

ESTUDIO DE NANOMATERIALES EN PLASMA SANGUÍNEO

Núñez Guzmán Leonardo (1), Teodoro Córdova Fraga (2)

1 [Licenciatura en Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [leon.nug@gmail.com]

2 [Ingeniería Física, División de Ciencias e Ingenierías, León, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [theocordova@yahoo.com]

Resumen

Los nano-materiales (de 1-100nm aprox.) son estructuras con propiedades particulares debido a su tamaño. Presentes también de forma natural en el cuerpo humano, como son los de hierro. Estos son de particular interés por su aplicación clínica. Una forma de hierro de gran importancia es la presente en la proteína ferritina; que transporta y almacena hierro, la cual está presente principalmente en tejido reticuloendotelial (hepático), y menor cantidad en plasma sanguíneo. La ferritina sérica tiene una relación estrecha con la cantidad de hierro total en el cuerpo. Este estudio se enfoca en analizar, mediante Espectroscopía Raman, la posible proporción de señales de hierro en ferritina sérica, de acuerdo a padecimientos con niveles especiales: Hemodiálisis (H) y Anemia (A), de los cuales se analizaron 3 muestras de cada grupo, más 3 de un grupo control (C), para una posible aplicación clínica de pre-diagnóstico rápida y no invasiva. Usando como confirmación de la presencia y cantidad de hierro, la Fluorescencia de Rayos X. Lo que resultó en la identificación de ferritina en Raman, sin diferencias significativas, como para establecer un patrón en porcentaje de señales. Así como la identificación de hierro en XRF, a penas congruente con lo visto en Raman.

Abstract

The nano-materials (of 1-100nm approx.) Are structures with unique properties due to their size. also naturally present in the human body, such as iron. These are of particular interest for clinical application. A form of iron is very important in the present protein ferritin; that transports and stores iron, which is present mainly in reticuloendothelial tissues (liver), and fewer in blood plasma. Serum ferritin has a close relationship with the amount of total iron in the human body. This study focuses on analyzing, by Raman spectroscopy, the possible proportion of signals iron in ferritin, according to diseases with special levels: Hemodialysis (H) and anemia (A), of which 3 samples of each group were analyzed plus 3 of a control group (C), for a possible clinical application of rapid pre-diagnosis and noninvasive. Using as confirmation of the presence and quantity of iron, XRF technique. Which resulted in the identification Raman ferritin, no significant differences, as to establish a pattern signal percentage. And the identification of iron in XRF, a consistent penalties with that seen in Raman.

Palabras Clave

Nanomateriales; Determinación de Ferritina; Plasma sanguíneo; Espectroscopía Raman y UV-Visible; Fluorescencia de Rayos X.

INTRODUCCIÓN

Nanomateriales

Son estructuras ordenadas de escala aproximada de 1nm-100nm.^[1] Son de interés clínico los que presentes en el cuerpo humano, como son los de hierro; identificación de los mismos, análisis y estudio de sus propiedades, e incluso su síntesis.

Hierro

Casi todo organismo, desde el reino *archaea* hasta el ser humano, son dependientes del hierro, debido a su estabilidad termodinámica y potencial redox de sus 2 estados de oxidación Fe(II) y Fe(III). Está presente en transporte de O₂, expresión génica, fosforilación oxidativa, etc. Desarrollándose así, un metabolismo de hierro para regular su absorción, transporte y almacén.^[2] Distribución: 75% hemoglobina, 8-10% mioglobina, 4-5% citocromos y enzimas, 10-20% proteínas de almacenamiento (hemosiderina y ferritina) y 6-7% transferrina. Con 40-50mg (Fe/kg) de peso corporal y un poco mayor en hombres.^[3]

Plasma Sanguíneo

Constituido mayoritariamente por agua (92%), 7-9% de proteínas, principalmente albúminas (60%), globulinas (40%) y fibrinógeno (2-4%).^[4]

Ferritina

Caracterizada del bazo de caballo por Vilem Laufberger.^[3] e identificada en suero sanguíneo en 1972 inmunoradiométría^[5]. Es una proteína globular que almacenar hierro; lo extrae a medida de la síntesis de moléculas (hemoglobina y citocromos) y protege a la célula de la toxicidad del hierro, el cual almacenado, es relativamente inerte. Encapsula hasta 4500 átomos Fe³⁺, 24 subunidades tipo H y L (heavy-light), predomina la L en suero, peso molecular: 20000Da; 480000Da (apoferritina) y 750000Da (ferritina).^[6]

Su núcleo es un complejo de hidroxifosfato férrico (ferrhidrita). Relacionada con hematita (α -Fe₂O₃) y de polimorfos de akaganeita, β -FeOOH (combinaciones FeO₆ octaédricas). Tras rayos X se encontró cristalinidad (inversa a la cantidad de fosfato) y con microscopía, cristales de 6-7nm.^{[7],[8]} Cristalinidad relacionada con la secuencia de aminoácidos, ligandos de hierro en sitios activos y del número de subunidades H (canales de nucleación)^[8]. Pues la proporción H/L^{[9],[10]} y la presencia de metales como Al, Mn, Co, Zn puede provocar menor cantidad de hierro interno.^[11]

Ha sido un marcador clínico del hierro, pese a ser aproximadamente el 0.025%,^[8] de la ferritina total. Es una forma de cuantificación no invasiva, contra una prueba de tejido de hígado (60%) o de médula ósea. Además, es molécula de señalización pro-inflamatoria en células mesenquimales (hígado).^[9] Así, la cantidad de ferritina sérica/hierro almacenado es diferente que la reportada en la literatura: 1 μ g/L~ 8mg de hierro intracelular.^{[12],[13]}

Niveles de ferritina en adultos sanos: 39 μ g/L en mujeres, 140 μ g/L en hombres y en niños 30 μ g/L (7-142 μ g/L).^[14] En pacientes con desórdenes inflamatorios (como hemodiálisis), 250-5000 μ g/L^[9]: El exceso de hierro intracelular aumenta las citosinas pro-inflamatorias, causando disminución en los niveles de transferrina, provocando el poco transporte de hierro almacenado a células eritroideas, bajando la síntesis de hemoglobina y elevados niveles de hierro intracelular.^[15] En anemia: 12 μ g/L y de 1.5-9 μ g/L en niños.

Espectroscopia Raman

Fundamentos

Fue descrito por el físico Chandrasekhara Raman en 1928, inspirado en los trabajos de Rayleigh (dispersión elástica).^[10] Técnica fotónica de alta resolución que da en segundos información química y estructural de casi cualquier compuesto. Analiza la dispersión inelástica de un haz de luz monocromática, debido a cambios en los estados de energía vibracional (Stokes y anti-Stokes). Es no destructiva y sin preparación especial.^{[16],[17]}

Antecedentes

Las metodologías de identificación han sido desde inmunoradiometría hasta ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Siendo metodologías destructivas, costosas y no rápidas.

Para cuantificar constituyentes sanguíneos se han utilizado métodos ópticos, como absorción (IR y NIR), polarización, dispersión elástica, fotoacústica y varios tipos de Raman (Stokes, anti-Stokes y Stokes estimulado). Con el propósito de descubrir una técnica no invasiva.^[18] Se ha usado SERS (espectroscopia Raman de superficie aumentada) para el estudio de muestras biológicas complejas^[19], así como espectroscopia Raman (RS). Muchos estudios utilizan a 785nm el láser de excitación y un rango espectral de 250-1800cm⁻¹. Un estudio muestra la identificación de ferritinas natural, sintética y miméticas, con 'picos' (señales) característicos de estas ferritinas, marcando énfasis en el material magnético dentro (Fe₂O₃), *in vitro* e *in vivo*. Analizando de 200-1000cm⁻¹.^{[20],[21]}

Fluorescencia de Rayos X

Técnica de análisis elemental de emisión, cuantitativa y cualitativa, la cual mide la energía liberada (fluorescencia), debida a las transiciones electrónicas de los átomos tras incidir radiación de Rayos X (10⁶-10⁸, cm⁻¹); transiciones de diferentes estados energéticos que son únicas para cada elemento (Tabla 1). De intensidades directamente proporcionales a la concentración del analito.^[22]

Tabla 1: Energías constantes α y β , de ionización. ^[23]

Metal	KeV			
	Ka	Kb	La	Lb
Rh	20.21	22.72	2.70	2.83
Al	1.49	1.55	0.00	0.00
Ag	22.16	24.94	2.98	3.15
Fe	6.40	7.06	0.00	0.00

En síntesis, la estimación de la relación de ferritina sérica con hierro intracelular no es del todo fiable. Por lo que se plantea, como herramienta de pre-diagnóstico, valerse de los diferentes 'picos' en Raman de los nanomateriales presentes en ferritina y encontrar una diferencia en su

proporción, de acuerdo a 2 padecimientos frontera: como anemia (A) y pacientes de hemodiálisis (H).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron muestras de plasma sanguíneo de 9 personas divididas en 3 grupos: Anemia (A), Hemodiálisis (H) y Control (C), 3 de cada uno. Preservadas a 4°C, aproximadamente.

Análisis

Para Raman: Láser: 780nm, rango: 200-1800cm⁻¹, 50X, haciendo un mapeo de 5X5 por muestra. Análisis de 20 μ L de plasma sanguíneo sobre un portaobjetos cubierto con papel aluminio (para disminuir el ruido por fluorescencia).

Fluorescencia de rayos X: Ánodo de Rh, 9kV, 1030 μ A, Filtro de Ti y en medio aire. Se tomaron 40 μ L de plasma sanguíneo.

Tratamiento de datos

Para Raman se utilizó MatLab para eliminar línea base y normalizar los datos. Enfocando en el rango de 250-1000cm⁻¹. En XRF software de la marca del espectrómetro: Omnian.

Raman y XRF: Análisis ANOVA (0.95) para determinar significancia entre grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un promedio de cada mapeo enfocando el rango de ferritina: 250-1000cm⁻¹ (Imagen 1). Una normalización, un segundo promedio entre cada grupo (Imagen 2) y dejando en términos de porcentajes (correspondientes a cada señal tomando en cuenta sólo las intensidades de los 9 picos del nanomaterial en ferritina) (Tabla 2).

IMAGEN 1: Señales de las 3 muestras década grupo (A, C y H).

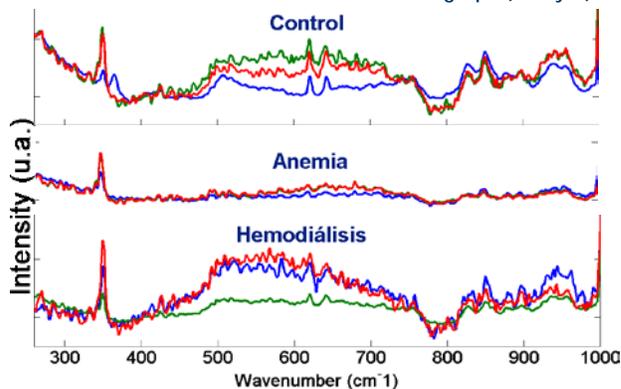


IMAGEN 2: Picos promedio de ferritina de A, C y H. Normalizados

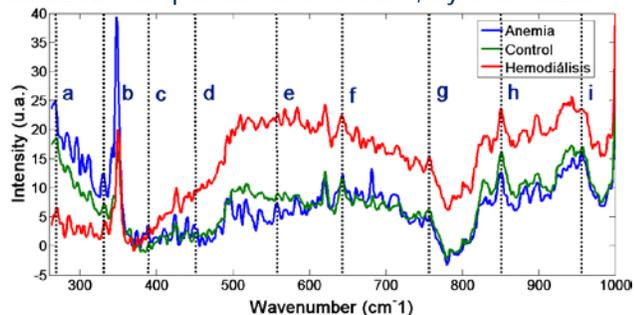


Tabla 2: Picos de ferritina.

Tipo	Wavenumber	Bandas Raman
a	268.855	
b	331.5302	Fe-O Estiramiento simétrico
c	390.3484	
d	451.0951	Fe-O Estiramiento asimétrico
e	558.125	Fe-OH Estiramiento asimétrico
f	642.9775	
g	755.7928	
h	851.252	
i	956.3534	

Se compararon los porcentajes de las 9 señales (Imagen 3) mostrando diferencias, principalmente de Control con Hemodiálisis que con Anemia. Mediante ANOVA se observó que dentro de Control y Anemia no hay diferencias significativas, como se esperaba, pero sí dentro de Hemodiálisis. Es decir, una diferencia entre grupos y, por ende, un buen patrón de picos no es significativo.

IMAGEN 3: Señales de ferritina en Raman de A, C y H (%).

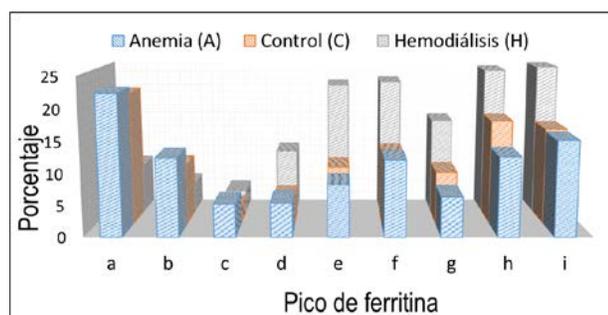


Tabla 3: Hipótesis nula o alterna de ANOVA de A, C y H (Raman)

A través de XRF, se identificó y determinó el porcentaje de hierro y otros metales como Al y Ag (Imagen 4), entre otros. Se observa hierro en la mayoría de las muestras, también gran cantidad de aluminio y plata (Tabla 3).

IMAGEN 4: Picos de Fe, Al y Ag en A, C y H (%). Normalizados.

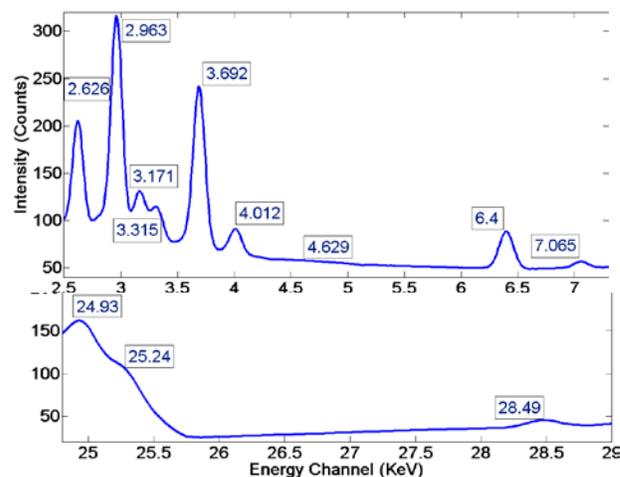
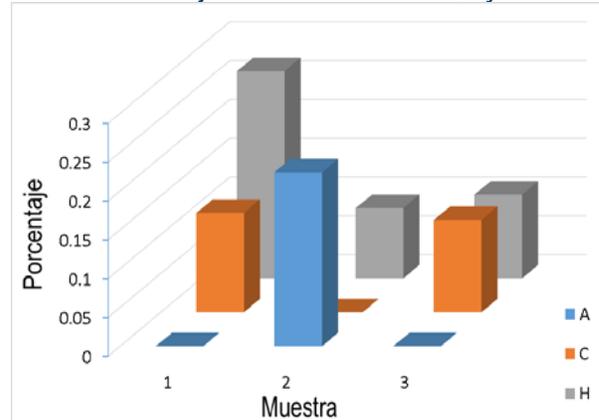


Tabla 3: Porcentajes de Al, Ag y Fe en A, C y H.

Grupo	Fe (%)	Al (%)	Ag (%)
A1	0	0.811	2.151
A2	0.224	1.955	2.121
A3	0	1.101	1.696
C1	0.128	1.383	1.747
C2	0	1.261	1.689
C3	0.119	1.03	1.6
H1	0.267	2.361	1.65
H2	0.09056	1.082	1.762
H3	0.108	1.188	1.616

Se observó en el porcentaje de hierro a penas una diferencia consistente entre grupos (Imagen 5). Y tras prueba ANOVA, diferencia significativa para los 3 grupos. Y no significativa para Fe, Al y Ag.

IMAGEN 5: Porcentaje de Fe en toda muestra: A, C y H.



CONCLUSIONES

En Espectroscopía Raman, los picos de Anemia y Control, se observa casi una continuidad entre Control y Anemia, pero con Hemodiálisis se ven acentuados desde el 4to. pico (d), denotando diferencia en la constitución del hierro como nanomaterial dentro de las cavidades de ferritina sérica, específicamente de las subunidades H. Sin embargo, no de manera significativa.

De manera complementaria, los resultados en XRF muestran mayor cantidad de Fe los pacientes de hemodiálisis, pero no significativamente. Observando también un pequeño aumento en la cantidad de aluminio y plata presente, pudiendo desplazar y/o cambiando la distribución del hierro. No son concluyentes estos resultados pues, existe aluminio en el espectrómetro y los niveles de plata son aún mayores en el grupo A.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Veranos UG, la Universidad de Guanajuato, a la DCI y el departamento de Física, al Dr. Teodoro Córdova, compañeros y todos los involucrados para que este proyecto se realizara.

REFERENCIAS

[1] Díaz del Castillo R. M. Introducción a los nanomateriales (2012). Recuperado de http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/ 22/06/16

[2] Carmona R., Materiales basados en el metabolismo del hierro (2014). Universidad de Granada, facultad de ciencias, Depto. De q. Inorgánica, 13-31.

[3] Pinto P.D.A., Hemo-ferritinas sintéticas: Nanopartículas bifuncionales para aplicaciones en nanomedicina (2012). Universidad Simón Bolívar, Coord. De Lic. Química, 4-12.

[4] Sistema inmune y la sangre. Enfermera virtual. Recuperado de <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/102/Sangre.pdf?1358605574 16/06/16>.

[5] Addison G.M., Beamish M.R., Haales C.N., Hodgkins M., Jacobs A. & Llewellyn P., An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload (1972). *Journal Clin. Path.* (25). 326-329.

[6] Emma Ashley, Ferritin (serum, plasma) (2012). Association for Clinical biochemistry.

[7] Harrison P. M. The structure and function of ferritin (1986). *Biochemical education* 14(4). 154-162.

[8] Elizabeth C. T. Ferritin: The protein nanocage and iron biomineral in health and in disease (2013). *Inorg. Chemistry* (52). 12223-12233.

[9] Wang W., Serum Ferritin: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta* (2010). *Biochim Biophys Acta*, 1800 (8). 700-769.

[10] Reddy G.C., Devaki R. & Pragna R. Iron indices in patients with functional anemia in chronic kidney disease (2013). *IFCC*(24).3-4.

[11] Spada P.L., Rossi C., Alimonti A., Bocca B., Cozza V., Ricerca B.M., Bocci M.G., Vulpio C. & De Sole P. Ferritin iron content in haemodialysis patients: Comparison with septic and hemochromatosis patients (2008). *Clinical Bioch.* (41). 997-1001.

[12] Eltayeb A. E. Serum Ferritin in normal subjects and assessment of iron status during pregnancy (1997). University of Khartoum, Faculty of medicine, Department of Biochemistry.

[13] Walters G.O., Miller F. M. & Worwood M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects (1973). *J. Clin. Path* (26). 770-772.

[14] Siems M. A., Addiego J. E. & Dallman P. R. Ferritin in Serum: diagnosis of Iron Deficiency and iron Overload in Infants and Children (1974). *Blood journal* (43).

[15] Knovich M. A., Storey J. A., Coffman L. G. & Torti V. S. Ferritin for the clinical (2010). *Blood Rev* 23(3). 95-104.

[16] Cap. 1: Fundamentos de espectroscopia Raman. 10-34. www.tdx.cat/bitstream/10803/6887/3/03Rpp03de11.pdf 16/06/16

[17] Reinoso M. Espectroscopia Raman (2010). 15/06/16 CONICET-UNSAM-CNEA. Recuperado de: <http://www.tandar.cnea.gov.ar/eventos/Nano2010/Reinoso.pdf 8/6/16>

[18] Berger A.J., Koo T., Itzkan I., Horowitz G. & Feld S. M. Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy (1999). *Applied optics* (38). 2916-2926.

[19] Premasiri W. R., Lee J. C. & Ziegler L. D. Surface-enhanced Raman scattering of whole human blood, blood plasma, and red blood cells: Cellular processes and bioanalytical sensing (2012). *ACS* (116). 9376-9386.

[20] Szybowicz M., Koralewski M., Karon J. & Melnikova L. Micro-Raman Spectroscopy of Natural and Synthetic Ferritins and Their Mimetics (2015). *Acta Physica Polonica* (127). 534-536.

[21] Shim S., Duffy T.S. Raman spectroscopy of Fe₂O₃ to 62GPa (2001). *American Mineralogist* (87). 318-326.

[22] Meléndez P. C. O. & Camacho D. A. A. Espectrometría de fluorescencia de rayos X (2009). 11/07/16 Recuperado de: http://www.uach.mx/extension_y_difusion/synthesis/2009/08/20/

[23] X ray properties periodic Table. Illinois Institute of Technology. <http://www.csrii.iit.edu/periodic-table.html 18/07/16>