

BIOIMÁGENES CUANTITATIVAS DE LA DISTRIBUCIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ABLACIÓN LÁSER ACOPLADA A ICP-MS: NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y ROJO DE RUTENIO COMO MARCADORES

Paula Menero-Valdés¹, Lydia Álvarez², Héctor González-Iglesias³, Beatriz Fernández¹,
Rosario Pereiro¹

¹Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, Avda. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Asturias, España

²Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO), Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012, Oviedo, Asturias, España

³Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, España

mrpereiro@uniovi.es, <https://e2bna.grupos.uniovi.es/>, @e2bnauniovi (Instagram)

*fernandezbeatriz@uniovi.es

Abstract

La técnica ablación láser (LA) ICP-MS puede emplearse para estudiar la distribución espacial de elementos endógenos y biomoléculas en diferentes tipos de muestras. En el caso de los cultivos celulares, los cuales presentan una gran heterogeneidad, es posible obtener de manera sencilla un análisis cualitativo de los analitos en células individuales. Sin embargo, es necesario aún desarrollar métodos que permitan conocer no solo la distribución de los analitos sino también su concentración (i.e., masa de analito por unidad de volumen). Este tipo de información resulta de crucial importancia a la hora de evaluar diferentes tratamientos o suplementaciones en una población celular. En este artículo se desarrolla una metodología analítica que permite obtener imágenes cuantitativas para la distribución de proteínas en células individuales empleando rojo de rutenio (RR) como marcador del volumen celular. Se ha estudiado la proteína CYP1B1 en dos poblaciones de células ARPE-19 empleando nanoclústeres de oro (AuNCs) como marca elemental.

1. Introducción

El estudio de proteínas implicadas en procesos biológicos es un campo de gran interés en bioquímica ya que cambios en los niveles de expresión o localización de ciertas biomoléculas puede ayudar a entender el origen y desarrollo de determinadas enfermedades. En este sentido, los estudios de bioimagen de elementos endógenos y biomoléculas en muestras de cultivos celulares mediante ablación láser (LA) acoplado a un plasma de acoplamiento inductivo – espectrometría de masas (ICP-MS) presenta actualmente interesantes características en el ámbito bioquímico y clínico, tales como una alta sensibilidad (en el rango de las ppb), posibilidad de realizar análisis multiparamétricos, y elevada resolución espacial (del orden de 1 micra) [1].

El análisis de células individuales mediante LA-ICP-MS permite obtener de manera directa información sobre la distribución de los elementos endógenos en las células.

Además, también es posible llevar a cabo el estudio de biomoléculas empleando LA-ICP-MS, si bien es necesaria una etapa previa de inmunocitoquímica. Para ello, es necesario emplear anticuerpos específicos de las proteínas de interés que hayan sido marcados con una etiqueta elemental fácilmente detectable por ICP-MS (e.g., nanopartículas metálicas, quantum dots, lantánidos, etc.) [2]. En este sentido, el empleo de nanoclústeres metálicos (MNCs), nanopartículas con diámetros menores de 3 nm, ha demostrado ser una excelente marca elemental para la detección de biomoléculas empleando ICP-MS [3,4].

Uno de los mayores retos en el uso de la técnica LA-ICP-MS para el análisis de muestras biológicas es el desarrollo de métodos que proporcionen no solo información cualitativa para la distribución de los analitos en la muestra (imágenes en cuentas por segundo, cps), sino también información cuantitativa (i.e., masa o concentración del analito). Este hecho se debe principalmente a la ausencia de materiales de referencia apropiados para llevar a cabo la calibración. El número de materiales de referencia certificados (CRMs) para materiales biológicos es limitado y los que hay disponibles se presentan normalmente liofilizados, perdiendo la consistencia original de matrices biológicas como las secciones de tejido o los cultivos celulares [5].

Como alternativa a los CRMs, se han propuesto diversas estrategias de calibración empleado patrones de laboratorio con matrices similares a las de las muestras [6,7]. En concreto, las diferentes estrategias de cuantificación propuestas hasta la fecha para el análisis de células empleando LA-ICP-MS se basan en el uso de diferentes materiales (suplementados con los analitos de interés) que tratan de imitar la matriz celular; secciones de gelatina [8], microgotas de gelatina [9] o rodamina [10], y membranas de nitrocelulosa [11]. Además, Zheng *et al.* han evaluado recientemente el uso del análisis por dilución isotópica para la cuantificación de nanopartículas de plata (AgNPs) en células [12]. En dicho trabajo, los autores dispensan células individuales en una gradilla con un sistema microfluídico y a continuación, añaden sobre cada célula un picolitro de una disolución isotópicamente

enriquecida. En una etapa posterior, la célula y la gota de disolución son analizadas simultáneamente en un solo disparo mediante LA-ICP-MS. Esta estrategia se empleó para la cuantificación de AgNPs en células macrófagas de ratón, obteniendo límites de detección de 0.2 fg de Ag por célula. Por otro lado, Lores-Padín *et al.* evaluaron una metodología de cuantificación empleando patrones con la misma matriz que la muestra para la determinación de proteínas en células individuales. En este caso se empleó la misma línea celular de las muestras para sintetizar patrones de laboratorio [13]; se usaron células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) incubadas *in vitro* suplementadas con diferentes concentraciones de nanoclústeres de oro (AuNCs). Esta metodología se empleó para la cuantificación de proteínas diana localizadas en las células del EPR, previamente etiquetadas con anticuerpos específicos marcados con AuNCs como marca elemental en la etapa de inmunocitoquímica (ICC).

Teniendo en cuenta que pueden existir cambios en los niveles de proteínas derivados de cambios en el volumen celular [14], un factor importante a tener en cuenta cuando se estudian proteínas en células individuales es el volumen de cada una de las células en estudio para no extraer conclusiones erróneas. Sin embargo, hay una escasez de métodos que permitan la determinación del volumen celular por LA-ICP-MS. Van Malderen *et al.* han propuesto la combinación de LA-ICP-MS con medidas de μ -tomografía computarizada para reconstruir la distribución elemental en 3D en células HeLa [15]. Otros autores han propuesto el etiquetado de β -actina con Eu, y la relación del contenido total de proteína con el volumen celular [16]. Aunque esta premisa es asumible en la mayoría de los casos, puede haber tratamientos que causen que el contenido de proteína celular total deje de estar relacionado con el volumen celular (p.e., si causan una alteración de la osmolaridad). Por lo tanto, hay una necesidad actual de métodos que permitan conocer el volumen celular empleando LA-ICP-MS.

En este contexto, este trabajo se centra en el desarrollo de una metodología analítica para llevar a cabo la determinación de proteínas diana en células individuales mediante LA-ICP-MS, permitiendo conocer no solo la distribución de la proteína sino también el volumen de cada una de las células; es posible determinar la masa de proteína por unidad de volumen. Con dicho objetivo se ha empleado rojo de rutenio (RR) como marcador del volumen celular. Como prueba de concepto se ha estudiado la proteína CYP1B1 en dos poblaciones de células ARPE-19, bajo condiciones control y sometidas a estrés oxidativo, usando AuNCs como marca elemental y patrones de gelatina para realizar la calibración. En el **Fig. 1** se recoge un diagrama esquemático con la metodología desarrollada.

2. Experimental

Se cultivaron células ARPE-19 en condiciones control (CT) y sometidas a estrés oxidativo (incubadas durante 24 h con 2 mM de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH)). Esta concentración de AAPH fue optimizada con un inmunoensayo de viabilidad y otro de producción de

especies reactivas de oxígeno (ROS), de forma que se seleccionó la concentración de AAPH que causa un mayor incremento de ROS sin afectar a la viabilidad celular. A continuación, las células CT o tratadas con AAPH se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min.

Previo a su análisis por LA-ICP-MS las células, fijadas en portaobjetos, fueron sometidas a un protocolo de ICC con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína CYP1B1 marcado con AuNCs (inmunosonda Anti-CYP1B1:AuNCs) y seguidamente se incubaron 30 min con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de RR disuelto en agua ultrapura (acidificada a pH 5 con HCl). Para eliminar el exceso de reactivos, las células fueron lavadas por inmersión con agua ultrapura acidificada.

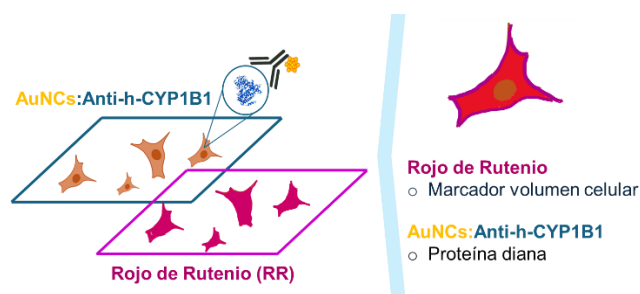


Fig. 1. Representación esquemática de la metodología desarrollada para determinar la masa de proteína por unidad de volumen en células individuales empleando LA-ICP-MS. El rojo de rutenio (RR) se utiliza como marcador del volumen celular y los AuNCs como marca elemental en la etapa ICC.

Las células CT y tratadas con AAPH se analizaron mediante LA-ICP-MS empleando un láser NWR193 (Elemental Scientific Inc. – ESI) equipado con una cámara de ablación TwoVol2 (ESI) y una interfase DCI (ESI) acoplado a un ICP-MS 7900 series (Agilent). Las condiciones experimentales para el análisis de las células están recogidas en la **Tabla 1**. Para procesar las imágenes de LA-ICP-MS se empleó el software Iolite v4 (ESI).

La calibración de las medidas de LA-ICP-MS se llevó a cabo con secciones de gelatinas dopadas con Au y Ru. Para ello se prepararon disoluciones de gelatina al 15% en masa dopadas con cantidades crecientes de RR y $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (en el rango entre 0 y 200 ppm) y se agitaron durante 15 min a 60 °C. A continuación, se formaron bolas de gelatina enfriándolas a -20 °C. Por último, se cortaron secciones de gelatina con el mismo espesor que las muestras usando un criostato. Para determinar la concentración de los patrones de laboratorio se llevó a cabo la digestión de las gelatinas con ácido nítrico y se determinó su concentración elemental empleando análisis por nebulización convencional ICP-MS.

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación del volumen celular

Con el objetivo de preparar unos patrones de laboratorio para realizar la calibración que sean similares a las células en estudio, en primer lugar, se determinó el grosor de las

células ARPE-19 fijadas en los portaobjetos mediante medidas por microscopía láser confocal después de marcar el citoplasma celular con un fluoróforo. En la **Fig. 2** se muestran dos imágenes, con las proyecciones x, y, z para varias células dispuestas sobre el sustrato. Se observó que las células ARPE-19 son homogéneas en grosor una vez fijadas en los portaobjetos, tanto dentro de una misma célula como comparando distintas células de una misma población. Los resultados experimentales mostraron que para un total de 100 células ARPE-19 su espesor promedio tenía un valor de $6,2 \pm 0.8 \mu\text{m}$.

Tabla 1. Parámetros experimentales empleados con el equipo LA-ICP-MS para el análisis de las muestras de células ARPE-19 y los patrones de gelatinas.

ICP-MS	Agilent 7900 series
Potencia RF	1350 W
Flujo Ar Plasma	15 L min ⁻¹
Flujo Ar auxiliar	0.85 L min ⁻¹
Isótopos	¹⁹⁷ Au ⁺ , ¹⁰¹ Ru ⁺ , ¹⁰³ Rh ⁺
Tiempo de integración	0.05 s
Tiempo por ciclo	0.106 s
Tipo de adquisición	tiempo resuelto
Sistema LA	NWR 193 ESI
Flujo He	0.9 L min ⁻¹
Fluencia	0.3 J cm ⁻²
Frecuencia de repetición	20 Hz
Velocidad de barrido	10 μm s ⁻¹
Forma del disparo	XYR
Tamaño del disparo	2x2 μm ²
Tipo de muestreo	línea a línea
Dimensiones del pixel	1x2 μm ²

Una vez conocido el espesor de las células, se prepararon secciones de gelatinas de 6 μm de espesor para ser

empleadas como patrones de calibración. Las gelatinas fueron fortificadas con los elementos en estudio (Ru, para seguir el marcador de volumen; RR, y Au para seguir la proteína diana; inmunosonda Anti-CYP1B1: AuNCs). Dado que las células tienen un grosor constante a lo largo de su superficie, puede asumirse que tienen la forma de un prisma irregular. De este modo, el volumen de una célula puede deducirse a partir de la fórmula matemática para el volumen de un prisma irregular (**Ecuación 1**):

$$V_{\text{célula}} = \text{Área base} \times \text{Altura} = \text{Área célula} \times \text{Espesor célula}$$

De esta forma, para calcular el volumen de una célula debe conocerse su área y su espesor. Como se ha descrito, el espesor de las células ARPE-19 fijadas en portaobjetos tiene un valor promedio de $6,2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ (medidas por microscopía confocal; n=100) y el área celular podría determinarse a partir de las imágenes ópticas de las células obtenidas con la cámara del sistema de ablación láser. Sin embargo, tal y como se observa en la **Fig. 3E** la resolución de estas imágenes no es lo suficientemente buena para distinguir las dimensiones de las células individuales y se comete un error significativo determinando de este modo el área de las células ARPE-19.

En este contexto, con la metodología desarrollada, se propone una manera alternativa para determinar el área de cada una de las células empleando RR, un marcador de membrana ampliamente utilizado en microscopía electrónica para visualizar células. Siguiendo la señal de Ru para las células analizadas por LA-ICP-MS, es posible visualizar el área celular con una resolución mucho mayor a la que se obtiene con las imágenes ópticas (**Fig. 3A versus Fig. 3E**, respectivamente). De esta forma, siguiendo la señal de Ru es posible dibujar una región de interés (ROI; marca roja sobre las células en las imágenes) con el programa Iolite, permitiendo determinar el área de cada célula.

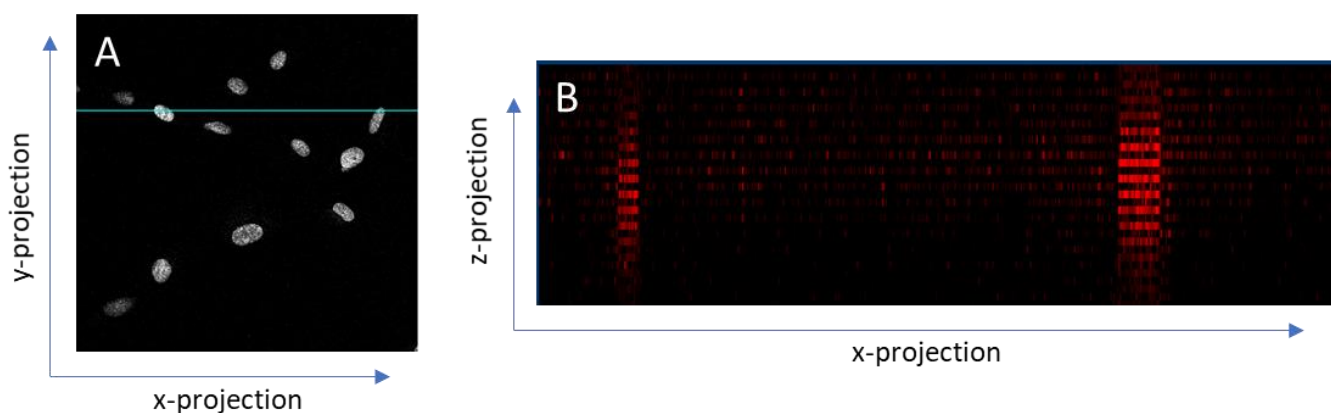


Fig. 2. Determinación del grosor de las células ARPE-19 fijadas en portaobjetos mediante microscopía láser confocal. (A) Proyección x, y de un portaobjetos donde se ven varias células, y (B) Proyección x, z donde se pueden observar dos células; Las dos células de la imagen corresponden a las identificadas con una línea azul en la proyección x, y de la imagen (A).

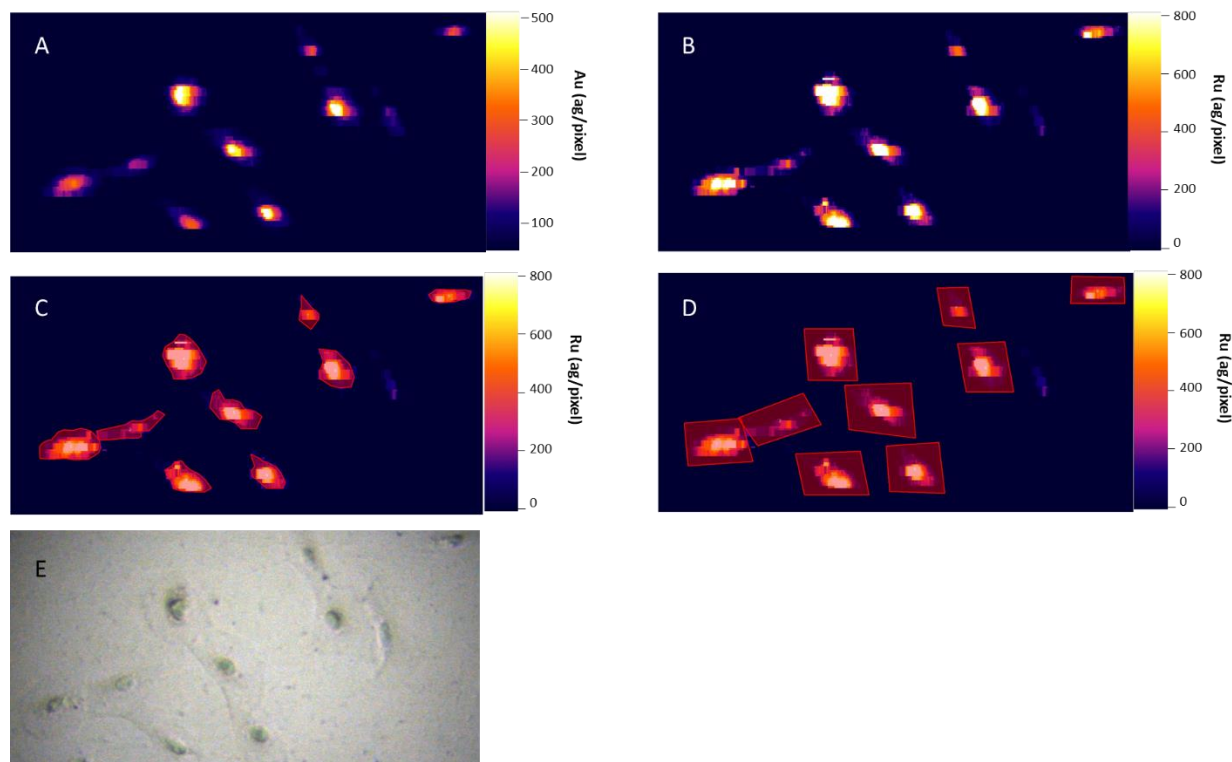


Fig. 3. Imágenes cuantitativas de células ARPE-19 CT obtenidas mediante LA-ICP-MS después del marcaje de la proteína diana CYP1B1 con la inmunosonda Anti-CYP1B1:AuNCs y de la membrana celular con RR. (A) Distribución de Au, (B) Distribución de Ru, (C) Regiones de interés seleccionadas con el programa Iolite, con forma poligonal, (D) Regiones de interés seleccionadas con el programa Iolite, con forma cuadrada/rectangular, y (E) Imagen óptica de las células tomada con la cámara del sistema de ablación láser.

Teniendo en cuenta las pequeñas dimensiones de las células y su forma al estar fijadas en los portaobjetos, este procedimiento puede ser largo y tedioso en experimentos en los que se analicen un gran número de células (i.e., hay que determinar el área celular, célula a célula dibujando cada una de las ROI). Sin embargo, se observó que si se representa la masa de Ru contenida en cada célula frente al volumen celular (calculado con la **Ecuación 1**) se obtiene una relación lineal. Por lo tanto, empleando un número de células representativo de la población celular se puede construir un calibrado para el volumen celular como el que se representa en la **Fig. 4** (masa de Ru por célula frente al volumen celular). De este modo, una vez construido el calibrado para una determinada población de células (se observó que el calibrado es lineal tanto para células CT como sometidas al tratamiento con AAPH) es posible determinar el volumen de cada célula individual simplemente analizando las células por LA-ICP-MS y siguiendo la señal de Ru. Se puede dibujar con el programa Iolite una ROI amplia que contenga la célula (**Fig. 3D**; mucho más rápido que delimitar exactamente el área celular como en la **Fig. 3C**), integrar la masa de Ru contenida en esa región e introducir ese valor en la recta de regresión del calibrado en volumen (**Fig. 4**) para conocer el volumen de la célula.

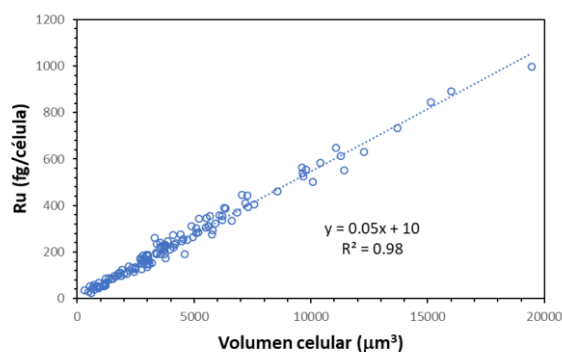


Fig. 4. Calibrado celular en volumen: gráfico de dispersión donde se representa la masa de Ru por célula medida por LA-ICP-MS frente al volumen celular ($n=120$; células CT y tras tratamiento con AAPH).

3.2. Determinación de la concentración de la proteína CYP1B1 en células ARPE-19 mediante LA-ICP-MS

Como se indica en la sección experimental, las células ARPE-19 son marcadas con RR para determinar el volumen celular y se someten a un protocolo de ICC con un anticuerpo específico de la proteína CYP1B1 marcado con AuNCs (inmunosonda Anti-CYP1B1:AuNCs). De esta forma, siguiendo en el ICP-MS la señal de Au se puede observar la distribución de la proteína en las células (**Fig**

3B). En el caso de CYP1B1, se trata de una proteína citosólica, de forma que se observa señal de Au en toda la célula.

La masa de Au por célula puede calcularse integrando la señal de Au en toda el área celular con el programa Iolite. Para pasar de imagen cualitativa (en cps) a cuantitativa (ag/pixel) hay que utilizar el calibrado instrumental realizado con los patrones de gelatina. A continuación, la masa de Au por célula se puede convertir en masa de CYP1B1 por célula teniendo en cuenta la amplificación proporcionada por la inmunosonda (i.e., número de átomos de Au por proteína detectada) y la masa molecular de la proteína.

Para obtener, no solo la masa de proteína sino su concentración, ésta se puede determinar dividiendo la masa de proteína entre el volumen de cada una de las células. Tal y como se menciona en la introducción, cuando se estudian los niveles de una proteína diana en células sometidas a un tratamiento es importante considerar también el volumen de cada una de las células, ya que este puede haberse visto afectado por el tratamiento. Para ejemplificar la importancia de tener en cuenta, no solo la masa de proteína, sino también el volumen celular, se construyeron dos histogramas de frecuencia: uno con la masa (**Fig. 5A**) y otro con la concentración (**Fig. 5B**) de CYP1B1 para células CT y tratadas con AAPH. En dichos histogramas se representa el número de células (en porcentaje) de la población celular que tienen una determinada masa o concentración de proteína.

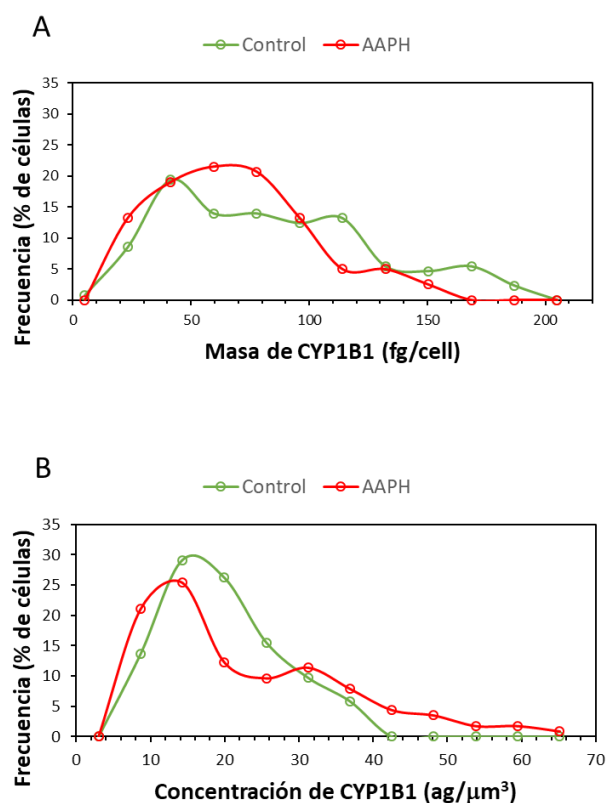


Fig. 5. Histogramas de frecuencia para células ARPE-19 CT (verde) y tratadas con AAPH (rojo). (A) Masa de CYP1B1, y (B) Concentración de CYP1B1.

Respecto a la masa de proteína por célula (**Fig. 5A**), se observó una amplia distribución tanto para las células CT como tratadas con AAPH, donde aparecen varios máximos en la población celular. Sin embargo, la concentración de proteína para las células CT es más estrecha y con una forma de campana de Gauss (**Fig. 5B**). Para las células sometidas al tratamiento de AAPH la distribución de la concentración de proteína es más ancha que para las células CT y se pueden observar claramente dos grupos diferentes de células. Estos dos grupos de células dentro de la población podrían ser células que responden de diferente manera al tratamiento de estrés oxidativo. Por lo tanto, las diferentes tendencias que se observan al estudiar la masa y concentración de proteína por célula remarcan la importancia de monitorizar no solo la masa de proteína, sino también el volumen al estudiar los efectos de un estímulo en los niveles de proteína en una población celular.

4. Conclusiones

La combinación de inmunosondas metálicas (e.g., anticuerpos marcados con NCs metálicos) y el marcaje con un marcador de volumen, como el RR, permite la determinación simultánea de proteínas diana en células individuales y el volumen celular mediante un único análisis por LA-ICP-MS. De este modo es posible obtener imágenes cuantitativas para la distribución de proteínas diana en células individuales, estudiando además el volumen celular (el cual puede verse afectado por diferentes tratamientos de la población).

Los resultados experimentales obtenidos con la metodología propuesta revelan que la proteína CYP1B1 presenta una diferente distribución en células ARPE-19 CT frente a las que han sido expuestas a un tratamiento de estrés oxidativo con AAPH. En este último caso, se observan dos grupos diferentes en la población celular, lo que sugiere que las todas las células no responden de igual manera al tratamiento.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2022-137319OB-C21 concedido por el MCIN/AEI/10.13039/501100011033/. Paula Menero Valdés agradece el contrato FPU con ref. FPU19/00556 (Ministerio de Educación) y L. A. agradece a la fundación Rafael del Pino (<http://www.frdepino.es>) por la "Cátedra Rafael del Pino". Adicionalmente, se agradece el soporte técnico de los Servicios Científico Técnico (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

Referencias

- [1] P. A. Doble, R. Gonzalez de Vega, D. P. Bishop, D. J. Hare, D. Clases, Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging in Biology, *Chem. Rev.*, 121 (2021) 11769-11822. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01219>
- [2] L. Cid-Barrio, F. Calderón-Celis, P. Abásolo-Linares, M. L. Fernández-Sánchez, J. M. Costa-Fernández, J. Ruiz

- Encinar, A. Sanz-Medel, Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS, *Anal. Chem.*, 104 (2018), 148-159. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.024>
- [3] P. Menero-Valdés, A. Lores-Padín, B. Fernández, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Iridium nanoclusters as high sensitivity-tunable elemental labels for immunoassays: determination of IgE and APOE in aqueous humor by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *Talanta*, 44 (2022) 123424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123424>
- [4] A. Rodríguez-Penedo, E. Costa-Rama, B. Fernández, C. García-Cabo, L. Benavente, S. Calleja, M. T. Fernández-Abedul, R. Pereiro. Palladium nanoclusters as a label to determine GFAP in human serum from donors with stroke by bimodal detection: inductively coupled plasma-mass spectrometry and linear sweep voltammetry. *Microchim. Acta*, 190 (2023) 493. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-06059-5>
- [5] H. Pan, L. Feng, Y. Lu, Y. Han, J. Xiong, H. Li, Calibration strategies for laser ablation ICP-MS in biological studies: A review, *T. Anal. Chem.*, 156 (2022) 116710. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116710>
- [6] M. Martinez, M. Baudalet, Calibration strategies for elemental analysis of biological samples by LA-ICPMS and LIBS - A review, *Anal Bioanal Chem.*, 412 (2020) 27-36. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02195-1>
- [7] K. Mervic, M. Sala, S. Theiner, Calibration approaches in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for bioimaging applications, *T. Anal. Chem.* 172 (2024) 117574. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117574>
- [8] N. Grijalba, A. Legran, V. Holler, C. Bouvier-Capely, A novel calibration strategy based on internal standard-spiked gelatine for quantitative bio-imaging by LA-ICP-MS: application to renal localization and quantification of uranium, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3113-3122. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02561-4>
- [9] T. Van Acker, T. Buckle, S.J.M. Van Malderen, D.M. van Willigen, V. van Unen, F.W.B. van Leeuwen, F. Vanhaecke, High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers, *Anal. Chim. Acta* 1074 (2019) 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.04.064>
- [10] K. Löhr, O. Borovinskaya, G. Tourniaire, U. Panne, N. Jakubowski, Arraying of single cells for quantitative high throughput laser ablation ICP-TOF-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019), 18, 11520-11528. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00198>
- [11] K. Löhr, H. Traub, A. J. Wanka, U. Panne, N. Jakubowski, Quantification of metals in single cells by LA-ICPMS: comparison of single spot analysis and imaging, *J. Anal. At. Spectrom.*, 33 (2018) 1579-1587. <https://doi.org/10.1039/C8JA00191J>
- [12] L. Zheng, L. Feng, J. Shi, H. Chen, B. Wang, M. Wang, H. Wang, W. Feng, Single-Cell Isotope Dilution Analysis with LA-ICP-MS: A New Approach for Quantification of Nanoparticles in Single Cells, *Anal. Chem.* 92 (2020) 21, 14339-14345. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01775>
- [13] A. Lores-Padín, B. Fernández, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Real matrix-matched standards for quantitative bioimaging of cytosolic proteins in individual cells using metal nanoclusters as immunoprobes-label: A case study using laser ablation ICP-MS detection, *Anal. Chim. Acta* 1221 (2022) 340128. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340128>
- [14] E. Zatulovskiy, M.C. Lanz, S. Zhang, F. McCarthy, J.E. Elias, J.M. Skotheim, Delineation of proteome changes driven by cell size and growth rate, *Front. Cell Dev. Biol.* 10 (2022) 980721. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.980721>
- [15] S. J.M. Van Malderen, T. Van Acker, B. Laforce, M. De Bruyne, R. De Rycke, T. Asaoka, L. Vincze, F. Vanhaecke, Three-dimensional reconstruction of the distribution of elemental tags in single cells using laser ablation ICP-mass spectrometry via registration approaches, *Anal Bioanal. Chem.* 411 (2019) 4849-4859. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01677-6>
- [16] L. Mueller, A. J. Herrmann, S. Techritz, U. Panne, N. Jakubowski, Quantitative characterization of single cells by use of immunocytochemistry combined with multiplex LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 409 (2017) 3667-3676. <https://doi.org/10.1007/s00216-0170310-1>