

CARACTERIZACIÓN DE FERRITINA EN SUERO SANGUÍNEO: ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO

Juan Manuel Ruvalcaba López (1), Rafael Guzmán Cabrera (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico:
[ruvalcabalj2011@licifug.ugto.mx]

2 [Departamento Ingeniería Eléctrica, División de Ingenierías, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [guzmanc@ugto.mx]

Resumen

La ferritina es una proteína de almacenamiento de hierro, presenta una forma movilizable como ferritina y hemosiderina como una fracción insoluble, importante para diferentes procesos bioquímicos en el cuerpo humano. Este trabajo se centra en la identificación y caracterización de esta biomolécula por medio de espectroscopia Raman en suero sanguíneo. Se extrajo sangre de pacientes sanos y se centrifugó para generar el suero sanguíneo, posteriormente se realizó el análisis por espectroscopia Raman. Los resultados obtenidos mediante microscopia se adquirieron explorando 9 espectros de una sección de la muestra realizando un mapeo, primero encontrando el espectro del suero sanguíneo para después buscar la presencia de ferritina localizando las bandas características situados en el rango de 200-1000 cm^{-1} . Así, existiendo una estrecha relación entre el tamaño de los depósitos de hierro en el cuerpo y la concentración de ferritina en el plasma, se puede relacionar los niveles de ferritina con diferentes padecimientos hematológicos.

Abstract

Ferritin is an iron storage protein, presents a mobilizable way as ferritin and an insoluble fraction as hemosiderin, important for different biochemical processes in the human body. This work focuses on the identification and characterization by Raman spectroscopy of this biomolecule present in blood serum. Blood from healthy subjects was extracted and centrifuged to generate the serum, then analysis by Raman spectroscopy was performed. The results were acquired using microscopy, scanning a section of 9 points of the sample by mapping, first finding the spectrum of blood serum and then look for the presence of ferritin locating the characteristic bands located in the range of 200-1000 cm^{-1} . Thus, there is a close relationship between the size of iron stores in the body and ferritin concentration in plasma can be related ferritin levels with different hematological diseases.

Palabras Clave

Espectroscopia Raman; Análisis de suero sanguíneo; Análisis bandas espectrales; Detección patologías

INTRODUCCIÓN

La espectroscopia Raman se ha convertido en una herramienta muy socorrida para el análisis cuantitativo de muestras biológicas, específicamente teniendo un gran potencial en el diagnóstico clínico cuantificando biomoléculas o diversos medicamentos para identificar su composición química [1].

Espectroscopia Raman

A esta técnica se le conoce también como dispersión Raman por la dispersión inelástica de los fotones que contienen una energía vibracional característica dependiendo el enlace químico de la molécula irradiada. Utilizando comúnmente una fuente monocromática de luz (laser) se irradia la muestra y una pequeña cantidad de fotones (~ 1 en 10^8) interactúa provocando así un desplazamiento en el estado energético del fotón, pudiendo absorber energía (dispersión anti-Stokes) o proporcionando energía (dispersión Stokes). Estos cambios de energía son característicos para cada enlace molecular ofreciéndonos información de identidad, estructura, conformación y composición de nuestra muestra analizada [2-3].

Los beneficios que tiene esta técnica contra otras es su alta sensibilidad a pequeños cambios bioquímicos, análisis no invasivo, poca preparación de la muestra, señal débil proveniente del agua y la alta resolución de los espectros [4].

Hierro y ferritina

El hierro es importante para la formación no sólo de la hemoglobina sino también de otros elementos esenciales del organismo (por ej., mioglobina, citocromos, peroxidasa, catalasa), micronutriente esencial para las células, producción de energía y síntesis de ADN, por esto es importante conocer los medios en los cuales el organismo utiliza el hierro [5]. Según Guyton & Hall [6], la cantidad total de hierro en el organismo es de una media de 4-5 g, y el 65% está en forma de hemoglobina. Alrededor del 4% está en forma de mioglobina, el 1% de diversos compuestos del hemo que favorecen la oxidación intracelular, el 0.1% combinado con la proteína transferrina en el plasma sanguíneo y el 15-30% se almacena para su uso posterior, mayormente en el sistema

reticuloendotelial y en las células del parénquima hepático, sobre todo en forma de ferritina.

La ferritina tiene un peso de 450 kDa (diámetro exterior 12 a 13 nm; diámetro de 8 nm) capaz de incorporar hasta 4.500 átomos de hierro en el interior en una forma no tóxica pero biodisponible. Cada complejo de ferritina se compone de 24 subunidades que forman una esférica simétrica cubierta. Cada subunidad de ferritina se pliega en 4-hélices con un quinto corto de hélice en estrecha proximidad a la C-terminal. En su forma ensamblada, el complejo de ferritina tiene ocho canales hidrofílicos que se han propuesto para servir como puertos de entrada para el hierro ferroso [5-9].

La cuantificación de la ferritina ocurrió en 1972, utilizando un ensayo inmunoradiométrico, demostrando que la ferritina podía medirse directamente en suero sanguíneo humano. La relación entre el nivel de ferritina sérica y el nivel total de hierro almacenado, se midió ferritina en un grupo control, en pacientes con deficiencia de hierro y en pacientes con sobrecarga de este. Se demostró que la ferritina era elevada en pacientes con sobrecarga de hierro y era disminuida en pacientes con enfermedades de deficiencia de hierro [7].

La ferritina además de ser un indicador directo de la cantidad de hierro almacenado tiene otras funciones interesantes, tales como molécula de distribución de hierro, factor de señalización, función de inmunosupresión, angiogénesis y un aparente cambio de concentraciones en diversos tipos de cáncer. Por lo que esta proteína puede ser utilizada como una herramienta clínica en la detección de diferentes estados patológicos asociados a las funciones anteriormente mencionadas, por ejemplo anemia por deficiencia de hierro, hemocromatosis hereditaria, condiciones inflamatorias y trauma, enfermedad crónica de riñón entre otras [7-9]. El análisis de ferritina en suero sanguíneo es el ensayo usado comúnmente para la cuantificación y paso seguido la correlación con estas enfermedades como estudio alternativo por lo que se utiliza el suero sanguíneo en este estudio [7].

En este trabajo se presenta el análisis de los componentes del suero sanguíneo y en específico de la ferritina presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suero sanguíneo se generó a partir de sangre donada por los autores para poder generar una metodología de tratamiento y análisis por medio de la espectroscopia Raman. Las condiciones de extracción fueron en ayunas por la mañana, la extracción de sangre se hizo en la enfermería de la División de Ciencias e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato, extrayendo 5ml de sangre y dejándola coagular para evitar la presencia de fibrina en el suero sanguíneo [10]. Posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 15 minutos para la separación de fases, tomando el sobrenadante con pipeta [11]. Inmediatamente después de la extracción se puso en refrigeración para su almacenamiento. Realizando esto en tres diferentes sujetos.

Adquisición de espectros

El microscopio DXR Raman Thermo Scientific fue usado para la obtener los espectros con un láser de 780 nm de longitud de onda, según las recomendaciones de estos rangos en la experimentación con material biológico [12], con una resolución espectral de aprox. 3cm⁻¹ (rejilla de alta resolución con 830 líneas/mm) y usando un objetivo de 50 X. Los parámetros utilizados se presentan en la tabla 1. El recipiente usado fue una caja de Petri con fondo de cristal para reducir la señal de fondo, colocando 20 µL de suero sanguíneo dejándolo secar para proceder a la toma de espectros primero los de suero sanguíneo y después enfocando en la región de la ferritina.

Tabla 1. Parámetros usados en la adquisición de los espectros de suero sanguíneo

Parámetros espectroscópicos	Valor
Potencia	24 mW
Apertura	50 µm slit
Tiempo de exposición	10 s
Muestras	9
Fondo	9
Foto-blanqueo	30 s

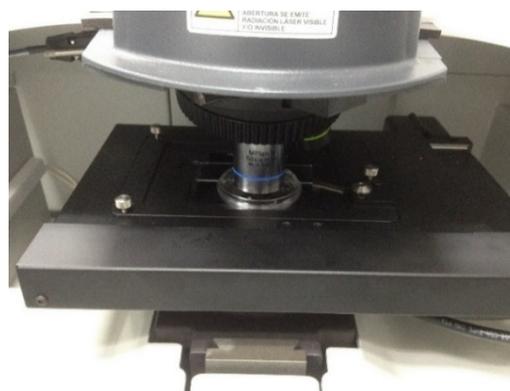


IMAGEN 1: Caja de Petri de fondo de cristal usada en el equipo DXR Raman.

Según Juqiang L. et al. [13], la región característica del suero sanguíneo es de 400-1800 cm⁻¹. Szybowicz M, Koralewski M, Karon J, Melnikova L. [14] mencionan que la región del espectro para la ferritina es de 200-1000 cm⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un mapeo de nueve puntos (Imagen 3), de la región 200-1800cm⁻¹ para el suero sanguíneo (imagen 2) y después para la región de la ferritina (imagen 4).

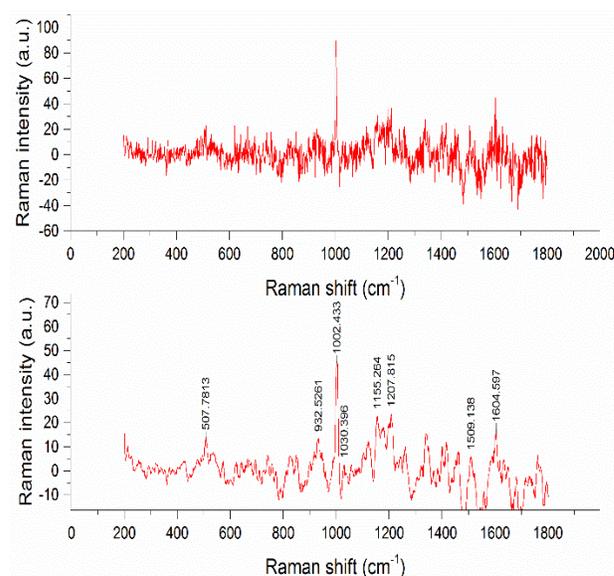


IMAGEN 2: Espectro de suero sanguíneo sin suavizar (arriba), y suavizado (abajo)

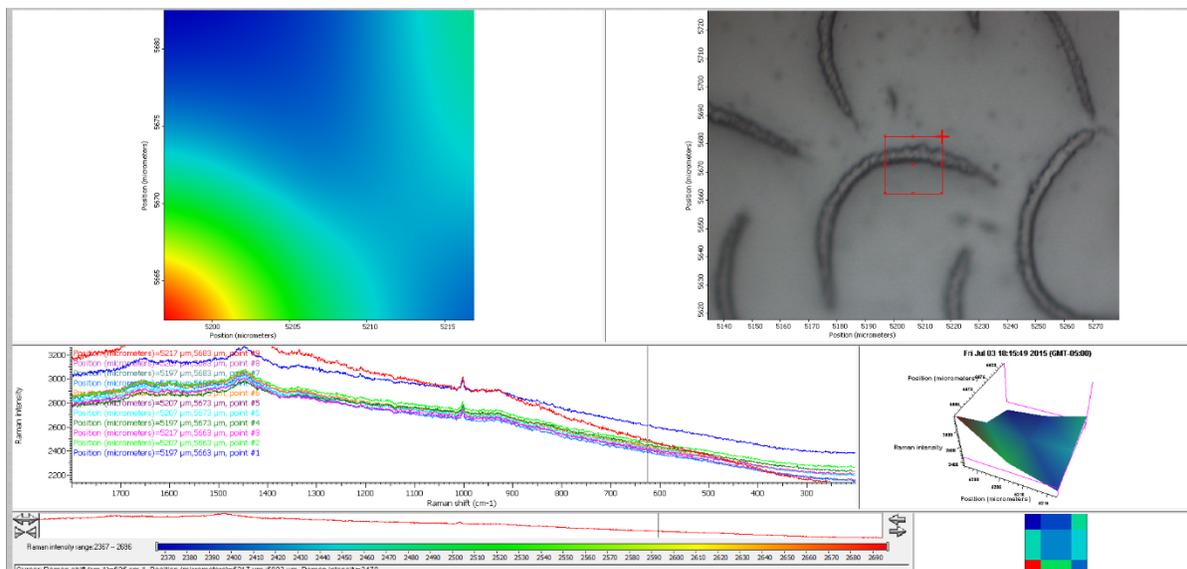


IMAGEN 3: Mapeo de nueve puntos del suero sanguíneo

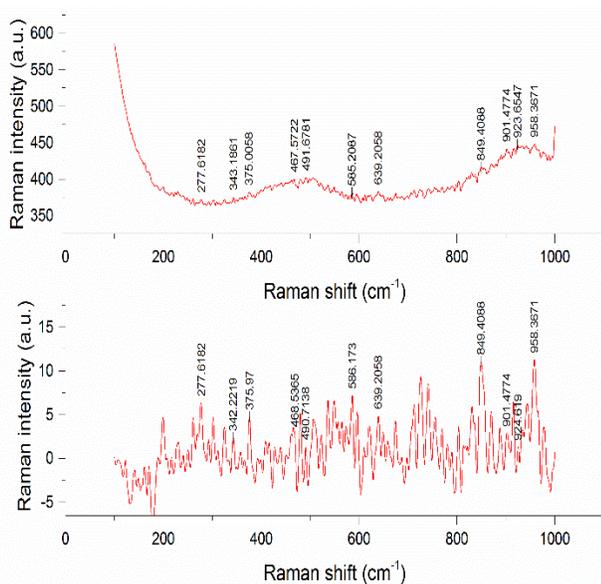


IMAGEN 4: Espectro Raman del suero sanguíneo comprendiendo la región de la ferritina, señal sin procesamiento (superior), señal ajustada y suavizada (inferior).

Las señales fueron procesadas con el software Origin® para realizarles ajuste de línea base mediante interpolación de puntos, también fueron suavizadas con el método Savitzky-Golay usando un polinomio de 3er orden para reducción de ruido.

En ambos casos se hace un análisis de bandas espectrales para encontrar componentes característicos y caracterizar la ferritina [14].

Los picos encontrados y marcados tanto para el rango completo del suero sanguíneo como para la caracterización de la ferritina se correlacionaron mediante la Tabla 2 [12,14-17].

Es posible identificar la presencia de alguna biomolécula utilizando espectroscopia Raman pero a futuro se piensa poder cuantificar los niveles de ferritina para diferentes estados de concentración de hierro por ejemplo anemias o sobrecarga de hierro en sangre, también el uso del SERS (espectroscopia Raman de superficie aumentada) para amplificar la señal de la ferritina y poder hacer una cuantificación se la concentración y poder correlacionarla con pruebas estándar.

CONCLUSIONES

La presencia de ferritina en el suero sanguíneo se da a muy bajas concentraciones pero es factible identificar la presencia de esta proteína en suero sanguíneo, de la misma forma poder proporcionar información estructural y presencia de diversas biomoléculas en el suero sanguíneo para una posible cuantificación.

Tabla 2: Frecuencias Raman y sus asignaciones

Frecuencia Raman en número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
511	L-triptófano
930	L-prolina
1004	L-fenilalanina, (C-C)
1030	Fenilalanina
1158	Guanina, (C-C), (C-N)
1207	Fenilalanina, tirosina
1508	L-valina
1605	L-glutamato, L-prolina
269	Bandas características de la Ferritina
332	
389	
455	
550	
761	
853	
950	

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los Veranos de Investigación Científica, a la Universidad de Guanajuato por el apoyo y los recursos utilizados en este proyecto y al Dr. Rafael Guzmán por la dirección y confianza.

REFERENCIAS

- [1] Jianan Y., Brian C., David Suria. (1999). Concentration measurements of multiple analytes in human sera by near-infrared laser Raman spectroscopy. *Optical Society of America*, 38(25).
- [2] Sebastian Wachsmann-Hogiu, Tyler Weeks, Thomas Huser. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy—from single cells to humans. *Biotechnology*. 2009. 20:63-73.
- [3] Thermo Electron Corporation. (2013). Introduction to Raman spectroscopy.

[4] Baena, J. R., Lendl, B. (2004). Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 534-539.

[5] Orino, K., Watanabe, K. (2007). Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin. *The Veterinary Journal*, 178, 191-201.

[6] Guyton & Hall. (2011). *Tratado de Fisiología Médica*, Elsevier., pp. 1092.

[7] Wang W, (2010). Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800: 760-769.

[8] Alkhateeb, A. A., Connor, J. R., (2013). The significance of ferritin in cancer: Anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1836, 245-254.

[9] Coy, L. S., et al. (2005). Estrategias diagnósticas utilizadas para detectar deficiencias de hierro subclínicas y asociadas a enfermedades crónicas. *Nova - Publicación Científica*, 3(4), 58-68.

[10] Erramouspe B. (2012). Determinación de ferritina sérica. *HEMATOLOGÍA*, 16(2), 122-123.

[11] Meritxell A, Cristina V. (2010). Ministerio de Ciencia e Innovación. (Obtención, Procesado Y Almacenaje De Muestras De Suero Sanguíneo PNT_8.4.001). España: Centro de Investigación Biomédica en Red.

[12] Joke De G. et al. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules, 38, 1133-1147.

[13] Juqiang Lin, et al. (2011). A novel blood plasma analysis technique combining membrane electrophoresis with silver nanoparticle-based SERS spectroscopy for potential applications in noninvasive cancer detection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7, 655-663.

[14] Szybowicz M, Koralewski M, Karon J, Melnikova L. (2015). Raman Spectroscopy of Natural and Synthetic Ferritins and their Mimetics. *Acta Physica Polonica Series*, 127(2), 534-536.

[15] Berger, A. J., Koo, T. et al. (1999). Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy. *Optical Society of America*, 38(13), 2916-2926.

[16] Chan, J. W., Taylor, D. S., Zwerdling, T. (2006). Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophysical Journal*, 90(2), 648-656.

[17] Notingher, I., Verrier, S. et al. (2002). In situ characterisation of living cells by Raman spectroscopy. *IOS Press*, 16:43-51.