MEJORA DE LA DETECTABILIDAD EN sc-ICP-MS: USO DE INTERCALADORES DE ADN Y MARCADORES DE MEMBRANA PARA FACILITAR LA DETECCIÓN DE EVENTOS CELULARES

Paula Menero-Valdés[1], Alicia Villa-Vázquez[1], Lydia Álvarez[2], Héctor González-Iglesias[3], C. Derrick Quarles Jr.[4], Beatriz Fernández[1], Rosario Pereiro[1]

[1]Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, España
[2]Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO), Avda. Dres. Fernández-Vega, 34, 33012 Oviedo, España
[3]Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, España
[4]Elemental Scientific, Inc. – 7277 World Communications Drive, Omaha, NE 68122, USA
paulamenerovaldes@gmail.com, https://e2bna.grupos.uniovi.es/, @e2bnauniovi (Instagram)

Abstract

La técnica *single cell* (sc) ICP-MS permite identificar y cuantificar elementos y biomoléculas en células individuales, facilitando el estudio de la heterogeneidad de las poblaciones celulares. Para detectar los eventos celulares se suelen monitorizar elementos endógenos (p.e., Ca, Fe, P, etc.). Esta estrategia es relativamente sencilla, aunque presenta el problema de que dichos elementos se encuentran generalmente a baja concentración en las células. Una alternativa es utilizar etiquetas externas que se añaden a las células para mejorar la detectabilidad de los eventos celulares. En este trabajo se muestran dos estrategias innovadoras para mejorar la detección de células individuales empleando dos tipos de etiquetas externas: un intercalador del ADN nuclear (Rh-ADN) y un marcador de la membrana celular (rojo de rutenio). Se han estudiado dos modelos celulares *in vitro* de células retinianas (MIO-M1 y ARPE-19) y se han empleado nanoclústeres metálicos para determinar proteínas diana en las poblaciones celulares.

1. Introducción

La gran sensibilidad analítica y robustez ofrecidas por la técnica Plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS) ha conseguido que hoy en día su uso esté muy extendido en diferentes campos, como es el caso de análisis de muestras clínicas, biológicas o de productos farmacéuticos [1]. Sin embargo, el análisis de poblaciones celulares mediante ICP-MS con un sistema de nebulización convencional implica una mineralización previa de las células, destruyendo su estructura individual. En consecuencia, los resultados obtenidos representan un valor promedio del análisis de miles de células, lo que conlleva la pérdida de información acerca de la heterogeneidad que caracteriza a las poblaciones celulares. En este sentido, la técnica de ICP-MS de célula única o "*single cell*" (sc-ICP-MS) se ha convertido en la última década en una alternativa muy atractiva para el análisis cuantitativo de analitos diana en células individuales, lo que permite una mejor comprensión de los procesos biológicos [2-4].

Además de la identificación y cuantificación de elementos endógenos de las células, la técnica sc-ICP-MS permite detectar biomoléculas de interés, como proteínas, si se emplea un protocolo de inmunocitoquímica (ICC) previo a su análisis [4-6]. De esta forma, las proteínas diana son marcadas con inmunosondas metálicas conformadas por: (1) Un anticuerpo (Ab) específico para la proteína que se quiere detectar en las células, y (2) Una marca de un elemento fácilmente detectable por ICP-MS que será unida al Ab.

El empleo de inmunosondas metálicas en sc-ICP-MS ofrece una gran especificidad debido a la reacción antígeno-anticuerpo, una gran capacidad de amplificación (dependiendo del número de átomos metálicos que contenga la marca), y la posibilidad de detectar más de un analito en las células si se emplean varias inmunosondas (i.e., marcar las proteínas con inmunosondas etiquetadas con diferentes metales).

Como marcas metálicas se pueden emplear nanopartículas metálicas, *quantum dots*, quelatos metálicos (p. e., DOTA), o polímeros con varios quelatos metálicos (p. e., MAXPAR®). Entre la gran variedad de etiquetas disponibles para sintetizar las inmunosondas, los nanoclústeres metálicos (NCs), con dimensiones menores a 3 nm, han demostrado ofrecer interesantes ventajas frente a otro tipo de marcas, como un gran poder de amplificación (un único NC puede contener más de 100 átomos de un único metal) y unas dimensiones reducidas que les hacen tener menos restricciones de acceso a las proteínas dentro de la célula [4,5].

A pesar de las interesantes prestaciones que ofrece la técnica sc-ICP-MS para analizar poblaciones de células, todavía suele presentar una limitada eficiencia de transporte de la muestra al ICP-MS. Este hecho afecta directamente a los resultados experimentales obtenidos, ya que puede resultar en una pérdida de información o en un muestreo no representativo de toda la población celular. Tradicionalmente, el cálculo de la eficiencia de transporte se realiza empleando una suspensión de nanopartículas (material de referencia) [1]. Sin embargo, dadas las diferencias en la naturaleza de las nanopartículas

y las células, su valor puede no ser representativo de la eficiencia de transporte de la población celular.

Se ha propuesto también el empleo de suspensiones de células control para calcular la eficiencia de transporte [4]. En este caso, la eficiencia de transporte se determina como la relación entre el número de eventos celulares detectados y el número de células introducidas en el ICP-MS (es necesario contar las células previamente al análisis, por ejemplo, por citometría de flujo o empleando una cámara de Neubauer) durante el periodo de monitorización de la señal [1]. Para determinar la eficiencia de transporte se pueden monitorizar elementos endógenos en las células (p.e., Ca, P, Fe, Zn o Co), pero su baja concentración en cada célula puede resultar en una subestimación del número de eventos detectados [5,7-9]. Como alternativa, se ha planteado también el uso de etiquetas externas como el rojo de rutenio (RR) con el fin de marcar la membrana celular [10] o el empleo de intercaladores de ADN para marcar los núcleos [11]. Estos intercaladores de ADN se utilizan normalmente en citometría de flujo como indicadores de viabilidad celular, permitiendo la discriminación entre células vivas y muertas, especialmente en aplicaciones centradas en la clasificación celular o en la separación de poblaciones celulares específicas [12].

En este contexto, este trabajo se centra en el desarrollo de metodologías analíticas para llevar a cabo la determinación de proteínas diana en células individuales empleando sc-ICP-MS, haciendo hincapié en protocolos que permitan aumentar la sensibilidad para detectar los eventos celulares, así como determinar también el volumen de cada una de las células dentro de la población celular. Para ello, se plantean dos estrategias diferentes: (A) Marcar los núcleos de las células con un intercalador de ADN (Rh-ADN) para mejorar la detección celular, y (B) Marcar la membrana celular con RR a fin de determinar el volumen individual de cada célula. En el primero de los casos (Método A) se empleará un MS tipo cuadrupolo (ICP-QMS), mientras que en el Método B se empleará un MS tipo tiempo de vuelo (ICP-ToFMS), permitiendo la detección simultánea de todos los isótopos de interés. Como prueba de concepto se ha llevado a cabo la determinación de proteínas diana en cultivos celulares *in vitro* MIO-M1 y ARPE-19 (en condiciones control y sometidas a tratamientos de hipoxia y de estrés oxidativo, respectivamente) empleando inmunosondas metálicas con NCs (Ab:NCs).

2. <u>MÉTODO A</u>. Uso de marcadores del núcleo celular para incrementar la detección de eventos celulares empleando sc-ICP-QMS

La evaluación del uso de un marcador del núcleo celular para detectar los eventos celulares se ha llevado a cabo usando como modelo celular la línea inmortalizada MIO-M1 de células gliales de Müller de la retina. Concretamente, se ha seleccionado como marcador el intercalador Cell-ID™ Intercalator-103Rh (Rh-ADN), el cual se une al ADN de doble cadena del núcleo celular mediante fuerzas electrostáticas. De este modo, monitorizando el Rh mediante sc-ICP-MS es posible detectar los eventos celulares. Esta metodología de marcaje nuclear se aplicó posteriormente junto con un marcaje con AuNCs e IrNCs para la determinación de dos proteínas relacionadas con hipoxia (1-2% O_2), HIF-1α y VEGF, tras someter a las células a dicho tratamiento. Hay que destacar que al tratarse de un ICP-MS de tipo cuadrupolo, cada uno de los isótopos se mide de manera secuencial en la suspensión de células ($^{103}Rh^+$, $^{193}Ir^+$ y $^{197}Au^+$). En la Figura 1 se muestra un esquema de la metodología propuesta.

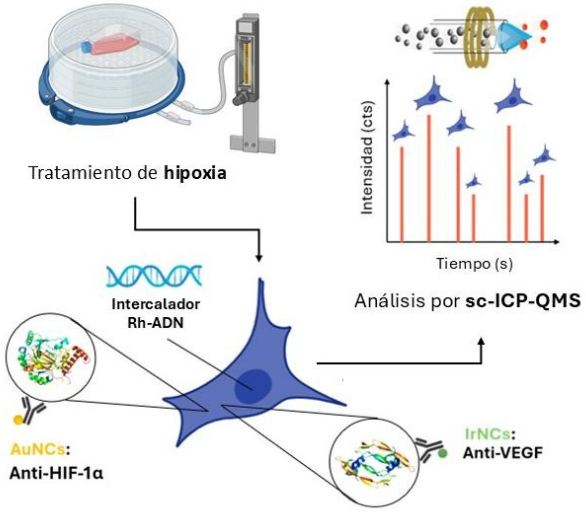

Fig. 1. Esquema general del MÉTODO A. Se ha desarrollado una metodología con doble marcaje (Rh-ADN e inmunosondas metálicas con NCs) para determinar secuencialmente la masa de proteínas diana en células MIO-M1 en condiciones de normoxia e hipoxia empleando sc-ICP-QMS.

En primer lugar, se evaluó si el marcaje externo de las células con el intercalador Rh-ADN permitía una mejor detección de estas, en comparación con la medida de elementos endógenos de las células MIO-M1. Para ello, se evaluaron Mn, Co, Zn, Fe y Cu como posibles elementos endógenos y se monitorizó su señal en una muestra de células MIO-M1. Los resultados experimentales mostraron que el número promedio de eventos celulares detectados es diferente dependiendo del elemento endógeno monitorizado: para 3 réplicas el número de eventos variaba entre 25 ± 2 siguiendo la señal de $^{59}Co^+$ hasta 361 ± 42 para el $^{56}Fe^+$. Si bien el número de eventos detectados monitorizando $^{55}Mn^+$, $^{63}Cu^+$ y $^{56}Fe^+$ eran comparables, se encontraron diferencias significativas en la relación señal/ruido (S/R): 5,5 ± 0,8, 14 ± 4, y 184 ± 7, respectivamente, seleccionándose el Fe como elemento endógeno para las medidas de las células MIO-M1 empleando sc-ICP-QMS.

A continuación, se evaluó si el marcaje externo de las células con el intercalador Rh-ADN permite una mejor detección de estas frente al empleo de Fe como elemento endógeno en una muestra de células MIO-M1 control. Para ello, se estudiaron tres concentraciones del intercalador Rh-ADN (1, 1,5 y 2 µM), observándose que la concentración de 1 µM permite marcar todas las células sin tener un exceso del intercalador que aumente el ruido de fondo. Además, los resultados experimentales mostraron una relación S/R para el $^{103}Rh^{+}$ significativamente superior a la observada si se monitoriza el Fe (809 ± 40 *versus* 184 ± 7 eventos, respectivamente). El empleo del intercalador Rh-ADN mejora la detectabilidad de eventos celulares de los cultivos MIO-M1 y de este modo es posible obtener valores de eficiencias de transporte del 88 ± 7 %, frente al 70 ± 7 % siguiendo la señal del Fe endógeno.

Esta metodología de marcaje nuclear se aplicó posteriormente a la determinación de las proteínas HIF-1α y VEGF en células MIO-M1. Para ello, se optimizó el inmunoensayo en suspensión en términos de concentración de los anticuerpos Anti-HIF-1α (0,9 µg mL^{-1}) y Anti-VEGF (10,5 µg mL^{-1}) en las inmunosondas (AuNCs:Anti-HIF-1α e IrNCs:Anti-VEGF). Tras ello, se añadió el intercalador Rh-ADN (1 µM) a las mismas suspensiones celulares y mediante sc-ICP-QMS, se detectaron secuencialmente las señales de $^{103}Rh^{+}$, $^{197}Au^{+}$ y $^{193}Ir^{+}$ en las células. De esta manera, es posible confirmar el número de eventos celulares detectados siguiendo el $^{197}Au^{+}$ e $^{193}Ir^{+}$ de las inmunosondas junto con la señal de $^{103}Rh^{+}$. Además, las señales de $^{197}Au^{+}$ e $^{193}Ir^{+}$ hacen posible cuantificar HIF-1α y VEGF en una población celular.

3. <u>MÉTODO B.</u> Uso de marcadores celulares de membrana para conocer el volumen celular empleando sc-ICP-ToFMS

En una segunda etapa, y teniendo en cuenta que los analizadores de masas tipo ToF permiten la detección simultánea de múltiples analitos en cada una de las células de una población [13,14], se propuso el empleo de un marcador externo de las células y el empleo de inmunosondas marcadas con NCs a fin de determinar la concentración relativa de tres proteínas diana en células ARPE-19 sometidas a estrés oxidativo mediante análisis por sc-ICP-ToFMS. Por un lado, se seleccionó el RR, una sal que se une a los polisacáridos de la membrana celular [11], para determinar el volumen celular. Por otro lado, se seleccionaron tres inmunosondas marcadas con IrNCs, PtNCs y AuNCs para la determinación de tres proteínas en las células ARPE-19: hepcidina (HP), metalotioneína-2 (MT2), y ferroportina (FPN). En la Figura 2 se muestra un esquema de la metodología analítica propuesta.

Al igual que se propone en el Método A, en primer lugar se estudió la posibilidad de detectar elementos endógenos de las células ARPE-19, junto con los elementos de las tres inmunosondas (Anti-h-HP:IrNCs, Anti-h-MT2:PtNCs, o Anti-h-FPN:AuNCs).

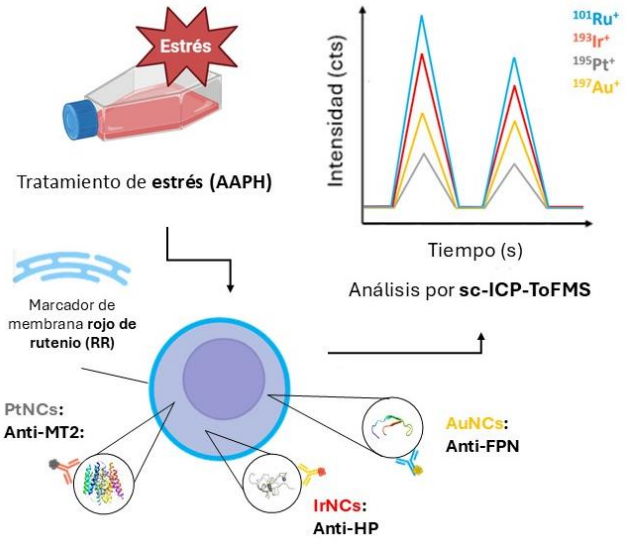

Fig. 2. Esquema general del MÉTODO B. Se ha desarrollado una metodología con doble marcaje (RR e inmunosondas metálicas con NCs) para determinar simultáneamente la concentración relativa de proteínas diana en células ARPE-19 en condiciones control y sometidas a estrés empleando sc-ICP-ToFMS.

Sin embargo, los elementos endógenos más comunes tienen una relación masa/carga (m/z) baja, al contrario que los metales que típicamente se usan como etiquetas en las células (p.e., Ir, Pt o Au, en el caso de NCs). Esta diferencia en la relación m/z compromete seriamente la sensibilidad de la detección simultánea de ambos grupos de elementos por sc-ICP-ToFMS. En base a ello, se consideró que el empleo de un marcador externo, como el RR (rango de m/z similar a los NCs de las inmunosondas), ofrecería mejor sensibilidad instrumental.

Tras analizar las células ARPE-19 doblemente marcadas (RR e inmunosondas con NCs) por sc-ICP-ToFMS, se detectaron dos tipos de eventos en la suspensión celular: (1) Eventos en los que se detectan Ru, Ir, Pt o Au individualmente; y (2) Eventos en los que se detecta simultáneamente Ru con uno, dos o tres de los elementos de las inmunosondas metálicas. En este trabajo, para distinguir los eventos celulares de los posibles artefactos (p.e., fragmentos de membrana, o agregados de las inmunosondas), sólo se consideraron como células los eventos en los que se detectó Ru simultáneamente con al menos una de las etiquetas metálicas de las inmunosondas.

Adicionalmente, el RR también se empleó para medir el volumen relativo de las células. Se propuso una estrategia utilizando la señal de intensidad de Ru para obtener concentraciones relativas de las proteínas diana dentro de cada célula. Las células ARPE-19 son esféricas en suspensión y el RR se une a la superficie de las células, por lo que las intensidades de Ru proporcionan información acerca del área de la superficie de las células. Como las fórmulas para el área de la superficie y el volumen de una

esfera son conocidas matemáticamente, la señal de Ru puede relacionarse con el volumen celular: el volumen de cada célula sería proporcional a la intensidad de Ru (volumen celular ∝ (intensidad de Ru) $^{3/2}$). Esta consideración permite no solo estimar la masa de proteína por célula, sino también su concentración relativa.

4. APLICACIONES. Determinación de proteínas diana en células MIO-M1 y ARPE-19.

Tras optimizar la estrategia de marcaje con el intercalador Rh-ADN (Método A), se aplicó para la determinación de las proteínas HIF-1α y VEGF en células MIO-M1 en condiciones de normoxia e hipoxia. Se analizaron 4 réplicas biológicas independientes de células mantenidas en condiciones control (normoxia) y 4 réplicas sometidas a hipoxia, y se midieron 5 réplicas instrumentales por sc-ICP-QMS. Las inmunosondas Anti-HIF-1α:AuNCs y Anti-VEGF:IrNCs se añadieron a la misma muestra de células, permitiendo la determinación de HIF-1α y VEGF en una misma población de forma secuencial. Para determinar la masa de cada una de las proteínas, se realizó un calibrado externo con patrones en disolución de Au e Ir, permitiendo así transformar la señal de $^{197}Au^+$ e $^{193}Ir^+$ (expresada en cuentas) en masa de proteína HIF-1α o VEGF (considerando además la masa atómica de los elementos, el factor de amplificación de las inmunosondas, y la masa molecular de las proteínas). De esta manera, es posible obtener valores de masa de proteína por célula o evento detectado y, por tanto, se puede evaluar la distribución de dichas proteínas en la población celular.

La Figura 3 compara la distribución de la masa de HIF-1α Figura 3A) y VEGF (Figura 3B) por célula en cultivos MIO-M1 en condiciones de normoxia e hipoxia, considerando todas las réplicas biológicas. Se observó que la masa de HIF-1α y VEGF por célula en las poblaciones celulares era estadísticamente diferente entre los dos grupos según la prueba de Mann-Whitney al 95% de confianza ($p < 0{,}0001$) [15]. En el caso de HIF-1α, se observó una mayor masa de proteína en condiciones de hipoxia, y tanto el valor medio (símbolo x en los gráficos) como la mediana (línea horizontal recta) fueron significativamente mayores. Además, la masa de proteína por célula bajo condiciones de hipoxia mostró una distribución más dispersa. En el caso de VEGF, la mediana fue ligeramente superior en hipoxia (0,027 frente a 0,014 ag/célula), mientras que en normoxia se observó una mayor variabilidad en la masa de la proteína dentro de la población celular.

Además, para visualizar mejor las diferentes células de cada población, la Figura 4 muestra los histogramas de frecuencia en masa para HIF-1α y VEGF (considerando todas las réplicas de los cultivos celulares), representando el porcentaje de células que contienen una cierta cantidad de proteína.

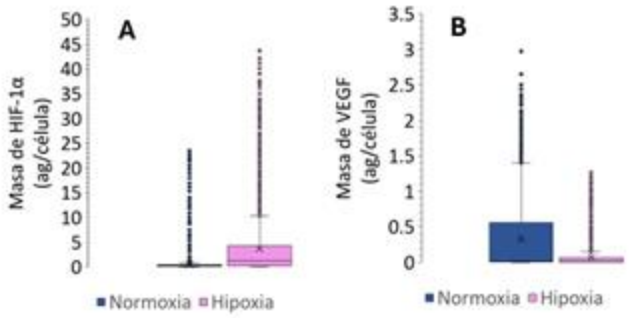

Fig. 3. Diagramas de caja donde se representa la masa de las proteínas diana por célula en condiciones de normoxia (azul) e hipoxia (rosa) para las 4 réplicas biológicas de las suspensiones de células MIO-M1 marcadas con Rh-ADN y las inmunosondas de NCs. A) HIF-1α, y B) VEGF.

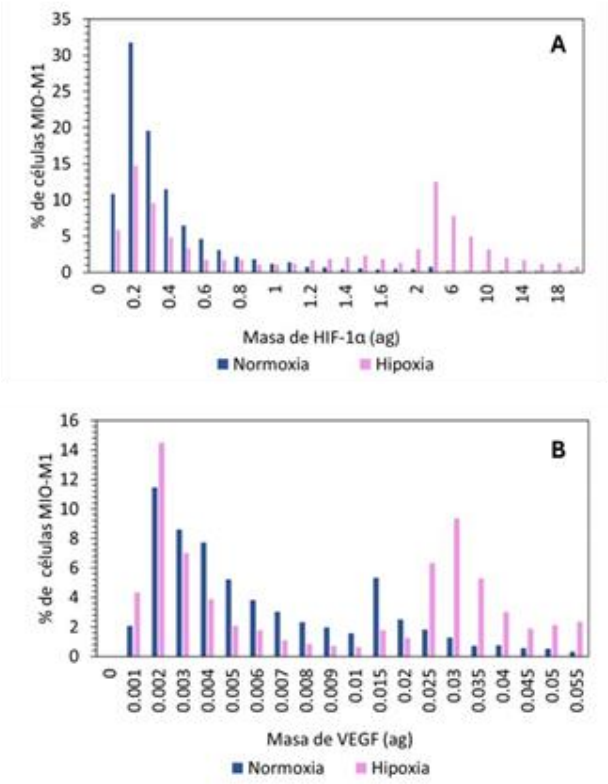

Fig. 4. Histogramas de frecuencia donde se muestra el porcentaje de células MIO-M1 que contienen una masa determinada de las proteínas diana por célula en condiciones de normoxia (azul) e hipoxia (rosa) para 4 réplicas biológicas. A) HIF-1α, y B) VEGF.

En condiciones de normoxia, el 84,7% de las células MIO-M1 presentaron masas bajas (0–0,6 ag/célula) de HIF-1α (Figura 4A), mientras que bajo hipoxia este porcentaje se redujo al 40%. El 60% restante en hipoxia mostró masas de proteínas más altas, distribuidas entre 0,6–3 ag/célula (28%), y 3–40 ag/célula (32%), reflejando una respuesta celular heterogénea al tratamiento. En el caso de VEGF (Figura 4B) también se identificaron varias subpoblaciones celulares bajo hipoxia: el 38% de las células presentó masas bajas de proteína (0–0.01

ag/célula), el 3% entre 0,01–0,02, y el 29% de las células en el rango de 0,02–0,05 ag/célula.

En cuanto a la estrategia de marcaje con RR (Método B), la metodología propuesta fue aplicada para estudiar la expresión de las proteínas HP, MT2 y FPN en cultivos celulares de ARPE-19 expuestos a condiciones de estrés. Las condiciones de estrés oxidativo se indujeron añadiendo dihidrocloruro de 2,2′-azobis(2-metilpropionamidina) (AAPH) 5 mM al medio celular, y se trataron durante 1 h [16]. Los análisis empleando sc-ICP-ToFMS permitieron la detección simultánea de HP, MT2 y FPN, así como de RR, en cada una de las células, siguiendo las señales de las marcas metálicas de las inmunosondas y del marcador externo de la membrana. Al igual que en el Método A, se realizaron calibrados instrumentales con patrones de referencia para transformar la señal de las inmunosondas ($^{193}Ir^+$, $^{195}Pt^+$, y $^{197}Au^+$) en masa. Además, empleando los valores medidos para la intensidad de $^{101}Ru^+$ por célula, fue posible obtener no solo la masa, sino también la concentración relativa de cada proteína.

A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestran los resultados experimentales obtenidos para células ARPE-19 control y sometidas al tratamiento con AAPH, expresados como histogramas de frecuencia que recogen el porcentaje de células que contienen una determinada cantidad de proteína. En las Figuras 5A, 5C y 5E se muestra la masa de proteína por célula, y en las Figuras 5B, 5D y 5F la concentración relativa de proteína (i.e., se ha tenido en cuenta el volumen de cada una de las células teniendo en cuenta la señal de $^{101}Ru^+$). Al representar los valores de masa de proteína obtenidos (en ag o fg) en forma de histograma de frecuencias (Figuras 5A, 5C y 5E), se obtuvo una única población celular para las tres proteínas (HP, MT2, y FPN), tanto en el grupo control como en el grupo que fue sometido al tratamiento con AAPH. Por el contrario, al considerar el volumen celular (Figuras 5B, 5D y5F), se identificaron diferentes poblaciones celulares de varios tamaños. Además, se observan diferencias significativas entre las células en condiciones de normoxia o hipoxia. Por ejemplo, en el caso de la MT2, se identificó un mayor porcentaje de células con concentraciones bajas de proteína en el grupo tratado con AAPH [16].

Por otro lado, se evaluó si el tratamiento con AAPH afecta al volumen de las células. Los resultados experimentales revelaron que había un mayor porcentaje de células con señales de Ru altas en el grupo tratado con AAPH, lo que a su vez indicaría un mayor volumen celular. Este hecho demuestra la importancia de estudiar los volúmenes celulares, puesto que pone de manifiesto que un aumento en masa de una determinada proteína puede estar relacionado con un aumento del volumen de la célula y no únicamente con la concentración de la proteína en su interior.

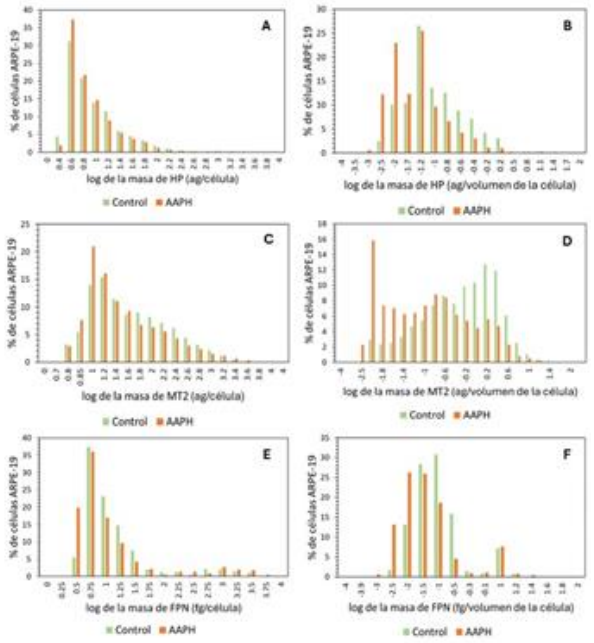

Fig. 5. Histogramas de frecuencia que muestran el porcentaje de células ARPE-19 que contienen una determinada cantidad de proteína (Hepcidina – HP, Metalotioneina 2 – MT2, y Ferroportina – FPN) por célula en condiciones control (verde) y sometidas a un tratamiento con AAPH (naranja) mediante medidas por sc-ICP-ToFMS (4 réplicas biológicas por condición). Los paneles A, C y E representan la masa de proteína por célula (en escala logarítmica), y los paneles B, D y F la concentración relativa de proteína (i.e., teniendo en cuenta el volumen celular). A, B) Hepcidina, C, D) Metalotioneína 2, y E, F) Ferroportina.

5. Conclusiones

El uso del intercalador Rh-ADN mejoró la detectabilidad de eventos celulares mediante sc-ICP-QMS en comparación con la medida de elementos endógenos. Además, el empleo de inmunosondas marcadas con NCs permitió cuantificar las proteínas diana a niveles de concentración muy bajos (ag/célula). La estrategia se aplicó a la comparación de poblaciones celulares mantenidas bajo condiciones de normoxia e hipoxia, destacando su potencial para caracterizar células expuestas a distintos tratamientos. De este modo, se observó una respuesta diferencial a las condiciones específicas de hipoxia empleadas en las células comparadas con la población mantenida en condiciones de normoxia.

Por otro lado, la metodología propuesta empleando sc-ICP-ToFMS, NCs y RR como marcador para detectar eventos celulares permite no solo la determinación de la masa de proteína individual en cada célula, sino también el volumen relativo de cada célula y, por ende, la concentración relativa de cada proteína. Por tanto, esta estrategia ofrece una mayor información dirigida hacia una mejor comprensión de los efectos de un tratamiento como son las condiciones de estrés propuestas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID2022-137319OB-C21 concedido por el MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033/. P. Menero-Valdés agradece la beca FPU (Ref. FPU19/00556 – Ministerio de Educación, España) y A. Villa-Vázquez agradece la Ayuda Predoctoral Severo Ochoa (Ref. BP22-187 – Consejería de Ciencia, Educación y Universidad, Principado de Asturias). Adicionalmente, se agradece el soporte técnico de los Servicios Científico Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo. L. Álvarez agradece además a la Fundación Rafael del Pino (http://www.frdelpino.es), a través de la «Cátedra Rafael del Pino».

Referencias

[1] Y. Tanaka, R. Iida, S. Takada, T. Kubota, M. Yamanaka, N. Sugiyama, Y. Abdelnour, Y. Ogra, Quantitative elemental analysis of a single cell by using inductively coupled plasma-mass spectrometry in fast time-resolved analysis mode, ChemBioChem. 21 (2020) 3266–3272, https://doi.org/10.1002/cbic.202000358

[2] E. Shapiro, T. Biezuner, S. Linnarsson, Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science, Nat. Rev. Genet. 14 (2013) 618–630, https://doi.org/10.1038/nrg3542

[3] A.M. Mistry, A.R. Greenplate, R.A. Ihrie, J.M. Irish, Beyond the message: advantages of snapshot proteomics with single-cell mass cytometry in solid tumors, FEBS J. 286 (2019) 1523–1539, https://doi.org/10.1111/febs.14730

[4] P. Menero-Valdés, A. Lores-Padín, B. Fernández, C.D. Quarles, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, Determination and localization of specific proteins in individual ARPE-19 cells by single cell and laser ablation ICP-MS using iridium nanoclusters as label, Talanta. 253 (2023) 123974, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123974

[5] A. Lores-Padín, E. Mavrakis, B. Fernández, M. García, H. González-Iglesias, R. Pereiro, S.A. Pergantis, Gold nanoclusters as elemental label for the sequential quantification of apolipoprotein E and metallothionein 2A in individual human cells of the retinal pigment epithelium using single cell-ICP-MS, Anal. Chim. Acta. 1203 (2022) 339701, https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339701

[6] D. Clases, R. González de Vega, Facets of ICP-MS and their potential in the medical sciences-Part 2: nanomedicine, immunochemistry, mass cytometry, and bioassays, Anal. Bioanal. Chem. 414 (2022) 7363–7386, https://doi.org/10.1007/s00216- 022-04260-8

[7] S. Meyer, A. López-Serrano, H. Mitze, N. Jakubowski, T. Schwerdtle, Single-cell analysis by ICP-MS/MS as a fast tool for cellular bioavailability studies of arsenite, Metallomics. 10 (2018) 73–76, https://doi.org/10.1039/C7MT00285H

[8] S. Miyashita, A.S. Groombridge, S. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba, K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 29 (2014) 1598–1606, https://doi.org/10.1039/C4JA00040D

[9] X. Shen, H. Zhang, X. He, H. Shi, C. Stephan, H. Jiang, C. Wan, T. Eichholz, Evaluating the treatment effectiveness of copper-based algaecides on toxic algae Microcystis aeruginosa using single cell-inductively coupled plasma-mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 411 (2019) 5531–5543, https://doi.org/10.1007/s00216-019-01933-9

[10] W. Qin, H.J. Stärk, T. Reemtsma, Ruthenium red: a highly efficient and versatile cell staining agent for single-cell analysis using inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, Analyst. 146 (2021) 6753–6759, https://doi.org/10.1039/d1an01143j

[11] O.I. Ornatsky, X. Lou, M. Nitz, S. Schäffer, W.S. Sheldrick, V.I. Baranov, D. R. Bandura, S.D. Tanner, Study of cell antigens and intracellular DNA by identification of element-containing labels and metallointercalators using inductively coupled plasma mass spectrometry, Anal. Chem. 80 (2008) 2539–2547, https://doi.org/10.1021/ac702128m

[12] A. Delgado-González, R.M. Sánchez-Martín, Mass cytometry tags: where chemistry meets single-cell analysis, Anal. Chem. 93 (2021) 657–664. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03560

[13] T. Vonderach, D. Günther, Fundamental studies on droplet throughput and the analysis of single cells using a downward-pointing ICP-time-of-flight mass spectrometer, J. Anal. At. Spectrom. 36 (2021) 2617–2630. https://doi.org/10.1039/D1JA00243K

[14] S. Harycki, A. Gundlach-Graham, Characterization of a high-sensitivity ICP-TOFMS instrument for microdroplet, nanoparticle, and microplastic analyses, J. Anal. At. Spectrom. 38 (2023) 111–120. https://doi.org/10.1039/D2JA00295G

[15] A. Villa-Vázquez, P. Menero-Valdés, L. Álvarez, H. González-Iglesias, B. Fernández R. Pereiro, Determination of proteins in hypoxic Müller glia cells by single-cell ICP-MS: The use of a Rh-DNA intercalator for enhanced cell detection, Microchem. J. 207 (2024) 111745. https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111745

[16] P. Menero-Valdés, M. I. Chronakis, B. Fernández, C.D. Quarles Jr., H. González-Iglesias, B. Meermann, R. Pereiro, Single cell–ICP–ToF-MS for the multiplexed determination of proteins: Evaluation of the cellular stress response, Anal. Chem. 95 (2023), 13322–13329. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02558