

### ANÁLISIS ELEMENTAL E ISOTÓPICO MEDIANTE ICP-MS Y SU INTERÉS PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES OCULARES ASOCIADAS A LA EDAD: FLUIDOS BIOLÓGICOS (SISTÉMICO Y LOCAL) Y CÉLULAS

Rosario Pereiro<sup>1</sup>, Marta Aranaz<sup>1</sup>, Marta Costas-Rodríguez<sup>2</sup>, Héctor González-Iglesias<sup>3</sup>, Frank Vanhaecke<sup>4</sup> y Lara Lobo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo (Asturias)

<sup>2</sup>Centro de Investigación Mariña, Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Universidad de Vigo, 36310 Vigo (Galicia)

<sup>3</sup>Departamento de Tecnología y Biotecnología de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa (Asturias)

<sup>4</sup>Departamento de Química, Universidad de Gante, 9000 Gante (Bélgica)

#### INTRODUCCIÓN

El envejecimiento y el aumento de la esperanza de vida de la población supone que, cada vez con más frecuencia, enfermedades antes consideradas puntuales comiencen a ser más habituales, como son las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad.

El ojo es un órgano altamente expuesto a eventos oxidativos e inflamatorios, procesos directamente relacionados con el desarrollo de patologías oculares asociadas al envejecimiento tales como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y el glaucoma. En condiciones fisiológicas, el ojo dispone de sistemas de defensa antioxidantes para contrarrestar el exceso de especies reactivas del oxígeno (ROS). Sin embargo, el desequilibrio a favor de las ROS desencadena en daño oxidativo, produciéndose una alteración del equilibrio homeostático del organismo, y en la liberación intracelular y citotóxica de metales esenciales tales como cobre y zinc. En este sentido y el hecho de que i) la fisiología de estas patologías no se conoce en profundidad, ii) son irreversibles, y iii) hay riesgo de diagnóstico tardío por la falta de síntomas en etapas iniciales, denota la evidente necesidad de desarrollar metodologías analíticas dirigidas a una mejor comprensión de los procesos metabólicos implicados en estas enfermedades y/o la identificación de posibles biomarcadores.

En este contexto, este trabajo se ha centrado en investigar el potencial del análisis elemental e isotópico a tres niveles biológicos: sistémico (suero sanguíneo), local (humor acuoso), y celular (células fetales humanas del epitelio pigmentario de la retina), con el objetivo de ahondar en el conocimiento de los procesos bioquímicos de la dishomeostasis de metales (relacionados con el envejecimiento) y la aparición de enfermedades oculares asociadas a la edad. Estos estudios podrían contribuir a la identificación de elementos diana clave en el diagnóstico/pronóstico de estas patologías.

Concretamente, en primer lugar, se evaluó la dishomeostasis de elementos que podrían estar implicados en la patogénesis de la DMAE. Si bien las

alteraciones de la DMAE se limitan al sistema ocular, teniendo en cuenta que idealmente la toma de muestras biológicas debería ser lo menos invasiva posible, se planteó utilizar suero sanguíneo como muestra objeto de estudio. Así, se determinaron Fe, Cu, Zn, P, Mg, Na y K en suero de pacientes diagnosticados con esta patología y se compararon los resultados obtenidos con una población control mediante el empleo de herramientas bioinformáticas. Adicionalmente, se realizó el análisis isotópico de cobre, elemento involucrado en el ciclo visual, mediante ICP-MS de tipo multicolector (MC-ICP-MS).

A raíz de los resultados obtenidos a nivel sistémico, se decidió evaluar la variabilidad iónica en un fluido localizado y directamente relacionado con el sistema ocular. Así, se determinaron elementos químicos que podrían estar involucrados en la fisiología y patología del glaucoma en muestras de humor acuoso de pacientes con glaucoma pseudoexfoliativo (PEXG) y glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis isotópico de Cu, Zn y Ca en este fluido biológico, lo que supuso un reto desde el punto de vista metodológico para Cu y Zn debido al limitado volumen de muestra (10-450 µL).

Finalmente, y teniendo en cuenta estudios del papel protector del Zn como agente antioxidante y antiinflamatorio, nos planteamos estudiar los cambios a nivel elemental e isotópico que de este elemento pudieran ocurrir al someter a células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) a un evento proinflamatorio, el cual fue inducido mediante la adición de interleucina 1 $\alpha$  (IL $\alpha$ ) al medio apical celular.

#### EXPERIMENTAL

##### Muestras y procedimiento

Las muestras de suero y humor acuoso fueron recogidas en la Fundación Oftalmológica Fernández-Vega, tras haber firmado los pacientes el consentimiento previo correspondiente. Se dispuso de un total de 37 muestras de suero: 20 de individuos diagnosticados de DMAE y 17 de

individuos control (con cataratas). En relación al humor acuoso, se dispuso de un total de 38 muestras: 17 de pacientes diagnosticados de glaucoma pseudoexfoliativo (PEXG), 5 de glaucoma primario de ángulo abierto (POAG) y 16 individuos control (con cataratas). En todos los casos, se aseguró un rango etario similar entre controles y grupo de pacientes, así como un historial clínico similar a excepción de la patología ocular.

El cultivo celular del EPR se creció a partir de células fetales humanas de este tejido (ScienCell Research, Estados Unidos). Concretamente, las células se incubaron en 2 placas provistas de 12 pocillos Transwell/placa (provistos de una bicámara: basal o inferior y apical o superior, creciendo células en el espacio intermedio entre ambas cámaras sobre una matriz Geltrex), en medio de crecimiento durante los 7 primeros días y a continuación por un medio apto para favorecer la diferenciación celular (Medio Esencial Mínimo de Harry Eagle, Sigma Aldrich), la cual se monitorizó por un lado teniendo en cuenta el cambio de pigmentación al microscopio (LEICA DM IL LED, Leica Microsystems) y por otro, midiendo la resistencia transepitelial de la monocapa celular (Voltímetro MilliCell ERS-2, Millipore Corporation, Estados Unidos). En todo momento, se mantuvo una temperatura de 37 °C.

Las incubaciones pertinentes para evaluar el papel del Zn en eventos proinflamatorios se llevaron a cabo después de 31 días, cuando las células ya estaban maduras y diferenciadas. Para ello, siempre se empleó medio Miller en todos los pocillos como medio de diferenciación en el compartimento y se varió el medio apical según se recoge en la Tabla 1. Brevemente, a cada uno de los pocillos, de las Placas 1 y 2, se añadió en la cámara apical el medio indicado en la Tabla 1 y se mantuvo a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio (apical y basal). La Placa 1, con las células, se congeló directamente con la misma finalidad.

**Tabla 1:** Esquema procedimiento experimental aplicado a las células. En todos los casos se empleó medio Miller (MM) como disolvente. El pocillo 1 en ambas placas, se empleó como blanco de procedimiento (sin células).

	POCILLO	Tiempo de incubación (horas)	
		24	48
PLACA 1	1	Sin células	---
	2-4	100 µM Zn	---
	5-8	MM (Control)	---
	9-12	100 U/mL IL1α	---
PLACA 2	1	Sin células	Sin células
	2-4	MM (control)	MM (control)
	5-8	100 µM Zn	100 U/mL IL1α
	9-12	100 U/mL IL1α	100 µM Zn

En el caso de la Placa 2, se realizó un segundo tratamiento a las células de otras 24 h de duración. Es decir, pasadas las 24 h del primer tratamiento, se sustituyó el medio celular según se ha recogido en la Tabla 1. Así, las células incubadas inicialmente en medio Miller con Zn (cámara

apical), pasaron al medio que induce el proceso inflamatorio (ILα) y viceversa. Por el contrario, a las células control se les añadió de nuevo medio Miller. La Placa 2 con las células libres de medio de cultivo se congeló a la misma temperatura

### Tratamiento de las muestras

Suero, humor acuoso, y las células se sometieron a una digestión ácida empleando una mezcla de HNO<sub>3</sub> 14 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9,8 M (en una proporción 4:1) en digestores Savillex®, que fue calentada a 100 °C. En el caso de las células, que habían sido congeladas directamente en la Placa, se arrastraron de la matriz Geltrex con el HNO<sub>3</sub> tras el proceso de descongelación de la Placa. El HNO<sub>3</sub> se añadió posteriormente al digestor Savillex. Transcurridas 18-24 h y calentando a una temperatura de 110 °C, el digerido fue evaporado a 90 °C y finalmente se reconstituyeron en HCl 8 M. Se reservaron 20 µL del digerido para análisis elemental mediante ICP-MS.

### Análisis elemental mediante ICP-MS

El análisis multielemental se realizó mediante el ICP-MS de doble enfoque Element 2 y el Element XR, disponible en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo (Edificio Severo Ochoa) y en el grupo de investigación Atomic & Mass Spectrometry de la Universidad de Gante respectivamente. El análisis elemental se llevó a cabo por calibración externa, empleando Ga como patrón interno (10 ppb). Todos los isótopos fueron monitorizados en media resolución (R~4000) excepto en el caso del <sup>39</sup>K<sup>+</sup>, para el que se empleó la alta resolución (R~10000) y así poder resolver el pico del analito de la interferencia <sup>38</sup>Ar<sup>1</sup>H<sup>+</sup>.

### Purificación cromatográfica

Para la separación de Cu y Zn del resto de la matriz de la muestra (suero, humor acuoso y células) se empleó la resina AG MP1 (Bio-Rad, España), siguiendo el protocolo propuesto por Lauwens y colaboradores<sup>1</sup>. En el caso del Cu, la separación cromatográfica hubo de realizarse hasta tres veces para asegurar la completa eliminación del Na. Es decir, tras la primera purificación, la fracción de Cu se evaporó a 90 °C y se reconstituyó de nuevo en HCl 8 M para realizar de nuevo el protocolo de purificación completo. Finalmente, las fracciones de Cu y Zn purificadas se evaporaron a 90 °C y se reconstituyeron en 200 µL de HNO<sub>3</sub> 0,28 M. 20 µL de esta disolución se reservó para análisis elemental y para comprobar el factor de recuperación de Cu y Zn.

La purificación de Ca se realizó siguiendo un protocolo especialmente desarrollado para esta aplicación; en particular,<sup>3</sup> empleando la resina AG50W-X8.

### Análisis isotópico mediante multicolector ICP-MS

La medida de relaciones isotópicas de Cu y Zn se realizó mediante MC-ICP-MS (Neptune y Neptune XT equipado con una interfase tipo Jet, Thermo Scientific) de la

Universidad de Oviedo y Gante respectivamente, en pseudo-media resolución. El efecto de discriminación de masas se corrigió mediante la adición de un patrón interno (Ga/Zn para la medida de relaciones isotópicas de Cu y Cu para la medida de relaciones isotópicas de Zn) de acuerdo con la Ley revisada de Russell<sup>3</sup> y un material de referencia isotópicamente certificado (NIST 976 SRM/IRMM-3702) como patrón externo, siguiendo una secuencia patrón-muestra-patrón. Se ha de tener en cuenta que en el caso de las medidas realizadas en la Universidad de Oviedo y ante la ausencia de patrón externo certificado isotópicamente, se empleó un patrón ICP-MS estándar asumiendo una relación isotópica <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu igual a la natural. Muestras y patrones se midieron en HNO<sub>3</sub> 0,28 M.

En el caso de las muestras de humor acuoso, medios de cultivo y células, se hizo uso de un sistema de desolvatación de muestras (Aridus II, Teledyne Cetac Technologies, USA) lo que permitió la medida de relaciones isotópicas en tan solo 5 ppb Cu y 20 ppb Zn.

Para la medida de relaciones isotópicas de Ca, únicamente se empleó la corrección externa utilizando un patrón elemental del Ca disponible en el laboratorio y que previamente fue sometido al mismo proceso de purificación. La concentración de muestras y patrones se ajustó a 10 mg/L en HNO<sub>3</sub> 0,14 M. Los resultados se expresaron en La composición isotópica de Ca se expresó como  $\delta^{44/42}$ .

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Suero: DMAE vs controles.

Se llevó a cabo el análisis elemental de Na, K, P, Mg, Fe, Cu y Zn, obteniéndose los resultados promedios y desviación estándar recogidos en la Tabla 2. Adicionalmente, la Figura 1 recoge una representación de las concentraciones para aquellos elementos cuyos valores mostraron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados. En particular, se encontraron diferencias estadísticamente diferentes entre los niveles de P y Zn (prueba U de Mann-Whitney; p = 0,0457 y p = 0,0271 respectivamente). Cabe destacar, además, que los niveles de Zn en los pacientes de DMAE fueron muy superiores a los de la población control y también superior a los valores de referencia en población sana según la bibliografía<sup>4</sup>.

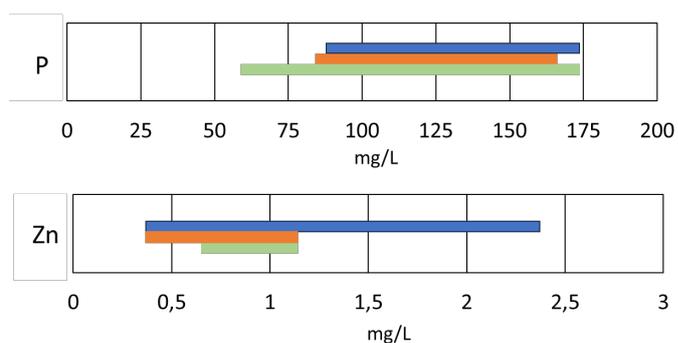
Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis isotópico de Cu, y si bien no se observaron diferencias a nivel de composición elemental, sí que se observó una composición isotópica de Cu más ligera (p=0,049) en las muestras de pacientes diagnosticados con DMAE ( $\delta^{65} = -0.48 \pm 0,35$ ) en comparación con el grupo control ( $\delta^{65} = -0.28 \pm 0,17$ ). Este mismo comportamiento, es decir, composición isotópica más ligera en el suero de individuos con una determinada enfermedad, se ha venido observando en la bibliografía para otras patologías tales como el cáncer<sup>5</sup> o la cirrosis hepática<sup>6</sup>, lo que evidencia que la composición isotópica de Cu a nivel sistémico es indicativa de diversas patologías y

por tanto no puede utilizarse como biomarcador, pero sí sería un parámetro interesante para cribado.

**Tabla 2:** Concentraciones elementales promedio (mg/L) encontradas en el grupo control (n=17) y grupo DMAE (n=20) y sus correspondientes desviaciones estándar. Se han señalado con un asterisco los elementos que mostraron diferencias significativas entre las dos poblaciones.

	controles	AMD
<b>Na</b>	2978 ± 1420	3330 ± 950
<b>K</b>	213 ± 42	268 ± 152
<b>P*</b>	138 ± 23	122 ± 24
<b>Mg</b>	24 ± 5	23 ± 5
<b>Fe</b>	2,1 ± 0,7	3,5 ± 4,6
<b>Cu</b>	0,99 ± 0,32	0,83 ± 0,21
<b>Zn*</b>	1,1 ± 0,5	0,75 ± 0,23

Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis isotópico de Cu, y si bien no se observaron diferencias a nivel de composición elemental, sí que se observó una composición isotópica de Cu más ligera (p=0,049) en las muestras de pacientes diagnosticados con DMAE ( $\delta^{65} = -0.48 \pm 0,35$ ) en comparación con el grupo control ( $\delta^{65} = -0.28 \pm 0,17$ ). Este mismo comportamiento, es decir, composición isotópica más ligera en el suero de individuos con una determinada enfermedad, se ha venido observando en la bibliografía para otras patologías tales como el cáncer<sup>5</sup> o la cirrosis hepática<sup>6</sup>, lo que evidencia que la composición isotópica de Cu a nivel sistémico es indicativa de diversas patologías y por tanto no puede utilizarse como biomarcador, pero sí sería un parámetro interesante para cribado.



**Figura 1:** Rango de concentraciones en las muestras de suero del grupo DMAE (azul), control (naranja) y población de referencia sana según literatura (verde).

Humor acuoso: Glaucoma vs controles

Al igual que se hizo para el suero, pero esta vez empleando un fluido biológico directamente relacionado con la patología neurodegenerativa, se evaluó la dishomeostasis de metales (a nivel de composición elemental e isotópica) en humor acuoso. Este fluido es un líquido transparente cuya función principal radica en el mantenimiento de la presión intraocular, de forma que si no drena correctamente produce un aumento de dicha presión,

factor de riesgo en la aparición del glaucoma. Si bien se trata de un fluido ideal para el estudio de esta patología ocular, el volumen disponible es bastante limitado, típicamente entre 100 y 150  $\mu\text{L}$ .

De manera similar al suero, se analizaron Na, P, Mg, Fe, Cu y Zn, en el humor acuoso del grupo control (n = 16) y de los grupos con glaucoma PEXG (n= 17) y POAG (n=5). Para el Ca únicamente se pudieron analizar controles (n = 4) e individuos de PEXG (n= 6). Tal y como puede verse en la Tabla 3, los valores de Na encontrados en el humor acuoso son similares a los del suero sanguíneo. La concentración de la mayoría de los elementos analizados en ambos fluidos fue inferior en este fluido local en comparación con el suero. El Zn además, mostró concentraciones promedio inferiores en el humor acuoso en los tres grupos estudiados respecto al suero del grupo control. Este hecho podría estar relacionado con la expresión/actividad del sistema Zn-metalotioneína y la protección frente al daño oxidativo observado en enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, la estadística no reveló diferencias para este elemento en particular.

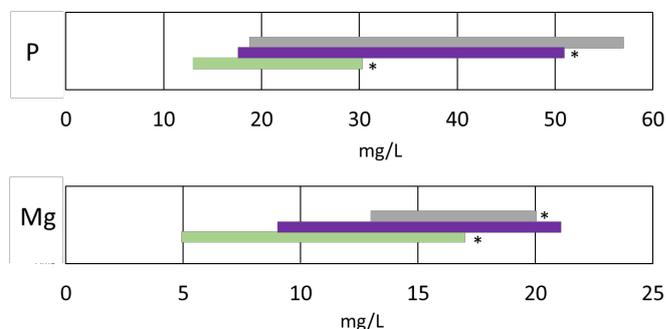
Para aquellos elementos en los que se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos estudiados, la Figura 2 recoge el rango de concentraciones encontradas en cada uno de ellos. Al igual que en el suero, las concentraciones de P resultaron ser estadísticamente diferentes: en el caso del humor acuoso, con niveles de concentración superiores en el grupo PEXG frente al control (p = 0,023 prueba de Dunn post hoc). Para el Mg, el grupo POAG mostró niveles superiores a los del grupo control (prueba Bonferroni post hoc).

**Tabla 3:** Rango de concentraciones elementales para Na, P, Mg y Ca en mg/L y para Fe, Cu y Zn en  $\mu\text{g/L}$  encontradas en el grupo control (n=17) y grupos glaucoma junto con sus correspondientes desviaciones estándar. Se ha señalado con un asterisco los elementos que mostraron diferencias significativas.

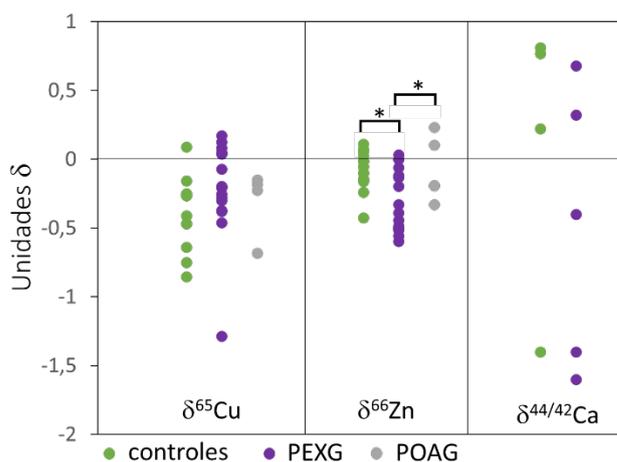
	controles	PEXG	POAG
<b>Na</b>	3020 $\pm$ 591	3114 $\pm$ 788	3595 $\pm$ 1710
<b>P*</b>	21 $\pm$ 4	27 $\pm$ 8	36 $\pm$ 16
<b>Mg*</b>	11 $\pm$ 3	13 $\pm$ 4	17 $\pm$ 3
<b>Ca</b>	287 $\pm$ 264	114 $\pm$ 66	---
<b>Fe</b>	570 $\pm$ 592	1004 $\pm$ 946	1177 $\pm$ 1193
<b>Cu</b>	31 $\pm$ 28	100 $\pm$ 175	163 $\pm$ 236
<b>Zn</b>	238 $\pm$ 79	206 $\pm$ 117	261 $\pm$ 157

Finalmente, se llevó a cabo el análisis isotópico de Cu, Zn y Ca. Los resultados se han representado en la Figura 3. El análisis estadístico posterior únicamente reveló diferencias significativas para el Zn, entre el grupo control y PEXG (p=0,001, prueba Bonferroni post hoc) y entre el grupo PEXG y POAG (p = 0,024, prueba Bonferroni post hoc). Las diferencias en la composición isotópica de Zn podrían implicar una desregulación de las metalotioneínas durante la patogénesis del glaucoma. Adicionalmente, al comparar Cu y Zn, se puede observar que ambos elementos

siguen una tendencia diferente. Los grupos con una composición isotópica más ligera que el control (por ejemplo, el  $\delta^{66}\text{Zn}$  en PEXG) presenta una composición isotópica más pesada para el otro elemento (es decir,  $\delta^{65}\text{Cu}$  en PEXG), resultados que ponen en evidencia el papel antagonico que tienen estos elementos esenciales en el organismo.



**Figura 2:** Rango de concentraciones medidas en las muestras de humor acuoso en el grupo POAG (gris), PEXG (morado) y controles (verde). Se ha señalado con un asterisco aquellos grupos que mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de P y Mg.



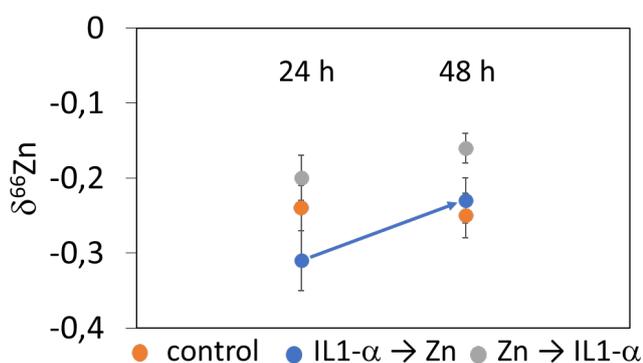
**Figura 3:** Composición isotópica de Cu ( $\delta^{65}\text{Cu}$ ), Zn ( $\delta^{66}\text{Zn}$ ) y Ca ( $\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$ ) obtenida para las muestras de humor acuoso.

En relación a la composición isotópica de Ca, los resultados obtenidos en este estudio muestran un rango más amplio de  $\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$  en el humor acuoso de pacientes con enfermedad de glaucoma (-2,4 a 0,68) que en sujetos control (de -1,4 a 0,81), lo que está en concordancia con el comportamiento encontrado para el análisis isotópico de este elemento en suero al comparar individuos con mieloma activo respecto a mieloma no activo<sup>7</sup>. Las alteraciones en la composición isotópica del Ca podrían estar directamente relacionadas con cambios en las proteínas S100 (tienen Ca ligado a su estructura), una familia de proteínas que está involucrada en numerosas actividades celulares. Por ejemplo, la proteína S100A8 está asociada con la presencia de especies reactivas de oxígeno en la inflamación de la superficie ocular. De hecho, se ha

encontrado que los niveles de S100A8 están elevados en el líquido lagrimal de pacientes con DMAE bajo medicación crónica<sup>8</sup>.

**Modelo celular de envejecimiento:** El papel protector del Zn.

En los experimentos realizados para evaluar el rol del Zn como elemento regulador de la vía antioxidante y como agente proinflamatorio, se empleó un modelo celular *in vitro* del EPR que se cultivó en Placas Transwell®. Parte de las células se suplementaron con Zn durante 24 h mientras que en otras se añadió IL-1 $\alpha$  como agente inductor del proceso inflamatorio. Transcurrido ese tiempo se les cambió el medio apical y aquellas células previamente tratadas con Zn se les añadió IL-1 $\alpha$  y a las células tratadas con este agente durante las primeras 24 h, se las suplementó con Zn. Asimismo, y para comparar los resultados con un control, una parte de las células se mantuvo en medio Miller durante 24 y 48 h. Los detalles de los experimentos realizados están indicados en la Tabla 1.



**Figura 4:**  $\delta^{66}\text{Zn}$  obtenida para las células control a las 24 h y 48 h (naranja), las células tratadas en primer lugar con IL1- $\alpha$  y seguidamente con Zn (azul) y las que se suplementaron primero con Zn y luego se les añadió la IL1- $\alpha$  (gris).

Se puede observar cómo las células control (naranja) mantienen constante la composición isotópica de Zn, composición isotópica que resultó similar a la del Zn añadido en la suplementación, tal y como puede verse en la Figura 4 para las células tratadas con Zn las primeras 24 h (gris, 24 h). Por acción del evento proinflamatorio con IL1- $\alpha$ , la composición isotópica a las 48 h no ha variado de manera apreciable (gris, 48 h). Sin embargo, si la IL1- $\alpha$  se añade sin haber suplementado las células, se observa una composición isotópica más ligera (azul, 24 h) que la de las células control y las células tratadas con Zn. La eliminación del medio de la IL1- $\alpha$  de las primeras 24 h y sustituirlo por un medio con Zn<sup>2+</sup> durante otras 24 h, resultó compensar los cambios en  $\delta^{66}\text{Zn}$  inducidos por la interleucina, obteniéndose de nuevo una composición isotópica de Zn similar a la de las células control (azul, 48 h). Por tanto, se puede deducir que los estudios de suplementación con Zn mostraron que esta suplementación ayuda a atenuar los

cambios inducidos por la IL1- $\alpha$  en la respuesta inflamatoria.

## CONCLUSIONES

Los estudios realizados tanto en fluidos presentes a nivel sistémico (suero sanguíneo), local (humor acuoso) y la investigación en un modelo celular del EPR, ponen de manifiesto que existen no sólo alteraciones a nivel de composición elemental sino también isotópica en patologías oculares neurodegenerativas asociadas a la edad. Si bien estos biomarcadores a nivel sistémico no pueden clasificarse como específicos para estas patologías, los resultados obtenidos para el fluido local sí que tendrían más trascendencia desde un punto de vista práctico. El empleo del modelo celular parece mostrar que el Zn<sup>2+</sup> juega un papel clave para frenar o ralentizar este tipo de patologías; de hecho, este elemento suele darse en forma de suplemento alimenticio para reducir la progresión de la DMAE.

Finalmente, cabe señalar que la medida de relaciones isotópicas en el humor acuoso y en el cultivo celular *in vitro* ha supuesto un reto desde el punto de vista metodológico, debido a la pequeña cantidad absoluta de analito disponible y a el riesgo de posibles fuentes de contaminación, especialmente crítico en el contexto del análisis isotópico de Zn.

## REFERENCIAS

- [1] S. Lauwens, M. Costas-Rodríguez, H. Van Vlierberghe, F. Vanhaecke, Sci. Rep. 6 (2016) 30683.
- [2] E. Valencia, A. López, L. Lobo, H. González-Iglesias, R. Pereiro, J. Anal. At. Spectrom. 36 (2021) 2573-2578.
- [3] D.C. Baxter, I. Rodushkin, E. Engström, D. Malinovsky, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 427-430.
- [4] U. Majewska, P. Łyzwa, K. Łyzwa, D. Banas, A. Kubala-Kukus, J. Wudarczyk-Moćko, I. Stabrawa, J. Braziewicz, M. Pajek, G. Antczak, B. Borkowska, S. Gozdz, Spectrochim. Acta Part B 122 (2016) 56-61.
- [5] Ph. Télouk, A. Puisieux, T. Fujii, V. Balter, V. Bondanese, A.P. Morel, G. Clapisson, A. Lamboux, F. Albarede, Metallomics, 7 (2015) 299-308.
- [6] M. Costas-Rodríguez, Y. Anoshkina, S. Lauwens, H. Van Vlierberghe, J. Delanghe, F. Vanhaecke, Metallomics, 7 (2015) 419-498.
- [7] Y. Yan, M. Ge, R. Ma, H. Zhao, D. Wang, C. Hu, J. Wang, W. Chen and C. Zhang, Clin. Chim. Acta, 461 (2016) 141-145.
- [8] E. Valencia-Agudo, M. García Díaz, B. Fernández-Vega, R. Pereiro, L. Lobo, H. González-Iglesias, IOVS, 63 (2022) 12 páginas.