2014).
- Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J.R. & Mann, M. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nature Methods* **7**, 383–5 (2010).
- Gerber, S. A. Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W. & Gygi, S.P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *PNAS* **100**, 6940–6945 (2003).

- Gholap, D. Verhulst, J. Ceelen, W., Vanhaecke, F. Use of pneumatic nebulization and laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry to study the distribution and bioavailability of an intraperitoneally administered Pt-containing chemotherapeutic drug. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 2121–2129 (2012).
- Gigault, J., Zhang, W., Lespes, G., Charleux, B. & Grassl, B. Asymmetrical flow field-flow fractionation analysis of water suspensions of polymer nanofibers synthesized via RAFT-mediated emulsion polymerization. *Analytica Chimica Acta* **28**, 116–21 (2014).
- Gioria, S. *et al.* Proteomics study of silver nanoparticles on Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro* **50**, 347–372 (2018).
- Gliga, A., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B. & Karlsson, H.L. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology* **11**, 11 (2014).
- Gómez Martín, M.C. Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Monografías De La Real Academia Nacional De Farmacia (2010).
- González-Moragas, L., Roig, A. & Laromaine, A. C. Elegans as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Advances in Colloid and Interface Science* **219**, 10–26 (2015).
- Goshe, M.B. & Smith, R.D. Stable isotope-coded proteomic mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 101 (2003).
- Gray, E.P. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environmental Science Technology* **47**, 14315–14323 (2013).
- Grzelak, A. *et al.* Crucial role of chelatable iron in silver nanoparticles induced DNA damage and cytotoxicity. *Redox Biology* **15**, 435–440 (2018).
- Guérin, R., Arseneault, G., Dumont, S. & Rokeach, L.A. Calnexin is Involved in Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress in the Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4404–4420 (2008).
- Gunther, D. & Hattendorf, B. Elemental fractionation in LA-ICP-MS, Laser-Ablation-ICP-MS. *Earth Science* **29**, 83–91 (2001).
- Günther, D. & Hattendorf, B. Solid Sample Analysis Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 255–265 (2005).
- Hagendorfer, H. *et al.* Size-fractionated characterization and quantification of nanoparticle release rates from a consumer spray product containing engineered nanoparticles. *Journal of*

Nanoparticle Research **12**, 2481–2494 (2010).

-Hames, B.D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. 1998

-Hameed, B.S., Shekhar, B., Nagaraj, B. & Suresh, A. Chapter 19 - Chromatography as an Efficient Technique for the Separation of Diversified Nanoparticles. *Nanomaterials in Chromatography* **503**, 518 (2018).

-Hanley, T.A. Saadawi, R., Zhang, P., Caruso, J.A. & Figueroa-Landero, J. Separation of silver ions and starch modified silver nanoparticles using high performance liquid chromatography with ultraviolet and inductively coupled mass spectrometric detection. *Spectrochimica Acta Part B At. Spectrosc* **100**, 173–179 (2014).

-Hansson, M.J. *et al.* Bcl-2 suppresses Ca²⁺ release through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and inhibits Ca²⁺ uptake by mitochondria without affecting ER calcium store content. *Cell calcium* **44**, 324–338 (2008).

-Hare, D.J. *et al.* Three-dimensional atlas of iron, copper, and zinc in the mouse cerebrum and brainstem. *Analytical Chemistry* **84**, 3990–3997 (2012).

-Heilen, W. 2005. Silicone Resins and their Combinations. Vincentz Network Publishing, Hannover.

-Hein, N., Hannan, K.M., George, A.J., Sanij, E. & Hannan, R.D. The Nucleolus: An Emerging Target For Cancer Therapy. *Trends in Molecular Medicine* **19**, 643–654 (2013).

-Helfrich, A & Bettmer, J. Analysis of gold nanoparticles using ICP-MS-based hyphenated and complementary ESI-MS techniques. *International Journal of Mass Spectrometry* **307**, 92–98 (2011).

-Hernandez, P., Muller, M. & Appel, R.D. Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies. *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 235 (2006).

-Hernández, J.M., Floyd, D.H. Weilbaecher, K.N., Green, P.L. & Boris-Lawrie, K. *et al.*, 2008. Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene* **27**, 4757–4767.

-Hoeftlich, K. P. & Ikura, M. Radixin: Cytoskeletal Adopter and Signaling Protein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2131–2136 (2004).

-Hoet, P.H.M., Bruske-Hohlfeld, I. & Salata O.V. Nanoparticles- Known and unknown health effects. *Journal of Nanobiotechnology* **2**, 12 (2004).

- Hoffmann, E., Lüdke, C. & Scholze, H. Is laser-ablation-ICP-MS an alternative to solution analysis of solid samples?, Fresenius. *Journal of Analytical Chemistry* **359**, 394–398 (1997).
- Holder, A. L., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. & Koshland, C. P. Particle-induced artifacts in the MTT and LDH viability assays. *Chemical Research in Toxicology* **25**, 1885–92 (2012).
- Holterhoff, C.K. Saunders, R.H., Brito, E.E. & Wagner, D.S. Sequence and expression of the zebrafish alpha-actinin gene family reveals conservation and diversification among vertebrates. *Developmental Dynamics* **238**, 2936–2947 (2009).
- Homstrom, T.H. *et al.* c-Jun supports ribosomal RNA processing and nucleolar localization of RNA helicase DDX21. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 7046-53 (2008).
- Hoque M., Khosravi K., Newman K. & Metcalfe C. Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1233**, 109-115 (2012).
- Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S. & Iwahashi, H. In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* **25**, 605-619 (2012).
- Horn, I. & Gunther, D. 2006. The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: implications for LA-ICP-MS. *Applied Surface Science* **17**, 641-651 (2006).
- Hou, T., Chen, H., George, H., Greene, W., Horn, R. & Horn, R.G. Mercury Vapor Sorption and Amalgamation with a Thin Gold Film. *ACS Applied Materials Interfaces* **7**, 23172-23181 (2015).
- House, J.S. *et al.* Low-Dose Silver Nanoparticle Surface Chemistry and Temporal Effects on Gene Expression in Human Liver Cells. *Small*, 16: 2000299 (2020).
- Howard, A.G. On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring* **12**, 135–142 (2010).
- Howe, P.D. & Dobson, S. World Health Organization & International Programme on Chemical Safety. Silver and silver compounds: environmental aspects. World Health Organization (2002). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42553>.
- Hsiao, C-Y., Yang, S-C., Ahmed, A. & Fang, J-Y. Laser ablation and topical drug delivery: a review of recent advances. *Expert Opinion on Drug Delivery* **16**, 937-952 (2019).
- Hsin, Y. H., Chen, C-F., Huang, S., Shih, T-S., Lai, P-S., Chueh, P.J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 179, 130–139 (2008).

- Huang, L. *et al.* KPNA2 Promotes Cell Proliferation and Tumorigenicity in Epithelial Ovarian Carcinoma through Upregulation of c-Myc and Downregulation of FOXO3a. *Cell Death & Disease* **4**, (2013).
- Hwang, C.B. *et al.* Synthesis, characterization, and highly efficient catalytic reactivity of suspended palladium nanoparticles. *Journal of Catalysis* **195**, 336–341 (2000).
- Iguchi, Y. *et al.* Tumor-specific delivery of BSH-3R for boron neutron capture therapy and positron emission tomography imaging in a mouse brain tumor model. *Biomaterials* **56**, 10–7 (2015).
- Ishimi, Y. Regulation of MCM2-7 function. *Genes & Genetics Systems* **93**, 125-133 (2018).
- Ivask, A. *et al.* Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells *In Vitro*. *PloS One* **9**, (2014).
- Izmer, A., Gholap, D., De Houwer, K., Cuycckensb, F. & Vanhaecke, F. A pilot study on the use of laser ablation-ICP-mass spectrometry for assessing/mapping the distribution of a drug and its metabolites across the body compartments of rats. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **27**, 413-418 (2012).
- James, A., Wang, Y., Raje, H., Rosby, R. & DiMario, P. Nucleolar Stress with and without p53. *Nucleus* **5**, 402–426 (2014).
- Jenkins, S.V. *et al.* Rapid determination of plasmonic nanoparticle agglomeration status in blood. *Biomaterials* **51**, 226–237 (2015).
- Jessen, J.R. Recent advances in the study of zebrafish extracellular matrix proteins. *Developmental Biology* **401**, 110-121 (2015).
- Johnston H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Read, S., Hankin, S. & Stone, V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **40**, 328-346 (2010).
- Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M. & Sánchez, E. Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol In Vitro* **23**, 1491-1496 (2009).
- Jung, J., Oh, H., Noh, H., Ji, J. & Kim, S. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *Journal of Aerosol Science* **37**, 1662–1670 (2006).

- Karas, M. & Krüger, R. Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews* **103**, 427–439 (2003).
- Kausar B. *et al.* Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicology in vitro*, **38**: 179-192 (2017).
- Kaur, J. & Tikoo, K. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food Chemical Toxicology* **51**, 1-14 (2013).
- Kawata, K., Osawa, M. & Okabe, S. In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. *Environmental Science and Technology* **43**, 6046-51 (2009).
- Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J-F., Renaut, J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* **8**, 2514–2530 (2008).
- Kiko, K. & Ito, T. Mass Spectrometry-Based Approaches Toward Absolute Quantitative Proteomics. *Current Genomics* **9**, 263–274 (2008).
- Kim, S. *et al.* Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology In Vitro* **23**, 1076-1084 (2009).
- Kim, S. & Ryu, D. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of Applied Toxicology* **33**, 78 – 89 (2013).
- Kim, E. R., Selyutina, A.A., Buldakov, I.A., Evdokimova, V., Ovchinnikov, L.P. & Sorokin, A.V. The Proteolytic YB-1 Fragment Interacts with DNA Repair Machinery and Enhances Survival during DNA Damaging Stress. *Cell Cycle* **12**, 3791–3803 (2013).
- Kling, P. & Forlin, L. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 1985-1993 (2009).
- Krzyżewska, I., Komosińska, J.K., Rosik-Dulewska, C., Czupioł, J. & Antoszczyszyn-Szpicka, P. Inorganic nanomaterials in the aquatic environment: behavior, toxicity, and interaction with environmental elements. *Archives of Environmental Protection* **42**, 87–101 (2016).
- Kittler, S., Sengstock, C., Diendorf, J. & Köller, M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials* **22**, 4548–4554 (2010).
- Koch, J., von Bohlen, A., Hergenrödera, R. & Niemaxa, K. Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **19**, 267-272 (2004).

- Konz, I., *et al.* Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **405**, 3091-3096 (2013).
- Koopmans, G.F., Hiemstra, T., Molleman, B., Regelink, I.C. & Comans, R.N.J. Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation of Manufactured Silver Nanoparticles Spiked into Soil Solution. *Journal of Chromatography A* **1392**, 100–109 (2015).
- Krishnaraj, C., Harper, S.L. & Yun, S.I. In vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Hazardous Materials* **301**, 480–491 (2016).
- Kruszewski, M., Brzóska, K., Brunborg, G., Yaa Boahene, N. & Scientif, N. Toxicity of Silver Nanomaterials in Higher Eukaryotes. *Advances in Molecular Toxicology* **5**, 179-218 (2011).
- Krystek, P.W. A review on approaches to bio distribution studies about gold and silver engineered nanoparticles by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal* **105**, 39–43 (2012).
- Kundu, M. *et al.* Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH11. *Blood* **100**, 2449 (2002).
- Kuwano, H. *et al.* Guidelines for Diagnosis and Treatment of Carcinoma of the Esophagus April 2012 edited by the Japan Esophageal Society. *Esophagus* **12**, 1–30 (2015).
- Laborda, F., Jiménez-Lamana, J., Boleaa, E. & Castillo, J. Selective identification characterization and determination of dissolved silver(I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **26**, 1362–1371 (2011).
- Laborda, F., Bolea, E. & Jiménez-Lamana, J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: A powerful tool for nanoanalysis. *Analytical Chemistry* **86**, 2270–2278 (2014).
- LaBine, G.O., Molloy, P.P. & Christensen, J.R. Determination of Elemental Composition in Soft Biological Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Method Validation. *Applied spectroscopy* **75**, 1262-1277 (2021).
- Laborda, F. *et al.* Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Analytical Chemical Acta* **904**, 10-32 (2016).
- Lacave, J. M. *et al.* Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Science of The Total Environment* **642**, 1209-1220 (2018).

- Langen, H. *et al.* ^{15}N and ^{13}C labeling of cells for identification and quantification of proteins on 2D gels. In Proceedings from the 3rd Siena 2-D Electrophoresis Meeting; Siena, Italy. D.F. Hochstrasser, L. Bini, V. Pallini (Ed) (1998).
- Lapresta-Fernández, A. *et al.* A general perspective of the characterization and quantification of nanoparticles: Imaging, spectroscopic, and separation techniques. *Critical Reviews in Solid State and Materials Science* **39**, 423–458 (2014).
- Lavoie, S.B., Albert, A.L. & Vincent, M. Unexpected roles of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1. *Medecine Science* **19**, 1251-8 (2003).
- Le, A. *et al.* Inhibition of Lactate Dehydrogenase a Induces Oxidative Stress and Inhibits Tumor Progression. *PNAS* **107**, 2037–2042 (2010).
- Lee, D.K. & Kang, Y.S. Synthesis of silver nanocrystallites by a new thermal decomposition method and their characterization. *Etri Journal* **26**, 252–256 (2004).
- Lee, H.Y., Park, H.K., Lee, Y.M., Kim, K. & Park, S.B. A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications* **28**, 2959-2961 (2007).
- Lee, C-H., Dias, A.P., Jedrychowski, M., Patel, A.H., Hsu, J.L. & Reed. R. Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Research* **36**, 4708–4718 (2008).
- Lee, G.E., Kim, J.H., Taylor, M. & Muller, M.T. DNA Methyltransferase 1-associated Protein (DMAP1) Is a Co-repressor That Stimulates DNA Methylation Globally and Locally at Sites of Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 37630–37640 (2010).
- Lee, J.W. *et al.* G6PD Up-Regulation Promotes Pancreatic Beta-Cell dysfunction. *Endocrinology* **152**, 793–803 (2011).
- Lee, W.W. & Chan, W.T. Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **30**, 1245–1254 (2015).
- León-Silva, S., Fernández-Luqueño, F. & López-Valdez, F. Silver Nanoparticles (AgNP) in the Environment: a Review of Potential Risks on Human and Environmental Health. *Water Air and Soil Pollution* **227**, 306 (2016).
- Lewicka, Z.A., Benedetto, A.F., Benoit, D. & William, W.Y. The structure, composition, and dimensions of TiO₂ and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens. *Journal of Nanoparticle Research* **13**, 3607–3617 (2011).
- Li, L., Zhang, H., Li, T. & Zhang, B. Involvement of Adenosine Monophosphate-Activated

Protein Kinase in Morphine-induced Cardioprotection. *Journal of Surgical Research* **169**, 179-187 (2011).

-Li, P., Li, S., Wang, Y., Zhang, Y. & Zhi Han, G. Green synthesis of β -CD functionalized monodispersed silver nanoparticles with enhanced catalytic activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **520**, 26-31.

-Li, J.Y. *et al.* Silver nanoparticles modulate mitochondrial dynamics and biogenesis in HepG2 cells. *Environmental pollution* **256**, 113430 (2020).

-Lichvarova, L., Henzi, T., Safiulina, D., Kaasik, A. & Schwaller, B. Parvalbumin alters mitochondrial dynamics and affects cell morphology. *Cellular and Molecular Life Science* **75**, 4643-4666 (2018).

-Lim, J. P., Shyamasundar, S., Gunaratne, J., Scully, O.J., Matsumoto, K. & Bay. H.B. YBX1 Gene Silencing Inhibits Migratory and Invasive Potential via CORO1C in Breast Cancer in Vitro. *BMC Cancer* **17**, 201–216 (2017).

-Lindström, M. S. & Zhang, Y. Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-Binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 15568–15576 (2008).

-Link, S.; Burda, C.; Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. Laser-induced shape changes of colloidal gold nanorods using femtosecond and nanosecond laser pulses. *Journal of Physical Chemistry B* **104**, 6152–6163 (2000).

-Liu, F. SEC Characterization of Au Nanoparticles Prepared through Seed-Assisted Synthesis. *Chroma* **66**, 791–796 (2007).

-Liu, J. & Lessman, C.A. Soluble tubulin complexes, γ -tubulin, and their changing distribution in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary, oocyte and embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology* **147**, 56-73 (2007).

-Liu, J. & Hurt, R.H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environmental Science Technology* **44**, 2169-75 (2010).

-Liu, J., Sonshine, D.A., Shervani, S. & Hurt, R.H. Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* **4**, 6903 – 6913 (2010a).

-Liu, R., Li, Q., Smith L.M. Detection of large ions in time-of-flight mass spectrometry: Effects of ion mass and acceleration voltage on microchannel plate detector response. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **25**, 1374–1383 (2014).

- Liu, X. *et al.* Differential lethal and sublethal effects in embryonic zebrafish exposed to different sizes of silver nanoparticles. *Environmental Pollution* **248**, 627-634 (2019).
- Loeschner, K., Navratilova, J., Kobler, C., Molhave K. Detection and characterization of silver nanoparticles in chicken meat by asymmetric flow field flow fractionation with detection by conventional or single particle ICPMS. *Food Chemistry* **181**, 78-84 (2013).
- Lok, C.N. *et al.* Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *Journal of biological inorganic chemistry. A publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **12**, 527 (2007).
- Lomonte, B. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. *Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica*, 92-93 (2009).
- López-Heras, I., Sanchez-Diaz, R., Anunciação, D.S., Madrid, Y. & Luque-Garcia, J.L. Effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles on cell cycle arrest and invasiveness in hepatocarcinoma cells revealed by quantitative proteomics. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* **5**, 1000225 (2014a).
- López-Serrano, A., Muñoz-Olivas, R., Sanz-Landaluze, J., Olasagasti, M., Rainieri, S. & Cámara, C. Comparison of bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles in zebrafish eleutheroembryos. *Environmental Pollution* **191**, 207 (2014).
- Lu, X., Shao, J., Li, H. & Yu, Y. Early Whole-Genome Transcriptional Response Induced by Benzo[a]pyrene Diol Epoxide in a Normal Human Cell Line. *Genomics* **93**, 332–342 (2009).
- Lu, Y., Zhang, B., Zhuo-Xia, J., Wu, W. & Zheng-Qiao, L. Hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis and caspase-8 and Bcl-2 expression induced by injectable seed extract of *Coix lacryma-jobi*. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* **10**, 303-307.
- Lu, J., Shu, R. & Zhu, Y. Dysregulation and Dislocation of SFPQ Disturbed DNA Organization in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease. Dementia* **1**, 1311–1321 (2018).
- Luo, R., Su, X., Xu, W. Zhang, S., Zhuo, X. & Ma, D. Determination of arsenic and lead in single hair strands by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Scientific Report* **7** 3426 (2017).
- Luoma, S.N. Silver nanotechnologies and the environment. *The Project on Emerging Nanotechnologies Report* **15** (2008).
- Luque-García, J.L., Cabezas-Sanchez, P., Camara, C. Proteomics as a tool for examining the toxicity of heavy metals. *Trends in Analytical Chemistry (TrAC)* **30**, 703-716 (2011).

- Luque-García, J.L., Sánchez-Díaz, R., López-Heras, I. Cámara, C. & Martín, P. Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles. *Trends in Analytical Chemistry (TrAC)* **43**, 254-268 (2013).
- Ma, Y.B., Lu, C-J., Junaid, M., Jia, P-P. Potential adverse outcome pathway (AOP) of silver nanoparticles mediated reproductive toxicity in zebrafish. *Chemosphere* **307**, 320-328 (2018).
- Mahajan, A., Arya, A. & Chundawat, T.S. Green synthesis of silver nanoparticles using green alga (*Chlorella vulgaris*) and its application for synthesis of quinolines derivatives. *International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* **49**, 1927-1937 (2019).
- Majumdar, S. et al. Applications of synchrotron??-XRF to study the distribution of biologically important elements in different environmental matrices: A review. *Analytical Chimica Acta* **755**, 1-16 (2012)
- Makarov, M. Denisov, E. & Lange, L. Performance Evaluation of a High-field Orbitrap Mass Analyzer. *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **18**, 1391-1396 (2009).
- Mamidipudi, V., Mamidipudi, V., Dhillon, N.K., Parman, T., Miller, L.D., Lee, K.C. & Cartwright, C.A. RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints. *Oncogene* **26**, 2914-2924 (2007).
- Mann, M. & Wilm, M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends in Bioanalytical Science* **20**, 219-224 (1995).
- Mann, M. 2006. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 952-958 (2006).
- Marcus, K. Quantitative Methods in Proteomics. *Methods in Molecular Biology* **893**, (2012).
- Marchione, R., Leibovitch, S.A. & Lenormand, J.L. The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 3603-3616 (2010).
- Martínez-Gutiérrez, F. et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **8**, 328-336 (2013).
- Maurer-Jones M.A., Lin Y.S. & Haynes C.L. Functional assessment of metal oxide nanoparticle toxicity in immune cells. *ACS Nano* **4**, 3363-3373 (2010).
- McGillicuddy, E. et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment* **575**, 231-246 (2017).
- Mcshan, D., Ray, P.C. & Yu, H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and*

Drug Analysis **22**, 116-27 (2014)

-Medina, C., Santos- Martínez, M.J., Radomski, A., Corrigan, O.I. & Radomski, M.W. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology* **150**, 552-558 (2017).

-Metreveli, G., Philippe, A. & Schaumann, G.E. Disaggregation of silver nanoparticle homoaggregates in a river water matrix. *Science Total Environment* **535**, 35-44 (2015).

-Miliszkiewicz, N. Calibration for Elemental Dental Tissue Analysis by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (2015).

-Miliszkiewicz, N., Walas, S., Tobiasz, A., Kołodziej M. & Szostek, K. Calibration for Elemental Dental Tissue Analysis by Laser Ablation Inductively Coupled PlasmaMass Spectrometry. *Analytical Letters* **50**, 1345-1359 (2017).

-Miller, D.J. & Fort, P.E. Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Frontiers in Neuroscience* **12**, 821 (2019).

-Mirzaei, H. Modern Proteomics – Sample Preparation. *Analysis and Practical Applications* **919**, (Springer) (2016).

-Mishra, A.R., Zhen, J., Tang, X. & Goering, P.L. Silver Nanoparticle-Induced Autophagic-Lysosomal Disruption and NLRP3-Inflammasome Activation in HepG2 Cells Is Size-Dependent. *Toxicology and Science* **150**, 473-87 (2016).

-Mitrano, D.M. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**, 115–121 (2012).

-Mitrano, D.M., Ranville, J.F., Bednar, A., Kazor, K., Hreingd, A.S. & Higgins, C.P. Tracking dissolution of silver nanoparticles at environmentally relevant concentrations in laboratory, natural, and processed waters using single particle ICP-MS (spICP-MS). *Environmental Science: Nano* **1**, 248–259 (2014).

-Monge, M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química* **105**, 33–41 (2009).

-Montazerolghaem, M., Nyström, L., Engqvist, H. & Ott, M.K. Zebrafish: A possible tool to evaluate bioactive ions. *Acta Biomaterials* **19**, 10–4 (2015).

-Monperrus, M., Pécheyran, C. & Bolliet, V. Imaging Differential Mercury Species Bioaccumulation in Glass Eels Using Isotopic Tracers and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Applied Sciences* **10**, 2463 (2020).

- Montalvo-Quirós, S. Gómez-Graña, S. Palacios, A., Vallet-Regí, M., Prados-Rosales, R.C., González, B. & Luque-García, J.L. Silver containing mesoporous silica nanoparticles as novel antibacterial agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **197**, 111405 (2021).
- Montalvo-Quirós, S., Luque-García, J.L. Combination of bioanalytical approaches and quantitative proteomics for the elucidation of the toxicity mechanisms associated to TiO₂ nanoparticles exposure in human keratinocytes. *Food and Chemical Toxicology* **127**, 197-205 (2019).
- Moore, J. O. *et al.* Effects of Ultraviolet B Exposure on the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Murine Skin. *Photochemistry and Photobiology* **80**, 587–595 (2004).
- Moraleja, I. *et al.* Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**, 2308-2318 (2016).
- Moreno-Martín, G., León-González, M.E. & Madrid, Y. Simultaneous determination of the size and concentration of AgNPs in water samples by UV-vis spectrophotometry and chemometrics tools. *Talanta* **188**, 393-403.
- Mudalige, T.K., Qu, H. & Linder, S.W. Asymmetric flow-field flow fractionation hyphenated ICP-MS as an alternative to cloud point extraction for quantification of silver nanoparticles and silver speciation: Application for nanoparticles with a protein corona. *Analytical Chemistry* **87**, 7395–7401 (2015).
- Mukherjee S.G., O'Claonadh, N., Casey, A. & Chambers, G. Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines. *Toxicological In Vitro* **26**, 238-51 (2012).
- Müller-McNicoll, M. *et al.* SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export. *Genes & Development* **30**, 553-566 (2016).
- Nakata, D., S. *et al.* The RNA Helicase DDX39B and Its Paralog DDX39A Regulate Androgen Receptor Splice Variant AR-V7 Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **483**, 271–276 (2017).
- Nanodatabase. 2015. Resource Document. Danish Consumer Council, Danish Ecological Council and DTU Environment. <http://nanodb.dk/en/> Accessed: October 15, 2015.
- Nicol, S. M. *et al.* The RNA Helicase p68 (DDX5) is Selectively Required for the Induction of p53-dependent p21 Expression and Cell-cycle Arrest after DNA Damage. *Oncogene* **32**, 3461–3469 (2013).

- Niehaus, R. Sperling, M. Karst, U. Comparison of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and micro-X-ray fluorescence spectrometry for elemental imaging in *Daphnia magna*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **30**, 2056-2065 (2015).
- Niehoff, A.C. *et al.* Quantitative Bioimaging to Investigate the Uptake of Mercury Species in *Drosophila melanogaster*. *Analytical Chemistry* **87**, 10392-10396 (2015).
- Nguyen, D.N. A label-free colorimetric sensor based on silver nanoparticles directed to hydrogen peroxide and glucose. *Arabian Journal of Chemistry* **11**, 1134-1143 (2018).
- Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C.B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 13291-13295 (2009).
- Ning, X. *et al.* Calcyclin-Binding Protein Inhibits Proliferation, Tumorigenicity, and Invasion of Gastric Cancer. *Molecular Cancer Research: Mcr* **5**, 1254-1262 (2007).
- Nishimura, K., T. *et al.* Perturbation of Ribosome Biogenesis Drives Cells into Senescence through 5S RNP-mediated p53 Activation. *Cell Reports* **10**, 1310-1323 (2015).
- Nosrati, N., Kapoor, N.R. & Kumar, V. DNA damage stress induces the expression of Ribosomal Protein S27agene in a p53-dependent manner. *Gene* **559**, 44-51 (2015).
- Oberdöster, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine* **267**, 89-105 (2010).
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D. & Chait, B.T. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **96**, 6591 (1999).
- Olausson, K. H., Nistér, M. & Lindström. M.S.p53-Dependent and-Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells* **1**, 774-798 (2012).
- Olesik, J.W., Gray, P.J. Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **27**, 1143-1155 (2012).
- Ong, S.E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **1**, 376 (2002).
- Ong, S.E. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology* **1**, 252 (2005).
- Ong, S.E. & Mann, M. A. Practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nature Protocols* **6**, 2650-2660 (2006).

- Osborne, O.J., Johnston, B.D., Moger, J. & Baalousha, M. Effects of particle size and coating on nanoscale Ag and TiO₂ exposure in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Nanotoxicology* **7**, 1315-24 (2013).
- Ottoni, C.A., Lima Neto, M.C., Léo, P., Ortolan, B.D., Barbieri, E. & De Souza, A.O. Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere* **239**, 124698 (2020).
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali A. & Gorman, A.M. The Integrated Stress Response. *EMBO Reports* **17**, 1374–1395 (2016).
- Pal, S., Tak, Y.K. & Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 1712-20 (2007).
- Palzs, B. & Suhal, S. Fragmentation pathways of protonated peptides. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 508–548 (2005).
- Park, J.B. *et al.* 2016. IDH2 Deficiency Impairs Mitochondrial Function in Endothelial Cells and Endothelium-dependent Vasomotor Function. *Free Radical Biology & Medicine* **94**, 36–46 (2016).
- Park, M.V. *et al.* The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* **32**, 9810-9817 (2011b).
- Pecoraro, R. *et al.* Evaluation of the effects of silver nanoparticles on *Danio rerio* cornea: Morphological and ultrastructural analysis. *Microscopy Research and Technique* **82**, 1297-1301 (2019).
- Peng, Y.T., Chen, P., Ouyang, R.Y. & Song, L. 2015. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis* **20**, 1135–1149 (2015).
- Pérez-Surio, A. F., & Oliver, A.C. Nanopartículas de plata en envases de uso alimentario. *Revista De Salud Ambiental* **15**, 80-87 (2015).
- Peters, R.J.B. Herrera Rivera, Z., van Bommel, G. Marvin, H.J.P., Weigel, S. & Bouwmeester, H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **406**, 3875–3885 (2014).
- Peters, R. *et al.* Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **30**, 1274–1285 (2015).

- Philippe, A. & Schaumann, G.E. Evaluation of hydrodynamic chromatography coupled with uv-visible, fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors for sizing and quantifying colloids in environmental media. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
- Phukan, H. *et al.* Silica-coated Magnetic Nanoparticles Impair Proteasome Activity and Increase the Formation of Cytoplasmic Inclusion Bodies in Vitro. *Scientific Reports* **6**, 29095 (2016).
- Piao, M. J. *et al.* Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* **201**, 92–100 (2011).
- Pinho, B.R., Santos, M.M., Fonseca-Silva, A., Valentão, P., Andrade, P. & Oliveira, M.A. How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: an in vivo model for testing mitochondria-targeted drugs. *British Journal of Pharmacology* **169**, 1072–90 (2012).
- Pisonero, J., Fliegel, D., Gunther, D. High efficiency aerosol dispersion cell for laser ablation ICP-MS. *Journal American Society of Mass Spectrometry* **17**, 922–931. (2006).
- Poitrasson, F., Mao, X., Freydier, R. & Russo, R.E. Comparison of ultraviolet femtosecond and nanosecond laser ablation inductively coupled mass spectrometry analysis in glass, monazite and zircon. *Analytical Chemistry* **75**, 6184–6190 (2003).
- Poda, A.R. *et al.* Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1218**, 4219–4225 (2011).
- Poon, H. F., Vaishnav, R.A., Butterfield, D.A., Getchell, M.L. & Getchell, T.V. 2005. Proteomic Identification of Differentially Expressed Proteins in the Aging Murine Olfactory System and Transcriptional Analysis of the Associated Genes. *Journal of Neurochemistry* **94**, 380–392 (2005).
- Pope, A. & Dockery D. Health effects of fine particle air pollution: lines that connect. *Journal of Air & Waste Management Association* **56**, 709–742 (2006).
- Powers, C.M., Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Badireddy, A.R. & Padilla, S. Silver Nanoparticles Alter Zebrafish Development and Larval Behavior: Distinct Roles for Particle Size, Coating and Composition. *Neurotoxicology and Teratology* **33**, 708–714 (2011).
- Pozebon, D., Dressler, V. & Scheffler, G. L. Recent applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for biological sample analysis: a follow-up review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **32** (2017).

- Qiang, L.Y. *et al.* Silver Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Uptake, Growth and Molecular Responses. *International journal of molecular sciences* **21**, 1876 (2020).
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M.S. & Tahir M.B. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells* **7**, 1-20 (2017).
- Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **27**, 76–83 (2009).
- Ramachandran, R., Krishnaraj, C., Abhay Kumar, V.K., Harper, S.L., Kalaichelvan, T.P. & Yun, S-I. In vivo toxicity evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles and gold nanoparticles on adult zebrafish: a comparative study. *Biotechnology* **8**, 441 (2018).
- Ramos, K., Ramos, L., Cámara, C., & Gómez-Gómez, M.M. Characterization and quantification of silver nanoparticles in nutraceuticals and beverages by AF4-ICP-MS. *Journal of Chromatography A* **1371**, 227-236 (2014).
- Ramos, K., Gomez-Gomez, M., Cámara, C., & Ramos, L. Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle icpms. *Talanta* **151**, 83-90 (2016).
- Ramos, K., Ramos, L., & Gomez-Gomez, M. Simultaneous characterisation of silver nanoparticles and determination of dissolved silver in chicken meat subjected to in vitro human gastrointestinal digestion using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Food Chemistry* **822**, 828 (2017).
- Rauniyar, N., McClatchy, D.B. & Yates, J.R. Stable isotope labeling of mammals (SILAM) for in vivo quantitative proteomic analysis. *Methods* **61**, 260–268 (2013).
- Reifschneider, O. *et al.* Quantitative bioimaging of platinum in polymer embedded mouse organs using laser ablation ICP-MS. *Metallomics : integrated biometal science* **5**, 1440 (2013).
- Reimer, L. & Kohl, H. Transmission Electron Microscopy, in: Curr. Protoc. Microbiology (2008)
- Riccio, E.K. *et al.* Molecular and immunological tools for the evaluation of the cellular immune response in the neotropical monkey *Saimiri sciureus*, a non-human primate model for malaria research. *Malaria Journal* **14**, 166 (2015).
- Riepe, H., Gómez, M., Cámara, C. & Bettner, J. Feasibility studies on the suppression of HfO₄⁺ mass interferences on platinum determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) by modification of the sample introduction system. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **15**, 507–511 (2000).

- Riggelen, J. V., A. Yetil & Felsher, D.W. MYC as a Regulator of Ribosome Biogenesis and Protein Synthesis. *Nature Reviews: Cancer* **10**, 301–309 (2010).
- Roesner, A., Hankeln, T. & Burmester, T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *The journal of experimental biology* **209**, 2129–2137.
- Sabirzhanov, B., Stoica, B.A., Hanscom, M., Piao, C. S. & Faden, A.I. Over-expression of HSP70 attenuates caspase-dependent and caspase-independent pathways and inhibits neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry* **123**, 542–554 (2012).
- Saatz, J. *et al.* Location and speciation of gadolinium and yttrium in rootMedians of *Zea mays* by LA-ICP-MS and ToF-SIMS. *Environmental Pollution* **216**, 245–252 (2016).
- Sahu, S.C., Zheng, J., Yourick, J.J., Sprando, R.L. & Gao, X. Toxicogenomic responses of human liver HepG2 cells to silver nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology* **35**, 1160–8 (2015).
- Šála, M. & Šelih, V.S. Van-Elteren, J.T. Gelatin gels as multi-element calibration standards in LA-ICP-MS bioimaging: fabrication of homogeneous standards and microhomogeneity testing. *Analyst* **142**, 3356 (2017).
- Shah, T.R. & Misra, A. Proteomics, Elsevier Ltd (2011).
- Sama, R.R.K., Ward, C. L. & Bosco, D. A. Functions of FUS/TLS from DNA Repair to Stress Response: Implications for ALS. *ASN Neuro* **6** (2014).
- Samontha, A., Shiowatana, J. & Siripinyanond, A. Particle size characterization of titanium dioxide in sunscreen products using sedimentation field-flow fractionation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **399**, 973–978 (2011).
- Santos, C.M., Wagner, M., Wua, B., Scheider, J., Oehlmann, J., Cadore, S. & Becker, J.S. Biomonitoring of metal contamination in a marine prosobranch snail (*Nassarius reticulatus*) by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* **80**, 428–433 (2009).
- Sartori, S., Bianchi, L., Di Vece, F. & Tombesi, P. Liver-directed therapies for liver metastases from neuroendocrine neoplasms: Can laser ablation play any role?. *World Journal of Gastroenterology* **26**, 3118–3125 (2020).
- Sato-Berrú, R., Redón, R., Vázquez-Olmos, A. & Saniger, J.M. Silver nanoparticles synthesized by direct photoreduction of metal salts. Application in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **40**, 376–380 (2009).
- Savage, N., Thomas, T.A. & Duncan J.S. Nanotechnology applications and implications research supported by the US Environmental Protection Agency STAR grants program.

Journal of Environmental Monitoring **9**,1046-1054 (2007).

-Scheffer, A., Engelhard, C., Sperling, M. & Buscher, W. ICP-MS as a new tool for the determination of gold nanoparticles in bioanalytical applications. *Bioanalytical Chemistry* **390**, 249 (2008).

-Schimpf, M *et al.* Field-Flow Fractionation Handbook, John Wiley & Sons, Inc (2000).

-Sela, H., Karpasa, Z., Cohenc, H., Zakona, Y. & Zeiri, Y. Preparation of stable standards of biological tissues for laser ablation analysis. *International Journal of Mass Spectrometry* **307**, 142-148 (2011).

-Seth, A., Stemple, DL. & Barroso,I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Disease Models & Mechanisms* **6**, 1080-1088 (2013).

-Shao, J. *et al.* Aggregation of SND1 in Stress Granules Is Associated with the Microtubule Cytoskeleton during Heat Shock Stimulus. *Anatomical Record* **300**, 2192–2199 (2017).

-Sharma, V.K., Siskova, K.M., Zbovil, R. & Gardea-Torresdey, J.L. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science* **204**, 15–34 (2014).

-Shaulian E & Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400 (2001).

-Shumail, H., Khalid, S., Ahmad, I., Khan, H., Amin, S. & Ullah, B. Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles through Plants. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets* **21**, 994-1007 (2021).

-Smitha, S., Gupta, S.K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A.C. & Rahman, Q. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health* **11**, 1-11 (2012).

-Sötebier, A., Weidner, S., Jakubowski, N. & Panne, U. 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. *Journal of Chromatography A* **1468**, 102-108 (2016).

-Standing. K.G. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 595 (2003).

-Stärk, H.J. & Wennrich, R. A new approach for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using thin layers of spiked agarose gels as references. *Analytical Bioanalytical Chemistry* **399**, 2211-2217 (2010).

- Starenki, D., Hong, S. K., Lloyd, R.V. & Park, J.I. Mortalin (GRP75/HSPA9) upregulation Promotes Survival and Proliferation of Medullary Thyroid Carcinoma Cells. *Oncogene* **34**, 4624 (2015).
- Stijn J.M. *et al.* A novel “wave” signal smoothing and mercury removing device for laser ablation quadrupole and multiple collector ICP-MS analysis: application to lead isotope analysis, *Analytical Chemistry* **88**, 5783-5789 (2016).
- Stoehr, L.N. Shape matters: effects of silver nanospheres and wires on human alveolar epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology* **8**, 8-36 (2011).
- Stoiber, T., Croteau, M.N., Römer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R. & Luoma, S.N. Influence of hardness on the bioavailability of silver to a freshwater snail after waterborne exposure to silver nitrate and silver nanoparticles. *Nanotoxicology* **9**, 918-27 (2015).
- Streicher, J.M. The Role of Heat Shock Proteins in Regulating Receptor Signal Transduction. *Molecular Pharmacology* **95**, 468-474 (2019).
- Sung, J. H. *et al.* Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicological Sciences* **108**, 452-461 (2009).
- Symes, A.J. *et al.* Quantitative Analysis of BTF3, HINT1, NDRG1 and ODC1 Protein overexpression in Human Prostate Cancer tissue. *PLoS One* **9**, e84295 (2013).
- Tafforeau, L.C. *et al.* The Complexity of Human Ribosome Biogenesis Revealed by Systematic Nucleolar Screening of Pre-rRNA Processing factors. *Molecular Cell* **51**, 539–551 (2013).
- Tang, M.K. Comparative proteomic analysis reveals a function of the novel death receptor-associated protein BRE in the regulation of prohibitin and p53 expression and proliferation. *Proteomics* **6**, 2376-85 (2006).
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Heinzmann, U., Scharamel, P. & Heyder, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental Health Perspectives* **109**, 547-551 (2001).
- Telgmann, L., Metcalfe C. D. & Hintelmann, H. Rapid size characterization of silver nanoparticles by single particle ICP-MS and isotope dilution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **29**, 1265-1272 (2014).
- Temgire, M. K. & Joshi, S. S. Optical and structural studies of silver nanoparticles. *Radiation Physics and Chemistry* **71**, 1039–1044 (2004).
- Tiede, K., Tear, S.P., Helen, D. & Boxall, A. Imaging of engineered nanoparticles and their aggregates under fully liquid conditions in environmental matrices. *Water Research* **43**, 3335-

3343 (2009).

-Timerbaev, A.R., Pawlak, K., Gabbiani, C. & Messori, L. Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 1120–1138 (2011).

-Tinkle, S. S. et al. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environmental Health Perspectives* **111**, 1202–1208 (2003).

-Tomé-Carneiro, J., Crespo, M.C., García-Calvo, E., Luque-García, J.L. Dávalos, A. & Visioli, F. Proteomic evaluation of mouse adipose tissue and liver following hydroxytyrosol supplementation. *Food Chemical Toxicology* **107**, 329–338 (2019).

-Ton, C., Stamatiou, D. & Liew, C.C. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiological Genomics* **13**, 97-106 (2003).

-Tres A. Nanotecnología contra los tumores: nuevas perspectivas en la terapéutica del cáncer. Accesible en www.boloncol.com (2016).

-Trop, M. et al. Silver coated ressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. *The journal of Trauma* **60**, 648-652 (2006).

-Tsai, N.P. & Wei, L.N. RhoA/ROCK1 Signaling Regulates Stress Granule Formation and Apoptosis. *Cellular Signalling* **22**, 668–675 (2010).

-Tsolakidou, A. et al. Gene Expression Profiling in the Stress Control Brain Region Hypothalamic Paraventricular Nucleus Reveals a Novel Gene Network Including Amyloid Beta Precursor Protein. *Genomics* **11**, 546 (2010).

-Tsuji, T., Watanabe, N. & Tsuji, M. Laser-induced morphology change of silver colloids: formation of nano-size wires. *Applied Surface Science* **211**, 189–193 (2003).

-Tucker, R.P., Drabikowski, K., Hess, J.F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R. & Adams, J.C. Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: Evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evolutionary Biology* **6**, 60 (2006).

-Uechi, T. et al. Ribosomal Protein Gee Knockdown Causes Developmental Defects in Zebrafish. *PLoS One* **1**, e37 (2006).

-Urquhart, K. R. et al. A Novel Heat Shock Protein Alpha 8 (Hspa8) Molecular Network Mediating Responses to Stress- and Ethanol-related behaviors. *Neurogenetics* **17**, 91–105 (2016).

-Vance, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**, 1769-1780 (2015).

- Verleysen, E., Van Doren, E., Waegeneers, N., De Temmerman, O.J., Daoud Francisco, M.A. & Mast, J. TEM and SP-ICP-MS Analysis of the Release of Silver Nanoparticles from Decoration of Pastry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 3570–3578 (2015).
- Verma, P. & Maheshwari, S.K. Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors. *International Journal of Nano Dimensions* **10**, 18-36 (2019).
- Vickerman, J. & Winograd, N. Cluster TOF-SIMS Imaging and the Characterization of Biological Materials. Cluster Secondary Ion Mass Spectrometry. *Principles and Applications*, 269–312 (2013).
- Villaseñor, A., Greatti, C., Boccongellic, M. Todoli, J.L. Quantitative elemental analysis of polymers through laser ablation – inductively coupled plasma by using a dried droplet calibration approach, DDCA. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **32**, 587 (2017).
- Von Goetz, N., Fabricius, L., Glaus, R., Weitbrecht, V. Günther, D. & Hungerbühler, K. Food Additives and Contaminants- Part A Chemical, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment **30**, 612–620 (2013).
- Vrček, I.V., Žuntar, I., Petlevski, R., Pavičić, I., Sikirić, M.D., Ćurlin, M. & Goessler, W. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environmental Toxicology* **31**, 679-692 (2016).
- Wagner, S. First steps towards a generic simple preparation scheme for inorganic engineered nanoparticles in a complex matrix for detection, characterization, and quantification by asymmetric flow-field flow fractionation coupled to multi-angle light scattering and ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **30**, 1286–1296 (2015).
- Walczak, A.P. et al. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* **7**, 1198–1210 (2013).
- Wang, X. et al. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. *Small* **27**, 201301597 (2013).
- Wan, K., Tsuchihashi, K., Kanda, K., Shimoji, K., Mizuta, K. N α Acetyltransferase NatA is Involved in Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **77**, 631–638 (2013).
- Wang, J., Chen, W., Wei, W. & Lou, J. Oncogene TUBA1C Promotes Migration and Proliferation in Hepatocellular Carcinoma and Predicts a Poor Prognosis. *Oncotarget* **8**, 96215–96222 (2017).
- Wang, X. et al. Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver

HepG2 cells and in mice. *Journal of Applied Toxicology* **39** (2019).

-Wei, H., Li, L., Yunping, W. & Guifang, W. Determination of mercury in water by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Huanjing Huaxue-Environmental Chemistry* **39**, 1726-1728 (2020).

-Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E. & Warscheid, B. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* **7**, 340–350 (2007).

-Williams, T.F., Mirando, A.C., Wilkinson, B., Francklyn, C. S. Lounsbury, K. M. Secreted Threonyl-tRNA Synthetase Stimulates Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *Scientific Reports* **3**, 1317 (2013).

-Wu, W.W. *et al.* Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of Proteome Research* **5**, 651–658 (2006).

-Xia, G. *et al.* The effect of silver nanoparticles on zebrafish embryonic development and toxicology. *Artificial Cells* **44**, 1116–1121 (2016).

-Xiang, Y., Q. *et al.* Effects of DNAJB11 Gene-silencing on Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma SMMC7721. *Cells Tumor* **37**, 433–440 (2017).

-Xin, Q., Rotchell, J.M., Cheng, J., Yi, J. & Zhang, Q. Silver nanoparticles affect the neural development of zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology* **35**, 1481–92 (2015).

-Xin, L., Wang, J., Fan, G., Che, B., Wu, Y., Guo, S. & Tong, J. Oxidative stress and mitochondrial injury-mediated cytotoxicity induced by silver nanoparticles in human A549 and HepG2 cells. *Environmental Toxicology* **31**, 1691-99 (2016).

-Xu, X., Caswell, K.K., Kabisatpathy, S., Brodhacker, K.L. & Scrivens, W.A. Size and shape separation of gold nanoparticles with preparative gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1167**, 35–41 (2007).

-Xue, Y., Zhang, T., Zhang, B., Gong, F., Huang, Y. & Tang, M. Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media. *Journal of Applied Toxicology* **36**, 352-60 (2016).

-Xue, Y. *et al.* Comparative cytotoxicity and apoptotic pathways induced by nanosilver in human liver HepG2 and L02 cells. *Human and Experimental Toxicology* **37**, 1293-1309 (2018).

-Yaqoob, A.A., Umar, K. & Mohamad Ibrahim, M.N. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience* **10**, 1369-1378 (2020).

- Yi, J., Lu, G., Li, L., Wang, X., Cao, L., Lin, M., Zhang, S. & Shao, G. DNA Damage-Induced Activation of CUL4B Targets HUWE1 for Proteasomal Degradation. *Nucleic Acids Research* **43**, 4579–4590 (2015).
- Yong, W.H. *et al.* Ribosomal Proteins RPS11 and RPS20, Two Stress-response Markers of Glioblastoma Stem Cells, are Novel Predictors of Poor Prognosis in Glioblastoma Patients. *PLoS One* **10**, e0141334 (2015).
- Guan, J.H., Kang, T., Lu, F., Zhang, Z., Shen, H. & Liu, M. Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoescale Research Letters* **7**, 602 (2012).
- Zakaria-Gomaá. E. Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by *Allium cepa* extract: A green approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **15**, 49-57 (2017).
- Zhang, L., Lukasik, S.M., Speck, N.A. & Bushweller, J. Structural and functional characterization of Runx1, CBF β , and CBF β -SMMHC. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **30**, 147–156 (2003).
- Zhang, Y. & Sun J. A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. *Chinese Journal of Medical Instrumentation* **31**, 35-38 (2007).
- Zhang, S., He, M., Yin, Z., Zhu, E., Hang, W. & Huang, B. Elemental fractionation and matrix effects in laser sampling based spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **31**, 358-382 (2016).
- Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W. & Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Molecular Science* **17**, 1534 (2016).
- Zhao, X. *et al.* Decreased Expression of RPS15A Suppresses Proliferation of Lung Cancer Cells. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**, 6733–6740 (2015).
- Zhao, G., Wang, Z., Xu, L., Xia, C-X. & Liu, J-X. Silver nanoparticles induce abnormal touch responses by damaging neural circuits in zebrafish embryos. *Chemosphere* **229**, 169-180 (2019).
- Zhen, Y. *et al.* Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol. Plant.* **131**, 542–554 (2007).
- Zhou, X.L, Liu, R. & Liu, J-F. Rapid Chromatographic Separation of Dissoluble Ag(I) and Silver-Containing Nanoparticles of 1–100 Nanometer in Antibacterial Products and Environmental

Waters. *Environmental Science and Technology* **48**, 14516–14524 (2014).

-Zhu, J., Liao, X. & Chen, H. Y. Electrochemical preparation of silver dendrites in the presence of DNA. *Materials Research Bulletin* **36**, 1687–1692 (2001).

-Zhu, L. *et al.* Downregulation of Ubiquitin-Specific Protease 14 (USP14) Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation and Metastasis, but Promotes Apoptosis. *Journal of Molecular Histology* **47**, 69–80 (2016).

-Zou, C & Mallampalli, R.K. Regulation of histone modifying enzymes by the ubiquitin–proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1843**, 694-702 (2013).

-Zuela, N., Bar, D.Z. & Gruenbaum, Y. Lamins in Development, Tissue Maintenance and Stress. *EMBO Reports* **13**, 1070–1078 (2012).

-Zuvarev, R. & Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 5288–5296 (2013).

ANEXO A. TÉCNICAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

En esta sección se detallan algunas de las técnicas analíticas y bioanalíticas más utilizadas en esta Tesis Doctoral para la caracterización, localización y determinación de las AgNPs.

A.1. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LAS AgNPS

La microscopía electrónica es una técnica que permite la caracterización de materiales utilizando para ello un haz de electrones de elevada energía que, manejado a través de lentes electromagnéticas, se proyecta sobre una muestra situada en una columna de alto vacío. Se considera una técnica apropiada y resolutive para la caracterización de nanomateriales debido a su capacidad para visualizar NPs. De esta forma, se puede obtener información sobre su tamaño, estado de agregación o incluso distinguir entre NPs localizadas dentro de las células o tejidos de aquellas que se encuentran adheridas en la superficie (Lapresta-Fernández *et al.*, 2014; Laborda *et al.*, 2016). La técnica de microscopía electrónica más utilizada es la microscopía electrónica de transmisión (**TEM**, Transmission Electron Microscopy), que utiliza un haz de electrones difractados que al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas. Esta técnica presenta una gran resolución espacial, lo que hace posible apreciar características como el tamaño, la forma, la superficie, la estructura cristalina, el grado de agregación y la conductividad eléctrica (Lewicka *et al.*, 2011). Es la más empleada para visualizar NPs, aunque el problema radica en que no siempre se pueden diferenciar bien las NPs del sustrato, especialmente cuando se forman aglomerados. Además, el tratamiento de las muestras y las condiciones de vacío de la cámara pueden provocar la destrucción y modificación de la muestra. Por último, se requiere la muestra en estado sólido y seca, y con un espesor de varios cientos de nm, por lo que para muestras biológicas es más compleja su adecuación (Reimer & Kohl, 2008). Mediante TEM se han realizado diversos estudios para visualizar las AgNPs. Por ejemplo, Asharani *et al.*, 2009 vieron que las AgNPs se localizan en la mitocondria y núcleo celular; Vanwinkle *et al.*, 2009 encontraron que las AgNPs expuestas en células epiteliales alveolares de rata (R3-1), se encontraban como agregados o partículas individuales en el citosol y en el núcleo; también mediante esta técnica se observaron AgNPs distribuidas entre el citoplasma, la mitocondria y el núcleo de células humanas, tales como, A549 y HepG2 (Kruszewski *et al.*, 2011; Bartłomiejczyk *et al.*, 2013).

Por otro lado, las NPs se encuentran en las muestras distribuidas por tamaños por lo que es

necesario llevar a cabo una separación previa antes del análisis. Para ello, se puede emplear la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o las técnicas de fraccionamiento de campo de flujo (FFF). Aunque en esta tesis sólo hemos empleado una de las técnicas de fraccionamiento, vamos a describir brevemente ambas posibilidades.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (**HPLC**, High-Performance Liquid Chromatography) se utiliza comúnmente como técnica de caracterización y separación de nanopartículas metálicas (Hanley *et al.*, 2014; Sötebier *et al.*, 2016; Hameed *et al.*, 2018). En HPLC podemos emplear tres tipos de cromatografía diferentes, según su mecanismo de separación: la más empleada para separar NPs es la cromatografía por exclusión de tamaños (**SEC**, Size Exclusion Chromatography); no obstante, la baja resolución en la separación, la modificación de la integridad original de las NPs, especialmente del agente estabilizante, debido a las altas presiones y las adsorciones inespecíficas de las partículas sobre el material poroso del relleno de la fase estacionaria son las principales limitaciones de dicha técnica (López-Heras, 2014). En una separación mediante mecanismo SEC, es de gran importancia evitar toda interacción química entre el analito y la fase estacionaria, o bien reducirla al máximo para que no se produzca un mecanismo de separación combinado y con ello una mala eficacia de la columna. Esta supuesta no interacción con los analitos junto con un corto tiempo de análisis ha hecho que diversos autores hayan aplicado esta técnica para el análisis de nanopartículas (Wilkison *et al.*, 2001; Liu, 2007; Helfrich & Bettmer, 2011).

En la cromatografía hidrodinámica (**HDC**, Hidrodinamic Chromatography) el uso de una fase estacionaria no porosa reduce las interacciones entre el analito y la fase estacionaria en comparación con la técnica SEC (Hoque *et al.*, 2012). Sin embargo, mediante esta técnica los datos obtenidos son en base al radio hidrodinámico, por lo que el tamaño de la NP puede diferir un poco con aquellos obtenidos mediante TEM. A pesar de la baja resolución de este método, se puede acoplar con otras técnicas como ICP-MS, UV-Vis y detectores de fluorescencia, lo que ha permitido la caracterización de NPs y coloides (Philippe & Schaumann, 2014). En la bibliografía se pueden encontrar estudios de determinación de AgNPs en agua de río (Metreveli *et al.*, 2015) o en lodos residuales (Tiede *et al.*, 2009).

En tercer lugar, la cromatografía de intercambio iónico (**IEC**, Ion Exchange Chromatography) es un método que permite la separación de especies basada en sus propiedades de carga eléctrica. En los intercambiadores aniónicos, los grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen a los aniones del soluto, mientras que los intercambiadores catiónicos contienen puntos cargados negativamente que atraen a los cationes de soluto (Choi *et al.*, 2012). Dicha técnica ha sido aplicada para la separación de iones plata y AgNPs de tamaño entre 1-100 nm en

complementos alimenticios comerciales (Hanley *et al.*, 2014) y en productos antibacterianos y aguas naturales (Zhou *et al.*, 2014).

Las técnicas de fraccionamiento de campo de flujo (**FFF**, Field Flow Fractionation) están sustituyendo a los métodos cromatográficos más convencionales. En cromatografía las NPs se separan a lo largo de la columna como resultado de una diferente afinidad entre la fase móvil y la fase estacionaria; en FFF la separación puede producirse en base a diferentes modos de fraccionamiento: campo de flujo simétrico o asimétrico, temperatura, sedimentación, campo gravitatorio, campo magnético o campo eléctrico. Las dos técnicas más utilizadas en el análisis de NPs son la sedimentación y el flujo asimétrico. La primera es especialmente adecuada para partículas de alta densidad y de tamaño relativamente grande (Contado & Pagnoni, 2008; Samontha *et al.*, 2011; Laborda *et al.*, 2016), mientras que FFF con flujo asimétrico se considera una técnica de flujo más universal, ya que el flujo cruzado afecta a todas las especies inyectadas y puede separar moléculas, coloides, polímeros o nanopartículas en un intervalo más amplio (1 nm-1 μ m) (Schimpf *et al.*, 2000). Por tanto, la técnica de fraccionamiento de flujo con campo de flujo asimétrico (AF₄) es la más empleada para NPs ya que permite obtener información sobre el tamaño y separación en matrices complejas, con una mínima interacción entre las partículas y el canal, alcanzando así una separación dependiente de la difusión. La **Figura A.1** muestra un esquema de esta técnica.

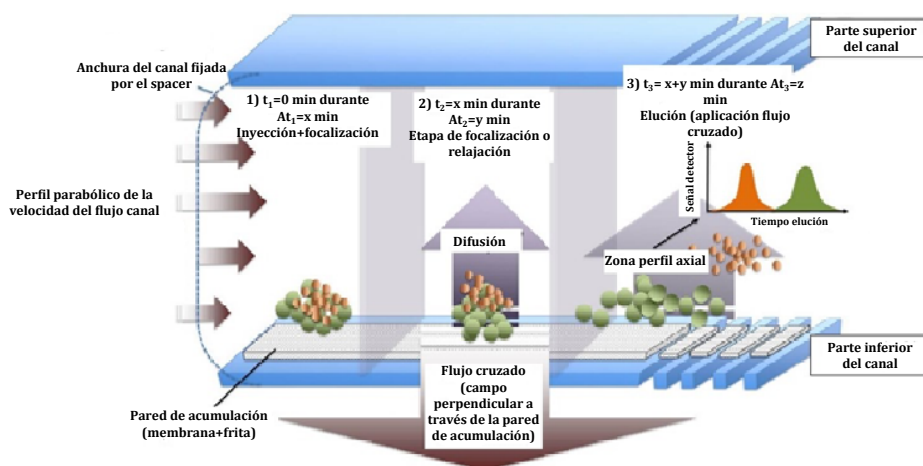


Figura A.1: Esquema de los componentes del canal del AF₄ y de las etapas del análisis (Gigault *et al.*, 2014)

El principio de separación consiste en inyectar las NPs en un canal plano con un flujo laminar tangencial y luego aplicar un campo transversal, denominado flujo cruzado, perpendicular al flujo laminar. El flujo canal es parabólico, es decir, su velocidad es mayor en el centro del canal y prácticamente nula en las paredes, y desplaza la muestra hasta el fondo del canal. Las

NPs quedan retenidas en función de su coeficiente de difusión. Los otros flujos que intervienen en la separación son: flujo de inyección que conecta la válvula de inyección con el canal, permitiendo la introducción de la muestra en el canal, y flujo de focalización que introduce fase móvil durante la primera etapa del análisis con el objetivo de concentrar la muestra en una zona antes de la elución. Finalmente, hay un flujo del detector que es el encargado de conectar el canal con el detector. La suma de dichos flujos debe cumplir la relación expresada en la ecuación A.1:

$$1) V_{\text{flujo focalización}} + V_{\text{flujo inyección}} = V_{\text{flujo cruzado}} + V_{\text{flujo detector}}$$

Ecuación A.1

El tiempo de retención en AF₄ depende únicamente del coeficiente de difusión de las partículas, permitiendo calcular el diámetro hidrodinámico según las ecuaciones de la teoría de FFF (Ecuación A.2) y de Stokes-Einstein (Ecuación A.3).

$$2) tr = W^2 D / 6 D \ln(1 + F_{\text{cross}} / F_{\text{out}})$$

Ecuación A.2

$$3) D = KBT / 3\pi\eta d_h$$

Ecuación A.3

en las que tr , W , D , F_{cross} , F_{out} , K_B , T , η y d_h son el tiempo de retención, el espesor del espaciador, el coeficiente de difusión, el flujo cruzado, el flujo canal, la constante de Boltzman, la temperatura (K), la viscosidad dinámica y el diámetro hidrodinámico, respectivamente (Bolea *et al.*, 2011). De este modo, el tiempo de retención se puede relacionar con el tamaño de las partículas de forma sencilla.

Sin embargo, la teoría FFF no se puede aplicar en todos los tipos de análisis, ya que la información que proporciona puede ser errónea. En casos en los que las NPs se encuentren agregadas, posean una morfología diferente a la esférica o establezcan interacciones con la membrana, estas ecuaciones no son útiles, siendo necesarios otros métodos de calibración de tamaño (patrones de NPs, DLS, confirmación por microscopía electrónica). Existen muchos parámetros que afectan al proceso de separación en AF₄. Algunos de los más importantes son la composición de la fase móvil, la relación de flujos, la composición de la membrana, la cantidad de analito inyectada, y las dimensiones del canal. En lo referente a la fase móvil, hay muchos factores físico-químicos influyentes, como el pH y la fuerza iónica, que afectan a la interacción membrana-analito. Se recomienda así trabajar a un pH constante y aproximadamente neutro.

Asimismo, un aumento en la fuerza iónica provocaría un aumento de los tiempos de retención (Gigault *et al.*, 2014). Esta técnica, además, tiene la posibilidad de acoplamiento en línea con un amplio rango de detectores. El detector UV es generalmente el más utilizado, aunque su sensibilidad se limita a concentraciones del orden de mg.L^{-1} , además de que su selectividad es relativamente baja. Por esta razón, también es posible obtener información elemental mediante el empleo de ICP-MS. Una de las principales ventajas de este acoplamiento (AF_4 -ICP-MS) no es sólo la posibilidad de una detección multielemental, sino la alta sensibilidad que presenta (alcanzando los ng.L^{-1}) comparada con la detección UV. Existen numerosos trabajos empleando esta técnica para análisis de AgNPs en diferentes matrices complejas como alimentos (Wagner, 2015, Loeschner *et al.*, 2015), productos de consumo (Hagendorfer *et al.*, 2010), muestras medioambientales (Antonio *et al.*, 2015; Hoque *et al.*, 2012; Koopmans *et al.*, 2015; Mudalige *et al.*, 2015) y muestras biológicas (Poda *et al.*, 2011; Bolea *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2017).

Por otro lado, se encuentran los métodos físicos de separación de NPs, los cuales ofrecen infinitas posibilidades a la hora de desarrollar metodologías analíticas. Entre ellos, destacan la **filtración y centrifugación**, los cuales se emplean para separar diferentes tamaños de NPs y especies iónicas. Estas técnicas proporcionan un fraccionamiento por tamaño de partícula, y destacan por ser baratas, rápidas, sencillas y permitir trabajar con grandes volúmenes de muestra. Aunque la **filtración** de $0,45\ \mu\text{m}$ ya no es aceptada para distinguir fracciones de partículas, la filtración secuencial en combinación con la ultrafiltración, ha sido utilizada para el fraccionamiento por tamaños (Howard *et al.*, 2010). La ultrafiltración se basa en el uso de membranas nanoporosas de diferentes materiales y valores nominales de peso molecular. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular son retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. Las membranas de filtración tradicionales permiten el fraccionamiento de partículas entre $0,2$ y $1\ \mu\text{m}$ (Laborda *et al.*, 2016). Las técnicas de nano-filtración permiten utilizar filtros con poros de tamaño más pequeños, llegando incluso a filtrar NPs por debajo de $1\ \text{nm}$. Para la separación de NPs e iones se suelen utilizar filtros con un tamaño de poro entre $0,5$ y $1\ \text{nm}$ (Allabashi *et al.*, 2009). La filtración secuencial ha sido empleada con éxito en la separación de AgNPs liberadas de textiles (Heilen *et al.*, 2005). La **centrifugación** es una técnica común que se utiliza en la mayoría de laboratorios y que pueden separar partículas por debajo de $500\ \text{nm}$, mientras que la ultra-centrifugación por debajo de $1\ \text{nm}$. La centrifugación puede considerarse el método más sencillo para aislar partículas en suspensión acuosa, así como para separar las NPs de las especies disueltas (Unrine *et al.*, 2012). Sin embargo, se requieren altas revoluciones y tiempos largos, y la eliminación de NPs de los sobrenadantes que contienen especies disueltas son incompletos

incluso en ultracentrifugación utilizando condiciones drásticas como, por ejemplo, 150.000 g durante 60 min. Además, en presencia de sólidos no deseados que también se aíslan junto con las NPs, el fraccionamiento de tamaños es limitado y la resolución obtenida es relativamente baja (Krystek, 2012). Por lo tanto, la centrifugación no se considera, por si sola, una técnica eficiente para el fraccionamiento de NPs, sino que se emplea combinada con otros métodos (Xu *et al.*, 2007).

En cuanto a las técnicas de análisis y cuantificación para NPs, la **espectroscopía de absorción UV-Vis** es una de las técnicas más utilizadas para la caracterización de NPs. Es una técnica rápida, sencilla y aplicable a diferentes tipos. Es sensible a la presencia de coloides de plata debido a que estas NPs presentan un pico de absorción intenso por la excitación de plasmón superficial, que depende de factores como el tamaño, forma y agente estabilizante. La aparición de un pico de absorción alrededor de los 400-450 nm es un indicativo de la presencia de AgNPs. La presencia de un pico a 400 nm corresponde a AgNPs de menos de 5 nm de diámetro, mientras que si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño predominante de las AgNPs es de alrededor de 20 nm (Ivask *et al.*, 2014). Diversos estudios han utilizado esta técnica para la determinación cualitativa y cuantitativa de AgNPs (Contino *et al.*, 2016; Zakaria-Gomaá, 2017; Moreno-Martín *et al.*, 2018).

Otra de las técnicas empleadas para establecer la composición elemental de las NPs metálicas es la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (**ICP-MS**, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) (Laborda *et al.*, 2016), debido a que es una técnica que presenta alta sensibilidad y robustez para poder cuantificar la composición de metales en cualquier matriz y donde además se pueden alcanzar bajos límites de detección, $\mu\text{g.L}^{-1}$ - ng.L^{-1} . Una breve descripción del ICP-MS nos lleva a comenzar por la introducción de la muestra, consistente en la nebulización directa, que conlleva la aspiración y generación de un aerosol fino que puede ser fácilmente ionizable en el plasma. En el caso de introducción de NPs es necesario un nebulizador adaptado para evitar la obturación del mismo. Posteriormente, la excitación e ionización de todos los elementos contenidos en el aerosol tiene lugar en el plasma, el cual consiste en un gas (generalmente Ar) altamente ionizado y conductor de la electricidad, generado en una antorcha de cuarzo por acción de una bobina de radiofrecuencia, donde se alcanzan temperaturas entre 6000 y 8000 K. En este punto, la muestra es completamente atomizada e ionizada, independientemente de su estructura original, lo cual implica que cualquier información estructural se pierde durante el proceso. Las interferencias isobáricas y poliatómicas son una de las mayores limitaciones de esta técnica, ya que existen para un elevado número de isótopos. En estos casos, se requiere el empleo de analizadores de alta

resolución que permitan discernir entre las masas del analito y la interferencia, o el empleo de celdas de colisión o reacción que minimicen las interferencias poliatómicas (Riepe *et al.*, 2000). Los iones generados en el plasma son transportados al analizador de masas a través de una interfaz formada por un sistema de conos y lentes iónicas. El gradiente de presión existente entre la antorcha (a presión atmosférica) y la parte posterior de los conos (10^{-3} - 10^{-4} bar) extrae los iones hacia una serie de lentes iónicas, donde los iones son focalizados hacia el analizador de masas. Finalmente, el analizador de masas a alto vacío (10^{-8} - 10^{-9} bar) separa los iones de acuerdo a su relación masa/carga, los cuales son dirigidos a un multiplicador de iones secundarios. El analizador más comúnmente empleado en los equipos de ICP-MS es el de tipo cuadrupolo (**Q**, Quadrupole), que proporciona una resolución de $m/\Delta m$ 400. Sin embargo, existen otros analizadores como el sector magnético (**SF**, Sector Field) que proporciona una resolución de hasta $m/\Delta m$ 10000; o el analizador de tiempo de vuelo (**TOF**, Time of Flight), el cual se emplea cuando los espectros de masas tienen que ser registrados a intervalos de tiempo muy cortos, del orden de los ms o incluso menores (Becker *et al.*, 2007). En la **Figura A.2** se muestra esquemáticamente un equipo de ICP-MS.

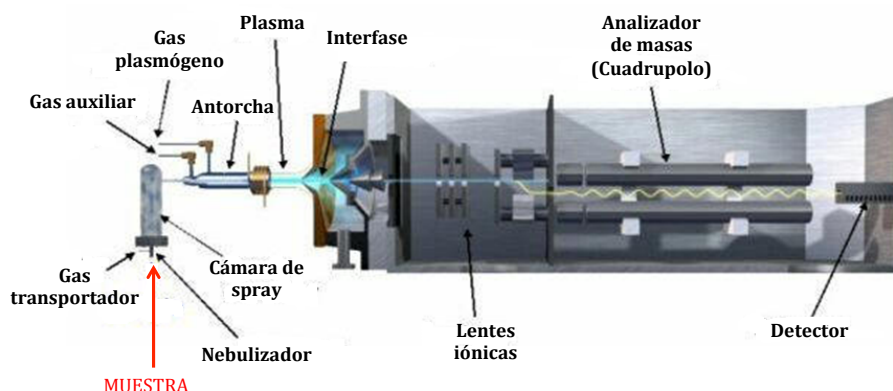


Figura A.2: Componentes del equipo ICP-MS.

El empleo del ICP-MS ofrece la posibilidad de la introducción directa de las NPs en el plasma, sin necesidad de realizar ningún pre-tratamiento a la muestra. Sin embargo, esto puede originar problemas debido a la baja eficiencia de nebulización en el caso de que las NPs se encuentren formando agregados de gran tamaño, proporcionando así bajas recuperaciones e información incorrecta debido a la falta de homogeneidad de la dispersión (Olesik *et al.*, 2012; Laborda *et al.*, 2011). La forma de la NP también parece influir a la hora de la ionización completa en el plasma (Allabashi *et al.*, 2009). Otro problema asociado a la introducción directa de las NPs en ICP-MS son las pérdidas por adsorción de las mismas sobre el sistema de introducción de muestra, lo que conlleva a una cuantificación complicada (Scheffer *et al.*, 2008; Kritstek *et al.*, 2012). Por

ello, para la determinación de NPs metálicas se suele convertir la NP en su correspondiente ion metálico mediante un tratamiento ácido y relacionar así la cantidad de ion con la cantidad presente en la NP. Más recientemente, se ha desarrollado una técnica que permite el análisis de una única partícula (**single-particle (sp)-ICP-MS**). Esta técnica es capaz de proporcionar información sobre la concentración numérica de NPs, así como sobre el contenido de masa elemental por NP. Si además tenemos información adicional sobre su naturaleza (forma, composición y densidad), se puede calcular el tamaño del núcleo y la distribución por tamaños. Se considera que la ionización de una única partícula en el plasma produce una nube de iones cuya intensidad de señal es proporcional al tamaño de la misma. Es una técnica muy versátil, ya que el tamaño mínimo de NPs detectado depende de la cantidad de átomos presentes en una única partícula, y de la masa atómica del elemento (Laborda *et al.*, 2011). Las formas disueltas de las NPs también se pueden analizar y el rango dinámico de sp-ICP-MS puede extenderse hasta la región de micrómetros. Sin embargo, debido a que hay que trabajar a niveles de concentración bajos y el tiempo de adquisición deber ser muy pequeño ($< 1\text{ms}$), la presencia de especies disueltas del elemento monitorizado puede hacer imposible la detección de las NPs. Esta limitación ya no es un problema en los ICP-MS de última generación, capaces de trabajar con frecuencias de adquisición superiores a 10^5 Hz y tiempos de lectura en el rango de milisegundos (Laborda *et al.*, 2014). Por otra parte, las propiedades físicas de las NPs pueden impedir una vaporización completa, llevando a una inexactitud en los resultados. (Lee & Chan, 2015). Esta técnica se ha utilizado para detectar la liberación de AgNPs desde envases para alimentos (Echegoyen & Nerín, 2013; Von Goetz *et al.*, 2013), hasta evaluar la presencia de AgNPs en aguas residuales (Telgmann *et al.*, 2014), alimentos (Gray, 2013; Loeschner *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2014), tejidos biológicos (Peters *et al.*, 2015; Dan *et al.*, 2015; Mitrano, 2012) y sangre (Jenkins *et al.*, 2015). Dicha técnica también ha sido aplicada para modelizar, mediante estudios *in vitro*, el destino de las AgNPs tras la ingesta en seres humanos (Walczak *et al.*, 2013), para rastrear su disolución y aglomeración en aguas naturales (Mitrano *et al.*, 2014; António *et al.*, 2015) o su liberación de aditivos alimentarios (Verleypsen *et al.*, 2015).

Para poder realizar análisis de distribución elemental en muestras sólidas se utiliza la técnica de ablación laser acoplada a ICP-MS (**LA-ICP-MS**, Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Esta técnica ha sido empleada en la presente Tesis Doctoral y ya se ha hablado de los aspectos más relevantes en el apartado de Introducción. En este Anexo se va a profundizar algo más en la descripción de la técnica. En la **Figura A.3** se muestra un esquema del modo de operación de un instrumento LA-ICP-MS.

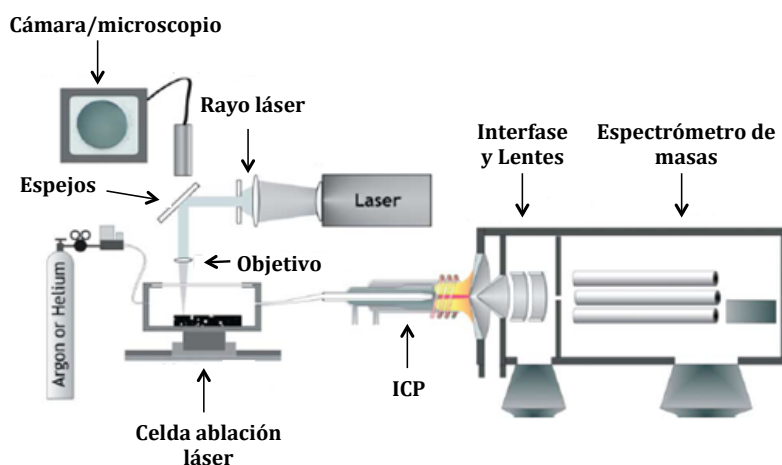


Figura A.3: Esquema de un equipo LA-ICP-MS.

Conceptualmente, la ablación láser es un proceso muy simple: un haz láser pulsado de alta potencia se focaliza sobre la superficie de la muestra en una atmósfera de gas inerte a presión normal; el haz láser convierte instantáneamente un volumen finito de la muestra sólida en un aerosol de los constituyentes. Durante el proceso de ablación la radiación láser es absorbida por los electrones en la capa superficial de la muestra, dependiendo la penetración en profundidad tanto de las propiedades físico químicas de la muestra, como de las características del láser. Los electrones de mayor temperatura abandonan la muestra de inmediato y el resto calientan el volumen irradiado mediante colisiones con átomos de la muestra sólida. Como consecuencia, se produce una fusión de la muestra en el foco de la radiación láser y, a intensidades suficientemente altas, una evaporación de la muestra líquida en forma de un plasma con electrones, iones, moléculas (Gómez- Coedo & Dorado-López, 2010). El aerosol generado por el haz láser se arrastra mediante una corriente de Ar y He a la fuente de iones, ICP, donde se vaporiza, atomiza e ioniza. Finalmente, los iones cargados positivamente se analizan en el espectrómetro de masas tal y como se ha explicado en este mismo Anexo (Gunther & Hattendorf, 2005).

La **Figura A.4** muestra las tres condiciones más importantes para poder realizar una correcta cuantificación de los elementos ablacionados en una muestra.

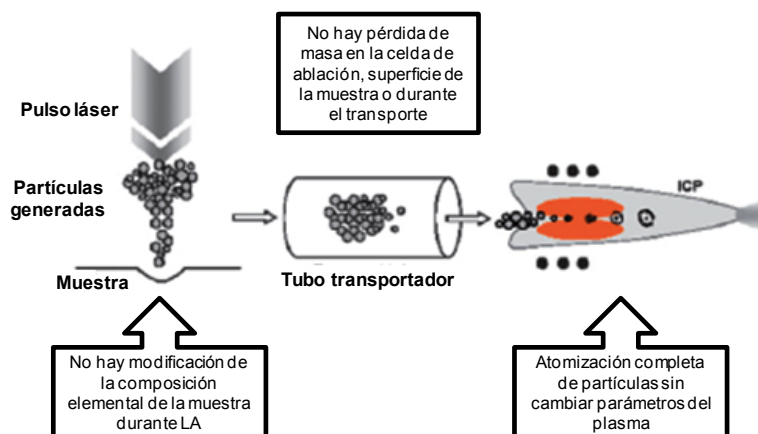


Figura A.4: Condiciones ideales para el análisis por LA-ICP-MS (Adaptada de García *et al.*, 2009).

Si se cumplen estas tres condiciones, la cuantificación puede realizarse comparando las señales registradas de los elementos de la muestra de interés con el material de referencia o una muestra de composición conocida. Esto significa que si las condiciones fuesen ideales se podrían utilizar estándares no-matriciales para la calibración. Desafortunadamente, las condiciones reales en LA-ICP-MS son muy diferentes a las condiciones ideales mostradas en la **Figura A.4**. El grado de desviación depende de la optimización de los parámetros experimentales. Esta optimización requiere: a) información sobre la naturaleza físico-química de la muestra, como constituyentes principales, homogeneidad y morfología; b) conocimiento previo de la interacción del láser con los materiales y los procesos de ablación; c) conocimiento sobre los procesos de formación y la distribución espacial de las partículas en la celda de ablación, que son ambas dependientes de la fluencia del láser, la longitud de onda del láser y el gas portador en la celda de ablación; d) elección apropiada de la celda de ablación y del sistema de transporte de partículas para LA-ICP-MS (microanálisis, profundidad, etc.); e) información sobre la distribución del tamaño de partícula, f) conocimiento sobre la capacidad de atomización del ICP para partículas de diferente tamaño, material y composición (García *et al.*, 2009).

El análisis elemental mediante LA-ICP-MS ofrece una serie de ventajas frente al resto de técnicas de análisis de superficie, como son: i) bajos límites de detección (del orden de $\mu\text{g.g}^{-1}$ – ng.g^{-1}), gracias a que el aerosol seco procedente de la muestra es introducido directamente en la antorcha, sin necesidad del empleo de nebulización, proceso que disminuye extraordinariamente el aporte de muestra al plasma; ii) amplio rango dinámico; iii) posibilidad de análisis multielemental; iv) minimización de interferencias espectrales por formación de iones poliatómicos que tienen lugar en la introducción de muestras líquidas; v) cantidad de muestra requerida pequeña; y vi) capacidad de cuantificar isótopos y elementos traza en secciones de tejido con una alta resolución espacial (entre 10 y 100 μm) (Pozebon *et al.*, 2017).

Todo esto está permitiendo aclarar cuestiones básicas en el campo de la biomedicina como la distribución de ciertos elementos en tejidos biológicos. De hecho, los avances conseguidos recientemente en la instrumentación de los sistemas de ablación están permitiendo obtener resoluciones espaciales mucho mejores, inferiores en algunos casos a 1 μm .

A.2. METODOLOGÍAS BIOANALÍTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS TRAS LA EXPOSICIÓN A AgNPS

A2.1. Viabilidad celular

Una primera indicación de que hay daño celular es la observación de una reducción de la actividad metabólica de células viables. Dentro de este tipo de ensayos, los más comunes son los métodos colorimétricos, como el conteo del número de células no viables, observables tras la tinción con azul de tripano, el cual, atraviesa la membrana celular sólo en el caso de estar dañada, o el ensayo MTT que como resultado mide la absorbancia como respuesta celular a un agente externo, como en este caso son las AgNPs (Holder *et al.*, 2012). En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado el ensayo **MTT** (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*); este método se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a formazán, compuesto azul, cuya absorbancia puede ser medida espectrofotométricamente a 500-600 nm, permitiendo así determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (Guan *et al.*, 2012). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. El análisis requiere solamente unos pocos minutos para generar la señal de medida, lo que implica una reducción de posibles interferencias causadas por la interacción del compuesto testado con el agente químico utilizado en el ensayo.

A2.2. Proteómica cuantitativa

La proteómica cuantitativa se clasifica en dos tipos: *cuantificación absoluta* y *cuantificación relativa*.

La cuantificación absoluta determina los cambios en la expresión de proteínas en términos de cantidad o concentración exacta. La cuantificación absoluta ofrece una información esencial y muy importante; sin embargo, los métodos utilizados basados en marcaje son muy laboriosos y los libres en marcaje son menos precisos. Normalmente, este tipo de cuantificación no se lleva a cabo a nivel proteico sino de péptidos. Los dos métodos más utilizados basados en marcaje son **AQUA** (Absolute Quantification) y **QconCAT** (Quantification Concatamer) e implican el uso de patrones internos que son péptidos marcados con isótopos pesados estables (Gerber *et*

al., 2003). La cantidad absoluta del analito se calcula a partir de la relación de intensidad de iones entre el analito y su estándar. La ventaja que ofrece este método es que se obtiene una elevada precisión en los resultados en cuanto a la cuantificación absoluta. Sin embargo, los costes son elevados, se requiere información previa de los péptidos cuantificados, y sólo se pueden cuantificar unos cuantos péptidos por proteína. Por esta razón, este método no resulta tan útil para estudios de proteómica debido a la cantidad de analitos de interés (Kiko & Ito, 2008). En base a estas desventajas, se han propuesto otros métodos de cuantificación en donde se emplean patrones de proteínas marcadas isotópicamente, como los **PSAQ** (Protein Standard Absolute Quantification), **SILAC absoluto**, **FLEXIQuant** (Full-Length Expressed Stable Isotope-labeled proteins for Absolute Quantification) o **QconCAT** (concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes). En todos los casos los patrones de proteínas marcadas se añaden a la muestra de forma previa a la digestión de la misma (Bantscheff *et al.*, 2012; Marcus, 2012). En cuanto a los métodos libres de marcaje no requieren de patrones internos y permiten comparar un mayor número de muestras en comparación con los métodos basados en marcaje. Sin embargo, como desventaja presentan una baja precisión y reproducibilidad. Dentro los métodos más conocidos se encuentran: **PAI** (Protein Abundance Index), **APEX** (Absolute Protein Expression), **emPAI** (exponentially modified Protein Abundance Index), **NSAF** (Normalized Spectral Abundance Factor) o **SIN** (Normalized Spectral Index) (Arike & Peil, 2014), siendo los dos primeros métodos los más utilizados.

En cuanto a la **cuantificación relativa** nos da información sobre la tendencia de la regulación de una proteína en una muestra, es decir, si se encuentra inhibida o sobreexpresada con respecto a una muestra control. Este tipo de cuantificación se basa en la comparación de dos poblaciones o muestras diferencialmente marcadas con isótopos estables. Hay diferentes posibilidades para el marcaje de péptidos y proteínas mediante isótopos estables. Los isótopos estables pueden ser incorporados metabólicamente (química o enzimáticamente), a las proteínas o péptidos presentes en la muestra (Goshe & Smith, 2003; Ong & Mann, 2005; Wu *et al.*, 2006).

-En el *marcaje enzimático*, dos muestras de proteínas se digieren enzimáticamente en presencia de “agua ligera” (H_2O_{16}) o “agua pesada” (H_2O_{18}), de manera que el oxígeno marcado se incorpora a los péptidos resultantes como marcador distintivo. Tras la digestión, los péptidos pueden ser combinados y procesados como una muestra única.

-En el *marcaje químico a nivel proteico*, (**ICAT**, Isotope-Coded Affinity Tag), las proteínas de dos muestras son marcadas usando los reactivos del método de marcaje; a continuación, las proteínas se digieren enzimáticamente y se combinan de forma equitativa antes del análisis por MS. Con este método se marcan exclusivamente los residuos de cisteína, por lo tanto, las

proteínas libres de este aminoácido que representan aproximadamente el 20% del proteoma, se excluyen del análisis (Palzs & Suhal, 2005).

-En el *marcaje químico a nivel peptídico (iTRAQ, Isotope Tagged Relative and Absolute Quantification)*, las proteínas de distintas muestras se digieren separadamente hasta sus péptidos resultantes y tras la digestión cada péptido es marcado usando reactivos de estructura química semejante, pero que difieren en la composición del isótopo estable. Tras el marcaje las muestras se combinan antes de ser analizadas. En este tipo de ensayos se produce el marcaje con hasta cuatro isótopos isobáricos formados por: un extremo reactivo al amino, un balanceador y un ion reportero que tendrá una relación m/z de 114, 115, 116 y 117. La cuantificación relativa de este tipo de marcaje se realiza con la intensidad de los iones reportero obtenidos de los espectros de MS/MS (Wiese *et al.*, 2007).

-El *marcaje metabólico*, consiste en el cultivo de dos poblaciones de células cuyos proteomas se quieren comparar, uno en un medio normal y el otro en un medio enriquecido con compuestos marcados con isótopos estables. Tras su crecimiento, los distintos isótopos habrán sido incorporados a las proteínas y una vez extraídas pueden ser combinadas, digeridas y analizadas como una sola muestra. Un tipo de metodología con marcaje metabólico es la estrategia SILAC, siendo la estrategia empleada en esta Tesis.

La **Figura A.5.** muestra el esquema de los diferentes marcajes mencionados.

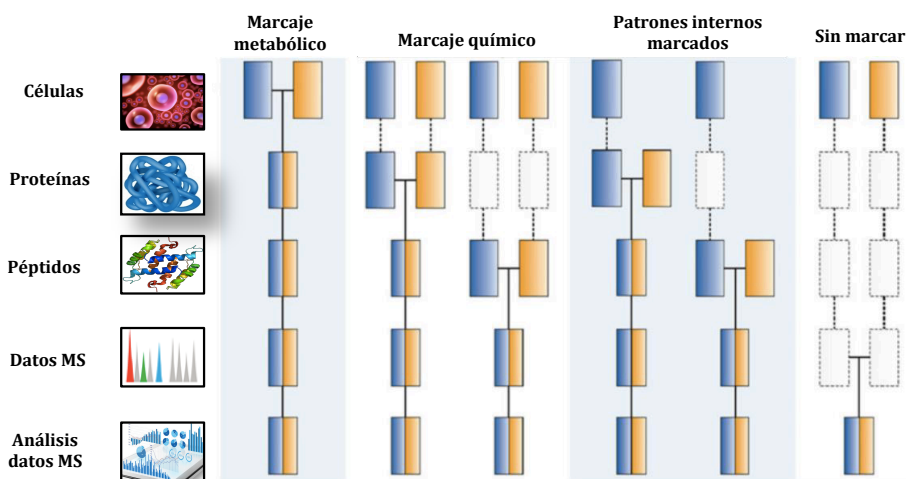


Figura A.5: Esquemas de trabajo en las diferentes metodologías de proteómica cuantitativa. Los cuadros naranjas y azules representan distintas condiciones experimentales. Las líneas discontinuas indican el tratamiento de muestra independiente y las líneas continuas la mezcla de las dos muestras. Adaptada de Bantscheff *et al.*, 2012.

Se puede apreciar que el marcaje químico se produce después de la extracción de proteínas y por lo tanto es completamente independiente de la fuente y la preparación de la muestra. Este

tipo de marcaje tiene la ventaja de que es válido para cualquier tipo de muestra biológica. Además, el tiempo de marcaje es bastante corto en comparación a cuando se marca de forma metabólica, donde el marcaje completo puede llevar varias semanas. Por otro lado, el marcaje metabólico requiere de la adición de un elemento isotópico como, por ejemplo, ^{13}C , ^{15}N o ^{18}O a los medios de crecimiento, en una forma que lo hace disponible para su incorporación en todo el organismo, tejido o célula. Pero sobre todo la gran ventaja del marcaje metabólico es que se procesan ambas poblaciones (marcada y sin marcar) como una sola muestra por lo que la pérdida de muestra o interferentes derivadas del tratamiento de la misma, no afectan a la precisión de la cuantificación, lo que hace que se cometan muchos menos errores a lo largo del procedimiento y, por tanto, se obtenga una mayor exactitud y reproducibilidad que con el marcaje químico, en donde las muestras se tratan individualmente hasta la etapa de digestión. Por otro lado, para el marcaje enzimático es necesario un fraccionamiento cuidadoso de la muestra (Bantscheff *et al.*, 2012).

En general, las técnicas basadas en perfiles de expresión proteica pueden proporcionar información muy útil sobre los mecanismos específicos de interacción de las NPs con células. En la década de los 90, la espectrometría de masas aplicada al estudio de muestras biológicas se convirtió en una poderosa técnica analítica, eliminando así muchas de las limitaciones que había anteriormente con respecto al análisis de proteínas.

En las **técnicas de proteómica basadas en la detección por espectrometría de masas**, la cuantificación se lleva a cabo normalmente marcando las proteínas o péptidos mediante isótopos estables, de manera que una de la muestras se marca con un isótopo ligero, mientras que la otra se marca con el isótopo pesado correspondiente. Los péptidos así marcados producen, en el análisis de MS, parejas de picos con una diferencia de masa correspondiente a la de los isótopos utilizados para el marcaje. La mayoría de las técnicas de marcaje isotópico están basadas en la cuantificación a nivel de los espectros de MS, de manera que se buscan las señales que difieran entre sí por una variación específica en su relación m/z , y la concentración relativa de un péptido dado se obtiene por comparación de las intensidades correspondientes (Luque-García *et al.*, 2013). En la **Figura A.6** se muestra un esquema de trabajo típico de un ensayo proteómico, el cual se divide en dos partes fundamentales: marcaje cuantitativo y cuantificación.

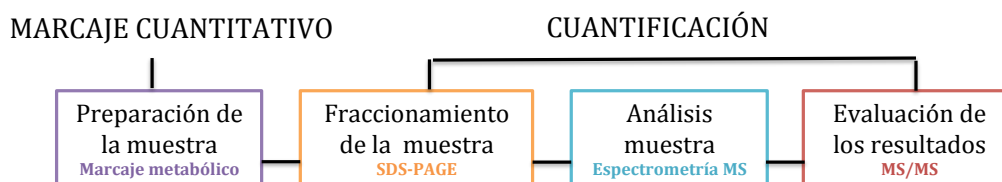


Figura A.6: Marcaje metabólico y preparación de muestra en una técnica proteómica de marcaje isotópico.

Para el marcaje cuantitativo, en la presente Tesis Doctoral se ha empleado la técnica de marcaje metabólico, por ello, se van a describir los detalles que no han quedado reflejados en la Introducción.

En los primeros estudios de marcaje metabólico se usaban medios enriquecidos con los isótopos ^{15}N y ^{13}C (Langen *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 1999). Este método presentó algunos inconvenientes relacionados con la identificación de los espectros. En la mayoría de los casos, los cambios de masa de los péptidos no pudieron predecirse dado que, tanto los átomos de nitrógeno de la cadena principal, como los de las cadenas laterales se hallaban marcados, hecho que hace más complicada la cuantificación de los péptidos presentes en las mezclas complejas. Por esta razón, Mann, 2006 propuso una versión de la estrategia anterior basada en la adición de isótopos en forma de aminoácidos en el medio de cultivo, conocida como **SILAC** (Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture). En esta técnica, el número de isótopos marcados es definido y no depende de la secuencia del péptido, lo que facilita el análisis de los datos. La selección de este tipo de marcaje metabólico permite minimizar los errores del tratamiento de muestra, y a su vez, facilita el análisis en un solo experimento. Es importante destacar que esta metodología también permite la combinación con diferentes métodos de fraccionamiento y aislamiento de determinados grupos de proteínas, con el fin de mejorar la cuantificación de proteínas que se encuentren en menor abundancia en la muestra biológica. La principal ventaja es que las muestras se pueden combinar antes de empezar el tratamiento de la muestra (células intactas). Debido a esto, SILAC es probablemente una de las técnicas de proteómica cuantitativas más precisa y exacta, teniendo en cuenta todo el proceso experimental (Bantscheff *et al.*, 2007).

Una vez que se ha conseguido el marcaje metabólico, el siguiente paso es la cuantificación de las proteínas, para lo que son necesarias tres etapas: el fraccionamiento de la muestra, su posterior análisis por espectrometría de masas y el análisis de los datos obtenidos.

1) Fraccionamiento de la muestra: para el fraccionamiento de las proteínas de una muestra, la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (**SDS-PAGE**, Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) es la técnica más utilizada. Esta técnica, permite llevar a cabo una separación de macromoléculas cargadas gracias a su movilidad en el gel en presencia

de un campo eléctrico externo. El SDS es un surfactante aniónico que actúa rompiendo las interacciones no covalentes propias de las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas. Al formarse el complejo SDS-proteína se observa un valor constante de la relación m/z , por lo que su separación en el gel de poliacrilamida se deberá fundamentalmente al tamaño proteico, ya que la velocidad de migración desde el cátodo hacia el ánodo es función directa de su peso molecular (Lomonte, 2009). La formación del gel tiene lugar por la polimerización entre la acrilamida y la bis-acrilamida en medio acuoso mediante una reacción catalizada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio (PSA). El TEMED va a favorecer la formación de radicales libres de persulfato, y éstos serán los que inicien la polimerización generando radicales libres del monómero que se unen para formar la matriz del gel. Esta reacción no ocurre a valores de pH bajo, por lo que se emplea una disolución tampón Tris-HCl 1.5 M de pH 8.8, además del SDS. El gel de acrilamida está formado por dos tipos de geles, gel concentrador, situado al principio de la electroforesis, y el gel de separación, que es donde se produce la separación electroforética de las proteínas según su tamaño. El gel concentrador tiene un tamaño de poro grande (grado de entrecruzamiento del 4%) y un pH diferente al gel de separación de las proteínas. El objetivo de incorporar el gel concentrador es para mantener una buena resolución en el gel de separación, a pesar de cargar volúmenes grandes de muestra. El gel de separación, sin embargo, tiene un tamaño de poro que vendrá determinado por la proporción de acrilamida-bisacrilamida utilizada, por lo tanto, el porcentaje de acrilamida es crucial para la separación óptima de las proteínas. En la mayor parte de aplicaciones se emplea entre un 7,5 y un 20% de entrecruzamiento, disminuyendo el rango de masas que se separan en el gel con buena resolución a medida que aumenta el porcentaje de acrilamida (Hames, 1998). En la **Figura A.7** se muestra un esquema de la técnica SDS-page.

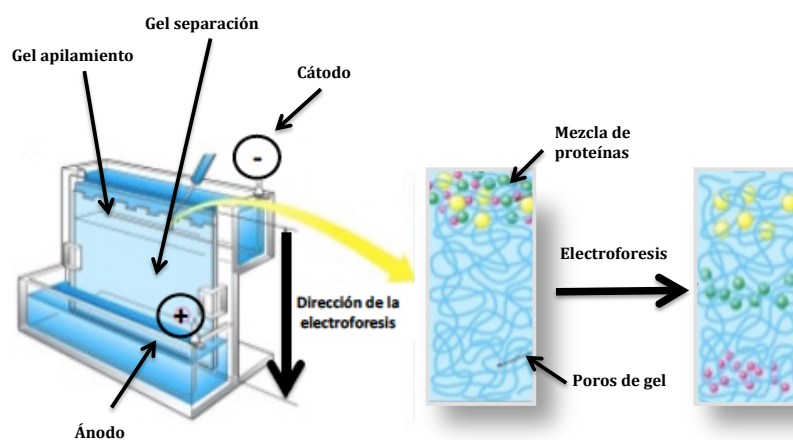


Figura A.7: Esquema de un montaje SDS-Page.

2) Análisis por espectrometría de masas: La cuantificación de las proteínas se lleva a cabo mediante espectrometría de masas, técnica analítica que se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos dichos iones se separan en función de su relación m/z en condiciones de vacío llegando al sistema de detección de forma secuencial. Los espectrómetros de masas se componen, por tanto, de cuatro elementos básicos: *sistema de introducción de muestra, fuente de ionización, analizador de masas y detector*.

i) Sistema de introducción de muestra:

El principal factor que hay que tener en cuenta en la espectrometría de masas, es el proceso de vaporización de la muestra. Según el tipo de muestra a tratar, se utilizan principalmente tres métodos para su introducción:

- Infusión directa: Se introduce la muestra directamente en la fuente de iones por medio de una varilla metálica, que lleva en la punta un capilar con la muestra.
- Introducción indirecta: En este sistema, la vaporización de la muestra se realiza en un recipiente externo al espectrómetro; un balón de vidrio o de metal esmaltado que se mantiene a temperatura elevada.
- Introducción a partir de un cromatógrafo de líquidos o gases: Este tipo de sistema de introducción de muestra es muy popular para el análisis de mezclas de compuestos, ya que la introducción se realiza directamente en fase gaseosa y, por tanto, se puede realizar la separación de los mismos mediante cromatografía (Gómez Martín, 2010).

ii) Fuente de ionización:

Para la identificación estructural de proteínas es necesario el empleo de fuentes de ionización suaves que mantengan la estructura molecular de las mismas. Las más empleadas son la ionización por electrospray (**ESI**, Electrospray Ionization) ó la ionización asistida por láser (**MALDI**, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) (Griffiths *et al.*, 2001). En la ionización MALDI, la muestra se mezcla con una matriz adecuada y se deposita sobre una placa metálica, donde cristaliza. Después tiene lugar la irradiación con un haz láser, provocando la ablación y desorción de la muestra y la matriz; por último, los analitos son ionizados y acelerados hacia el analizador de masas (**Figura A.8A**) (Karas & Krüger, 2003). La ionización ESI consiste en una ionización a presión atmosférica en la que los analitos se hacen pasar a través de un tubo capilar al que se aplica un potencial elevado (3-4 kV) sobre el extremo del tubo para que se produzca la nebulización e ionización de la muestra líquida. Las gotas formadas, que poseen una elevada carga superficial, se van convirtiendo en gotas de menor tamaño tras el proceso de solvatación. Por esta razón, los disolventes utilizados son mezclas acuosas con disolventes orgánicos volátiles como acetonitrilo (ACN) o metanol (MeOH), aunque se suelen añadir

también disolventes que aumenten la conductividad como es el caso del ácido fórmico. Para favorecer el proceso de nebulización y solvatación se hace pasar un gas inerte (normalmente N_2) alrededor del capilar. Una vez formadas las gotas, éstas son transportadas desde la zona donde se encuentran a presión atmosférica hasta el interior del espectrómetro de masas por gradiente de presión (**Figura A.8B**) (Timerbaev *et al.*, 2011).

A diferencia de la fuente de ionización MALDI, los iones generados en ESI suelen ser de carga múltiple dando lugar a diferentes especies para una misma molécula según se trabaje en modo de ionización positivo o negativo. En el caso de péptidos y proteínas, el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina y lisina son los candidatos a protonarse (Mann & Wilm, 1995). Además, permite acoplar métodos de electroforesis capilar y cromatografía de líquidos directamente al espectrómetro de masas lo que permite la identificación y cuantificación de mezclas complejas de proteínas (Fenn *et al.*, 1989).

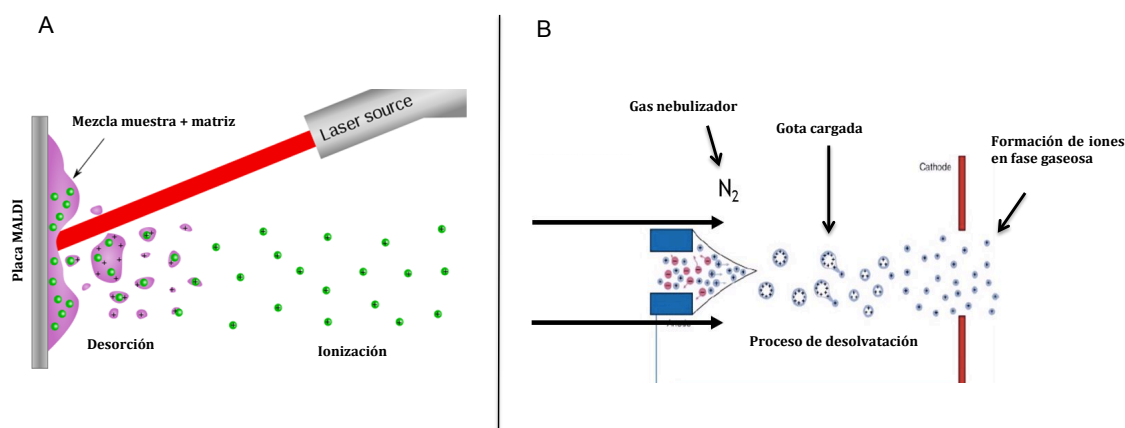


Figura A.8: Esquema de funcionamiento de la fuente de ionización A) MALDI, B) ESI.

iii) Analizador de masas:

La misión del analizador de masas es la de separar los iones en función de su relación m/z y enfocarlos, una vez separados, hacia el detector. Se pueden emplear diversos analizadores, como los de tipo cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier (FT-ICR), Orbitrap o trampas de iones (IT). A continuación, se describen las características principales de algunos de ellos.

Cuadrupolo (Q)

Los cuadrupolos se encuentran presentes en casi todos los tipos de espectrómetros de masas modernos como filtros y guías de banda ancha de iones. El funcionamiento de este analizador fue descrito por Paul y Steinwogen en 1953 (Paul & Steinwogen, 1953). Un cuadrupolo consiste

en cuatro barras paralelas de sección hiperbólica en la cara interna, generalmente de unos 15-20 cm de largo y 0.5 cm de radio, separadas entre sí unos 2 cm, a las que se aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crean en su interior un campo denominado cuadrupolar. Los iones generados en la fuente deben atravesar longitudinalmente el recinto limitado por estas barras para incidir en el detector. Estos iones, que entran en el analizador a una energía de unos pocos eV, son sometidos al efecto del campo cuadrupolar que los hace oscilar y los desvía en función de su valor m/z de forma que, para una combinación de potenciales, sólo los iones en un estrecho rango de valores m/z llegaran a incidir en el detector (**Figura A.9A**). Los analizadores de cuadrupolo actúan, por tanto, como filtros de iones y los espectros de masas en estos sistemas se obtienen mediante un barrido del potencial aplicado a las barras. Como ventaja cabe destacar que es muy utilizado por su sencillez y por ser muy adecuado para cualquier tipo de interfaz como el ESI, así como por su bajo coste. El problema de este tipo de funcionamiento repercute negativamente en el límite de detección, especialmente cuando se requiere la obtención de espectros completos en rangos de masas amplios. Además, su poder de resolución es relativamente pequeño, del orden de 500 a 1.000 (Mirzaei, 2016).

Trampa de iones (IT)

Este tipo de analizador es una modificación del analizador cuadrupolar, y está basado en la utilización de una zona de confinamiento electromagnética generada por medio de dos señales de radiofrecuencia. El analizador de trampa de iones está formado por tres electrodos de superficie hiperbólica: uno central y dos de entrada y salida, que constituyen el cierre de los extremos del anillo central. Los tres electrodos forman una cavidad en la que se producen la ionización, la fragmentación y el análisis de masas. Durante el proceso de análisis de masas, se aplica entre los electrodos superior e inferior un potencial de radiofrecuencia de 525 kHz (voltaje de modulación axial); al mismo tiempo, sobre el electrodo central se aplica otro voltaje de radiofrecuencia diferente. Estos dos voltajes de radiofrecuencia dan lugar a un campo electromagnético cuadrupolar tridimensional en el que quedan confinados los iones con una trayectoria oscilante estable dependiendo el movimiento exacto de cada ión de los voltajes aplicados y de su relación m/z (**Figura A.9B**). El analizador de trampa de iones presenta la ventaja de ofrecer una sensibilidad más elevada que las conseguidas utilizando otro tipo de analizadores, ya que es capaz de concentrar una gran cantidad de iones en el campo de captura. Además, ha mostrado ser muy útil en el análisis de muestras de alta complejidad. Este tipo de detectores también destacan por ser los más económicos, así como poseer una elevada velocidad de barrido, por lo que se adquieren los datos de manera muy rápida, sin embargo, tienen una resolución limitada. Por este motivo, se desarrolló el analizador de trampa de iones lineal (LTQ) que consiste principalmente en cuatro barras paralelas cortadas en tres

secciones con una ranura longitudinal en dos barras de la sección central para la extracción de iones, a las que se le añaden dos electrodos adicionales a la entrada y a la salida. El funcionamiento interno es el mismo que en la trampa cuadrupolar, con la principal diferencia, de que los iones son extraídos radialmente a través de las ranuras practicadas en las barras de los electrodos. Este analizador es capaz de atrapar mejor los iones que el cuadrupolar lo que supone una mejora en la resolución y la sensibilidad de la técnica (Gómez Martín & Ballesteros, 2010; Mirzaei, 2016).

Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

El analizador TOF se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según el valor de su relación m/z y, por tanto, tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia (**Figura A.9C**). Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados en la fuente, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. A diferencia de los sistemas de cuadrupolo, que como se indicó anteriormente filtran en cada instante grupos de iones dentro de un pequeño rango de valores m/z desechando el resto de la población de iones, el analizador TOF separa y detecta en una escala de tiempo (tiempo de vuelo) el conjunto completo de iones procedente de la fuente. El sistema trabaja, por este motivo, en régimen discontinuo por lo que es un detector indicado para técnicas de ionización de carácter pulsante como el MALDI (Abián *et al.*, 2008). Como ventajas destacan la rapidez de los análisis ya que pueden procesar 100 muestras en 10 min. Permite la determinación de masas en un amplio intervalo (100-250.000 u.a.) y se obtienen espectros de masas sencillos, debido a que la mayoría de los iones tienen una única carga. Además, tiene una sensibilidad elevada que puede llegar a detectar cantidades del orden de atomoles en péptidos de pequeño tamaño. Como desventaja cabe mencionar una baja reproducibilidad debido al difícil control del proceso de cristalización y producción de iones (Gómez Martín, 2010).

Analizador Orbitrap

El Orbitrap (**Figura A.9D**) es un analizador de masas con trampa de iones que consta de dos electrodos externos y un electrodo central, que permite actuar como analizador y detector. Los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados por su atracción electrostática hacia el electrodo interior. De esta forma, los iones diferentes oscilan a diferentes frecuencias, lo que resulta en su separación. Finalmente, la aplicación de la transformada de Fourier (FT) a las frecuencias de oscilación de los iones proporciona el espectro de masas (Zubarev & Makarov, 2013). Este tipo de analizador presenta

ciertas ventajas como puede ser su elevada resolución (30000-100000), exactitud (2-5 ppm) y sensibilidad (fmol), además de presentar un elevado rango dinámico así como una mayor volumen de captura en comparación a otros analizadores como el cuadrupolo o el FTICR. Por otro lado, su principal inconveniente resulta en su elevado coste (Makarov *et al.*, 2000).

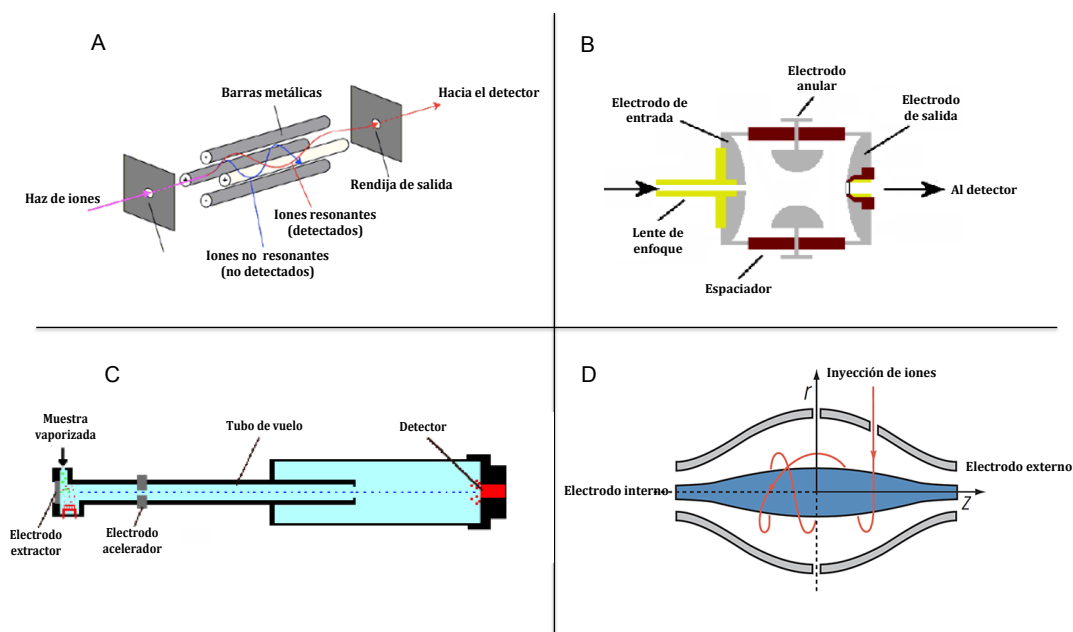


Figura A.9: Esquema de los analizadores de masas comentados. A) Q, B) IT, C) TOF, D) Orbitrap.

iv) Detector:

El detector es el responsable de medir la abundancia de los iones, separados previamente en el analizador de masas, en forma de señal eléctrica. Existen diferentes tipos de detectores: Caja de Faraday, Multiplicador de electrones, placa fotográfica (Liu *et al.*, 2014). El detector más utilizado en equipos de espectrometría de masas es el **multiplicador de electrones de dínodos**. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be que emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. El ión a detectar choca con el primer dínodo, provocando la emisión de un elevado número de electrones, que van a incidir sobre el segundo dínodo. El proceso de multiplicación se repite sucesivamente en los demás dínodos, obteniéndose al final del sistema una amplificación de señal del orden de 10^6 a 10^8 A. Es un detector mucho más sensible que el de copa de Faraday, con una señal detectable del orden de 10^{-18} A. Es un detector de vida limitada, pues se va desgastando con el uso, por lo que su ganancia va cambiando con el tiempo y requiere una calibración frecuente. La velocidad de respuesta del multiplicador de electrones es inferior a 50 ns, mucho más rápida que otros detectores, lo que permite velocidades de barrido mayores en el espectrómetro de masas.

3) Evaluación de los resultados: En la actualidad existen diferentes estrategias para la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas. La primera de ellas es a partir de la huella peptídica, (**PMF**, Peptide Mass Fingerprinting). Dicho método consiste en la identificación de una proteína mediante el empleo de las masas de los péptidos obtenidos tras una previa digestión enzimática. De esta forma, cada proteína puede ser identificada de forma única por las masas de los péptidos que la forman, y eso constituye lo que se llama la huella peptídica. Una vez obtenido el espectro se utilizan distintos tipos de herramientas informáticas, tales como Mascot (v2.3 MatrixScience) que permiten mediante métodos estadísticos evaluar el grado de similitud entre los valores de m/z de cada péptido del espectro obtenido de forma experimental con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas las proteínas recogidas en la base de datos. Todos estos programas asignan un valor probabilístico que indica lo bien o mal correlacionados que se encuentran entre sí los valores experimentales y los teóricos según su mayor correlación con el espectro dentro de la tolerancia de la masa de búsqueda definida por el usuario. Sin embargo, hoy en día para llevar a cabo la identificación de proteínas, se emplean en la mayoría de los casos espectrómetros de masas con dos analizadores de masas. Al acoplamiento de dos espectrómetros de masas se le llama espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Estos equipos permiten seleccionar los picos de los péptidos intactos (iones precursores) en el primer analizador de masas, para una posterior fragmentación de los mismos (espectros MS/MS) en una cámara de colisión. La medición de las relaciones m/z de dichos péptidos fragmentados se realiza en el segundo analizador de masas. Esto permite realizar la identificación de las proteínas con información adicional a la realizada en el caso anterior (huella peptídica), ya que el espectro de fragmentación de un péptido es característico y único. Por tanto, la información recogida es mucho mayor. Estos análisis generan cientos de espectros por hora, lo que requiere del uso de programas eficientes con los que llevar a cabo el análisis de los datos (Standing, 2003; Hernández *et al.*, 2006). Esta última opción se usa normalmente para la identificación de las proteínas presentes en mezclas complejas y cuando hay disponibilidad de acceso a la información genómica del organismo estudiado.

**ANEXO B. APORTACIONES
CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS
DOCTORAL**

B. 1 Comunicaciones a congresos

-E. Gracia-Lor, **M.N. Fernández-Muñiz**, J. Sanz-Landaluze, R. Muñoz-Olivas. Application of LA-ICP/MS to the analysis of trace elements in zebra fish larvae. XIV European Workshop on Laser Ablation. Pau (Francia) 2018. Póster

-**M^a Nieves Fernández-Muñiz**, Jose Luis Luque-García, Riansares Muñoz-Olivas. Novel strategies for LA/ICPMS of trace elements in zebrafish larvae. 9th Franco-Spanish workshop on bio-organic analytical chemistry. Huelva (España) 2017. Comunicación oral.

-**M^a Nieves Fernández-Muñiz**, Jose Luis Luque-García, Riansares Muñoz-Olivas. A novel calibration for LA-ICPMS imaging: application to metal bioaccumulation studies in zebrafish larvae. XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Valencia (España) 2017. Póster

-**M^a Nieves Fernández-Muñiz**, Riansares Muñoz-Olivas, Carmen Cámara Rica, Jose Luis Luque-García. Assessing size-dependent uptake and toxicity of silver nanoparticles: A quantitative proteomic approach. Congreso: 6^o EuChems Congress, Sevilla (España) 2016. Póster.

-**M^a Nieves Fernández-Muñiz**, Riansares Muñoz-Olivas, Carmen Cámara Rica, Jose Luis Luque-García. Silac-based quantitative proteomics identifies mechanisms of AgNPs-induced toxicity in HepG2 cells. VII Workshop en nanociencia y Nanotecnología Analítica (NYNA), Salamanca (España) 2015. Comunicación oral.

-Jose Luis Luque-García, J. Espadas-Moreno, H. Estevez, **M.N. Fernández-Muñiz**, E. García-Calvo, J.C. García-Lidón, S. Montalvo-Quirós, C. Cámara-Rica. (Bio) analytical strategies for assessing nanoparticles toxicity. XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Santiago de Compostela (España) 2015. Comunicación oral.

B. 2 Artículos científicos

-M.N. Fernández, R. Muñoz-Olivas & J. L. Luque-Garcia (2019) SILAC-based quantitative proteomics identifies size-dependent molecular mechanisms involved in silver nanoparticles-induced toxicity, *Nanotoxicology*, 13:6, 812-826.

-M.N. Fernández-Muñiz, J.L. Luque-García, R. Muñoz-Olivas. Multielemental determination in zebrafish larvae by LA-ICP-MS: Au (III) normalization for a reliable quantification. En revisión

-M.N. Fernández-Muñiz, R. Muñoz-Olivas, J.L. Luque-García. Analysis of protein expression in

developmental toxicity induced by silver nanoparticles in zebrafish larvae. Enviado

B. 2 Otros artículos científicos

-Durante-Rodríguez G, Fernández-Llamosas H, Alonso-Fernandes E, Fernández-Muñiz MN, Muñoz-Olivas R, Eduardo Díaz E, & Carmona M (2019) ArxA From Azoarcus sp. CIB, an Anaerobic Arsenite Oxidase From an Obligate Heterotrophic and Mesophilic Bacterium. Front Microbiol. 10:1699.

-Cristina Navarro, Cristian Mateo-Elizalde, Thotegowdanapalya C. Mohan, Eduardo Sánchez-Bermejo, Oscar Urrutia, María Nieves Fernández-Muñiz, José M. García-Mina, Riansares Muñoz, Javier Paz-Ares, Gabriel Castrillo, Antonio Leyva, Arsenite provides a selective signal that coordinates arsenate uptake and detoxification through the regulation of PHR1 stability in Arabidopsis, Molecular Plant, 2021, 14 (9):1489-1507.

En la actualidad, las AgNPs debido a su fuerte actividad antimicrobiana, se utilizan en una gran variedad de productos de consumo, así como en aplicaciones biomédicas, lo que provoca que tanto los seres humanos como el medio ambiente estén cada vez más expuestos a estas nanopartículas. Concretamente, el tamaño de partícula es una de las propiedades más importantes y un factor crítico en lo que se refiere a toxicidad. Por ello, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral consiste en evaluar mediante el desarrollo y aplicación de diferentes estrategias analíticas y de proteómica la posible toxicidad de las AgNPs según su tamaño.

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: La voluntad"

Albert Einstein