

ABORDANDO LA COMPLEJIDAD DE LA INTERACCIÓN DE METALES Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON SISTEMAS VIVOS MEDIANTE TÉCNICAS –ÓMICAS

JOSÉ L. LUQUE GARCÍA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

La contaminación de los ecosistemas y la exposición a metales tóxicos sigue siendo una preocupación importante en todo el mundo. Algunos de estos metales se encuentran de forma ubicua en el medio ambiente debido a su liberación en cantidades sustanciales como consecuencia de actividades geológicas y/o impactos antropogénicos. A pesar de que algunos de estos metales son micronutrientes esenciales en bajas concentraciones, pueden causar una amplia gama de efectos nocivos en exceso. Además de las diferentes especies metálicas que tradicionalmente se han venido estudiando desde el punto de vista toxicológico, en los últimos años las nanopartículas metálicas (MNPs) han recibido gran atención por su uso y aplicabilidad en nuevos productos de consumo. Las NPs se definen generalmente como partículas con al menos una dimensión de 1-100 nm. Este menor tamaño les confiere propiedades únicas, especialmente porque su superficie específica y su reactividad es mayor y diferente en comparación con los materiales a granel. Estas características específicas suelen estar relacionadas con una potencial toxicidad. Según una estimación reciente, actualmente se comercializan más de 1.000 productos de consumo que contienen MNPs y cuyas aplicaciones incluyen la electrónica, la óptica, los textiles, la biomedicina, la cosmética, el envasado de alimentos, la tecnología de tratamiento del agua, las pilas de combustible, los catalizadores, los biosensores y los agentes para la recuperación del medio ambiente, entre otras [1]. Como resultado de estas aplicaciones, la exposición del medio ambiente y de los seres humanos a las MNPs está cada vez más extendida. En consecuencia, diferentes metales en forma de MNPs han obtenido un acceso cada vez mayor a los tejidos, las células y las moléculas biológicas dentro del cuerpo humano. Es muy probable que la exposición humana a los MNPs se produzca durante los procesos de fabricación, pero también es posible la inhalación de MNPs liberadas a la atmósfera, la ingestión de agua o alimentos que contengan MNPs, y la exposición dérmica a partir de diversas fuentes como por ejemplo, lociones corporales y protectores solares [2].

Si bien la interacción de otras especies metálicas con organismos vivos ha sido extensamente estudiada [3], hasta la fecha, el impacto de la exposición a las MNPs en la salud humana y el medio ambiente no se ha evaluado completamente. Los esfuerzos de investigación para evaluar el potencial tóxico de las MNPs han presentado algunos desafíos importantes, y sigue habiendo una necesidad urgente de estudios bien diseñados que generen datos para poder evaluar el riesgo real de este tipo de NPs [4].

La composición química, la forma, el tamaño, la estabilidad, el recubrimiento de la superficie, la funcionalización, la pureza de las NPs, la formación o no de agregados, etc. son aspectos esenciales no sólo para las aplicaciones, sino también para la toxicidad potencial [6-8] (Figura 1).

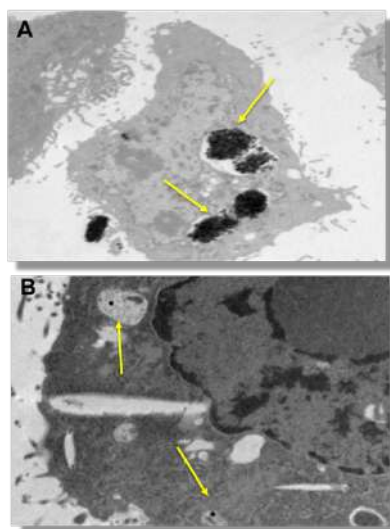


Figura 1. Diferente internalización de MNPs en células HepG2. A) Agregados de NPs de TiO_2 ; B) NPs de Ag localizadas de forma discreta en vacuolas.

Un aspecto clave a tener en cuenta a la hora de evaluar la toxicidad de metales y NMPs es la elucidación de los mecanismos biomoleculares por los cuales dichas especies ejercen su acción tóxica. Dentro de las diferentes herramientas (bio)analíticas disponibles, las técnicas ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) son estrategias de descubrimiento de alto rendimiento que permiten identificar un número elevado de genes, proteínas y metabolitos alterados tras la exposición a las especies objeto de estudio y, por tanto, resultan cruciales a la hora de entender los mencionados mecanismos. A continuación, se van a comentar las principales herramientas empleadas en cada una de estas tres grandes tecnologías ómicas.

La genómica y la transcriptómica representan una herramienta de cribado que permite conocer en profundidad las funciones celulares y el paisaje genómico de la transcripción, gracias a su capacidad para reflejar las variaciones genómicas y postgenómicas.

La herramienta analítica más común para realizar un ensayo genómico y transcriptómico es el uso de microarrays de ADN o de ARNm [9], que proporcionan

simultáneamente la cuantificación relativa de miles de genes o transcritos (más de 20.000). Estos microarrays son una colección de ADN microscópicos inmovilizados en diferentes spots en una superficie sólida. Cada spot contiene picomoles de una secuencia de ADN específica, conocida como reportero (o también como sonda u oligo), que pueden ser una sección corta de un gen u otro elemento de ADN utilizado para hibridar un ADNc o un ARNc. La hibridación sonda-diana suele detectarse y cuantificarse mediante el uso de fluoróforos, con plata o mediante quimioluminiscencia, permitiendo así la identificación de genes o transcritos con una expresión diferencial entre el control y las diferentes condiciones evaluadas (Figura 2).

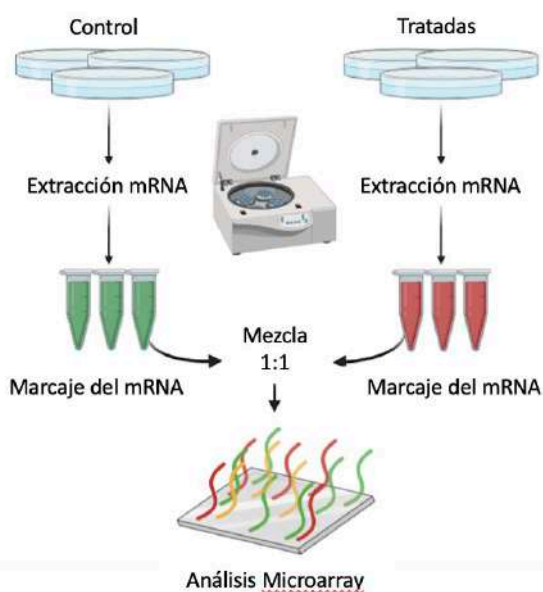


Figura 2. Esquema general de un experimento de transcriptómica.

El uso de estos microarrays ha permitido elucidar multitud de mecanismos de interacción de metales con organismos vivos tales como el Cr (VI) [10] o el Cd [11] y de MNPs incluyendo las de Se [12] o las de CuO [13], entre otras.

La evaluación de los efectos tóxicos de los metales y las MNPs sobre la expresión de las proteínas puede ser útil no solo para conocer los mecanismos biomoleculares asociados a la toxicidad, sino también para identificar posibles marcadores proteicos específicos de la exposición y la respuesta a dichos metales. Dentro de las diferentes estrategias de cuantificación de proteínas, SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*) sigue estando considerada la más eficaz, debido a su simplicidad, combinada con la alta exactitud y precisión que presenta. (Figura 3) [14]. Es por este motivo, que casi la mayor parte de estudios de proteómica llevados a cabo para elucidar mecanismos de toxicidad se han realizado empleando esta estrategia.

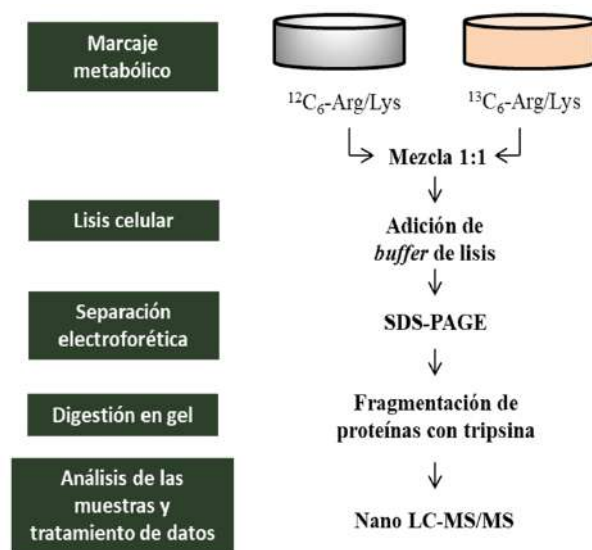


Figura 3. Esquema general de un experimento SILAC

La estrategia general de SILAC es un enfoque directo en el que una población celular se marca con un aminoácido ligero (control – estado A) y otra población celular se marca con su homólogo pesado (tratada – estado B). El aminoácido pesado puede contener ^2H , ^{13}C o ^{15}N en lugar de ^1H , ^{12}C o ^{14}N . La incorporación del aminoácido pesado en un péptido produce un desplazamiento de masa conocido en comparación con el péptido que contiene la versión ligera del mismo aminoácido (por ejemplo, 6 Da en el caso del $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$), pero no hay otros cambios químicos. Después de obtener aproximadamente el 100% del marcaje (normalmente después de 5-6 duplicaciones de células), se mezclan las células de los dos estados, se extraen sus proteomas y se analizan por espectrometría de masas (MS). Cada péptido aparece como un par en los espectros de masas, el péptido de menor masa contiene el aminoácido ligero y procede de una proteína perteneciente al estado A, y el péptido de mayor masa contiene el aminoácido pesado y procede de la misma proteína, pero de una fuente sometida a diferentes condiciones de crecimiento (estado B). Dado que los aminoácidos ligeros y pesados son químicamente idénticos, excepto por su diferencia de masa, la relación de las intensidades de los picos en el espectrómetro de masas arroja directamente la relación cuantitativa de las proteínas de la población celular correspondiente al estado A frente al estado B. SILAC se caracteriza por dos aspectos principales: Se puede conseguir una eficiencia de marcaje del 100% permitiendo que las células crezcan en el medio de cultivo durante 5-6 duplicaciones de la población celular, y ambas muestras (estados A y B) pueden combinarse al principio del proceso analítico (justo después de completar el marcaje). Estas dos características hacen de SILAC uno de los métodos más fiables para la cuantificación de proteínas desarrollados hasta ahora, ya que evita los errores que pueden introducirse durante los procedimientos de preparación de las muestras. Esto es especialmente importante cuando se utilizan métodos complejos de

fraccionamiento/purificación de proteínas, que son propensos a introducir errores en los resultados finales si se realizan de forma independiente para las dos muestras. La principal limitación de la estrategia SILAC reside en la imposibilidad o el elevado coste de marcar organismos enteros con los aminoácidos isotópicamente diferentes. Con el fin de resolver este problema, hace unos años se diseñó una nueva estrategia denominada super-SILAC, que permite comparar dos (o más) tejidos u organismos. Esta estrategia, que es una modificación del enfoque SILAC convencional, utiliza una mezcla de proteínas marcadas con los llamados aminoácidos "pesados" (normalmente $^{13}\text{C}_6\text{-Lys}$ y $^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$) que provienen de un cultivo de células afines al tejido u organismo a estudiar. Esta mezcla de proteínas marcadas se denomina "super-SILAC mix" y actúa como estándar interno en la cuantificación, permitiendo así comparar indirectamente la expresión de proteínas en dos tejidos u organismos diferentes (Figura 4) [15]. Tanto la estrategia SILAC como la super-SILAC han contribuido significativamente a la elucidación de diferentes mecanismos biomoleculares asociados a la toxicidad de numerosas especies metálicas [15, 16].

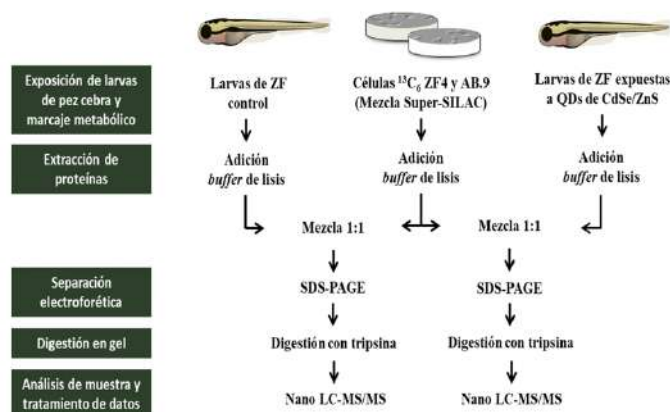


Figura 4. Esquema de un experimento super-SILAC empleado para evaluar la toxicidad de quantum dots de CdSe/ZnS en larvas de pez cebra [15].

En cuanto a la metabolómica, tanto la estrategia dirigida como la no dirigida han surgido en los últimos años permitiendo la expansión de diferentes áreas científicas a través de la caracterización de determinados procesos fisiopatológicos. Mediante las herramientas metabolómicas se puede identificar y/o cuantificar un elevado número de metabolitos de distinta naturaleza como azúcares, lípidos, aminoácidos, vitaminas, pequeños péptidos, etc. en un gran número de matrices que van desde células o tejidos hasta órganos o fluidos biológicos, permitiendo así obtener una instantánea de su fenotipo. Esta disciplina, por tanto, complementaría a las dos anteriores, permitiendo así obtener una idea global del estado de un sistema biológico a los tres niveles: genes, proteínas y metabolitos. Mientras que la metabolómica no dirigida tiene como objetivo la identificación y cuantificación relativa de todos los analitos medibles

dentro de un conjunto de muestras, incluidas las sustancias químicas desconocidas, la metabolómica dirigida se centra en la cuantificación absoluta de un grupo predefinido de analitos. Las principales técnicas analíticas utilizadas en metabolómica son la resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$) y la cromatografía de gases o líquidos acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS). Entre ellos, los enfoques basados en la espectrometría de masas proporcionan una mejor sensibilidad y son más ampliamente empleados, logrando un perfil metabólico preciso. En el caso de la metabolómica dirigida, un analizador de masas QqQ es la alternativa más utilizada, ya que proporciona una alta sensibilidad y selectividad. Por el contrario, en la metabolómica no dirigida se requiere un espectrómetro de masas de alta resolución, ya que es necesario identificar analitos desconocidos. En este sentido, mientras que el uso de GC-MS facilita la identificación de los metabolitos al existir bases de datos universales, cuando se emplea LC-MS la situación es más compleja, siendo necesario emplear valores de m/z exactos, espectros de MS/MS e información sobre la resolución isotópica para asignar de forma satisfactoria las identidades de los metabolitos. Estas estrategias metabolómicas, al igual que las anteriores, también están contribuyendo de forma significativa a ampliar el conocimiento sobre las interacciones de metales y MNPs con sistemas vivos a nivel molecular [17,18].

Confiemos en que, en los próximos años, el empleo de estas tecnologías ómicas, ampliamente establecidas en otros campos de investigación como el biomédico, siga expandiéndose en esta área, permitiendo así abordar de forma global y satisfactoria la complejidad de la interacción de metales y MNPs con sistemas vivos.

Referencias

- [1] D. Cui, H. Gao, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 683.
- [2] M. Tarantola, et al. *ACS Nano* 3 (2009) 213.
- [3] J.L. Luque-García, P. Cabezas-Sánchez, C. Camara, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 703.
- [4] H.A. Ngwa, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 (2011) 227.
- [5] S.M. Hussain, et al. *Toxicol. Vitro* 19 (2005) 975.
- [6] M.N. Fernández, R. Muñoz-Olivas, J.L. Luque-García, *Nanotoxicology* 13 (2019) 812.
- [7] S. Montalvo-Quiros, J.L. Luque-García, *Food Chem. Toxicol.* 127 (2019) 197.
- [8] A. Albanese, W.C.W. Chan, *ACS Nano* 5 (2011) 5478.
- [9] M. Neagu, D. Boda, *Recent Pat., Biomark.* 2 (2012) 75.
- [10] A. Izzotti, et al. *Mol. Carcinog.* 35 (2002) 75.
- [11] G.T. Tsangaris, A. Botsonis, I. Politis, F. Tzortzatos-Stathopoulou, *Toxicology*, 178 (2002) 135.
- [12] H. Estevez, E. García-Calvo, J. Rivera-Torres, M. Vallet-Regi, B. Gonzalez, J.L. Luque-García, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 356.
- [13] N. Hanagata, F. Zhuang, S. Connolly, J. Li, N. Ogawa, M. Xu, *ACS Nano* 5 (2011) 9326.
- [14] P. Cabezas-Sánchez, E. García-Calvo, C. Camara, J.L. Luque-García, *Toxicol. Res.*, 5 (2016) 291.
- [15] E. García-Calvo, P. Cabezas-Sánchez, J.L. Luque-García, *Chemosphere*, 263 (2021) 128170.
- [16] S. Cuello et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 315.
- [17] A. Machuca et al. *Pharmaceutics* 13 (2021) 1629.
- [18] M. Bellouard et al. *Chem. Res. Toxicol.* 35 (2022) 80.