



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Desarrollo de un inmunoensayo para la  
determinación de elementos presentes en la  
ferritina sérica**

**Daniel Turiel Fernández**

**Julio 2015, Oviedo**



**MARIA MONTES BAYÓN**, Profesora del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado **“Desarrollo de un inmunoensayo para la determinación de elementos presentes en la ferritina sérica”**

ha sido realizado por el alumno Daniel Turiel Fernández bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 9 de Julio de 2015

Fdo: Maria Montes Bayón

## ÍNDICE

1. Símbolos y abreviaturas .....	1
2. Prólogo .....	2
3. Introducción .....	3
3.1. La ferritina: definición e importancia.....	3
3.2. El papel de la ferritina en el metabolismo del Fe .....	5
3.3. Enfermedades relacionadas con el metabolismo del Fe .....	7
3.4. La medida de la ferritina en el diagnóstico de otras enfermedades.....	9
3.5. Métodos de determinación de ferritina sérica .....	10
4. Objetivos .....	13
5. Metodología experimental.....	14
5.1. Reactivos y disoluciones .....	14
5.2. Instrumentación.....	15
5.3. Procedimientos experimentales.....	17
5.3.1. Lavado del material.....	17
5.3.2. Optimización de las medidas de ICP-MS.....	17
5.3.3. Optimización del ensayo para aislar la ferritina.....	19
6. Resultados y discusión .....	21
6.1. Sistema FIA-ICP-MS: optimización y características analíticas.....	21
6.2. Análisis de elementos traza en patrones de ferritina .....	26
6.3. Medida de los metales en sueros de pacientes con distintos niveles de ferritina .....	31
7. Conclusiones .....	39
8. Apéndices.....	40
8.1. Calibrados obtenidos en el Agilent 7700 .....	40
8.1.1. Sin usar He en la CID.....	40
8.1.2. Usando He en la CID .....	43
8.2. Calibrados obtenidos en el ThermoElement 2 .....	44
8.3. Preparación de las disoluciones de ferritina .....	45
8.4. Concentraciones de metales en los diferentes sueros .....	47

## 1. Símbolos y abreviaturas

---

ICP-MS: Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

FIA: Sistema de inyección en flujo.

DMT1: Divalent Metal Transporter 1.

HCP1: Heme Carrier Protein 1.

ECL: Electroquimioluminiscencia.

ECLIA: Inmunoquimioluminiscencia.

HUCA: Hospital Central Universitario de Asturias.

## 2. Prólogo

---

La presencia de metales tóxicos en la sangre de individuos con insuficiencia renal crónica ha sido tema de estudio en clínica por los posibles efectos perjudiciales que estos puedan representar para la salud. Estos metales pueden estar libres en el suero o alojarse dentro de la ferritina, la principal proteína acumuladora de Fe en el organismo. Por tanto, en el presente trabajo fin de máster se desarrolla un método que tiene como objetivo fundamental la cuantificación de metales presentes en el suero de pacientes de hemodiálisis con distintos niveles de ferritina circulante tanto a nivel global como aquellos alojados dentro de la estructura de la ferritina. Los metales seleccionados sujeto de estudio han sido aluminio, cobre, cromo, manganeso y zinc.

El reto analítico de este trabajo reside en la separación de la ferritina del resto de componentes presentes en el suero, posibilitando así una determinación de dichos metales en el suero total y en la ferritina aislada para poder comparar ambos resultados. Para este propósito se ha llevado a cabo un inmunoensayo con un anticuerpo monoclonal antiferritina biotinilado que permite la separación específica de la ferritina respecto a otras proteínas séricas empleando micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, así como una optimización para la cuantificación de dichos metales haciendo uso de la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) e introducción de muestras mediante un sistema de inyección en flujo (FIA).

La motivación que sostiene el trabajo es la novedad del mismo, pues son pocos los estudios que se han realizado para detectar dichos metales en la ferritina y que puede afectar a la toxicidad de los mismos en el organismo, particularmente en el caso de pacientes con insuficiencia renal crónica donde la eliminación de los metales circulantes por parte del riñón se encuentra muy limitada. Además el trabajo engloba una parte sanitaria relacionada con la vida, útil para los pacientes y de gran interés para los especialistas, mostrando la gran aplicación y el contexto real del mismo.

### 3. Introducción

---

#### 3.1. La ferritina: definición e importancia

La ferritina es una proteína citosólica que se encuentra en la mayor parte de los tejidos aunque se sintetiza fundamentalmente en el hígado, donde almacena el hierro en forma de depósitos de este metal en forma biodisponible.<sup>1</sup> Aproximadamente el 20% del hierro se encuentra almacenado en esta proteína y en la hemosiderina. Tiene un peso mínimo de 440 kDa que varía dependiendo del contenido férrico, el cual está en un promedio de aproximadamente 2000 iones de  $\text{Fe}^{3+}$ , todos ellos en el núcleo férrico<sup>2</sup>. Bajo condiciones saturantes se puede llegar a niveles de 4500 átomos de hierro por molécula de ferritina.

La función principal de esta proteína es la de liberar el hierro rápidamente cuando disminuyen los niveles de hierro plasmático. Además de esto tiene otras importantes funciones como la protección frente a la proliferación celular incontrolada, al daño oxidativo y en procesos inflamatorios. También es importante su uso como marcador biomédico para detectar desordenes metabólicos de hierro. Se acumula en los hepatocitos del hígado mayoritariamente y está presente en el plasma a niveles de traza.

El parámetro clínico que se usa para conocer el estado de las reservas de hierro en el organismo es la ferritina sérica, expresada en las unidades de ng/mL. La razón de esta medida radica en que el nivel de esta proteína en suero es proporcional al contenido de hierro en los depósitos hepáticos, siendo aproximadamente 1 ng/mL de ferritina sérica equivalente a 8 mg de hierro almacenado en el cuerpo.

La apoferritina (parte proteica de la ferritina) está formada por 24 subunidades de dos tipos inmunológicos diferentes, ligeras (L) y pesadas (H).<sup>3</sup> Los monómeros L contienen 174 aminoácidos y un peso molecular de 19900 Da, y tienen una función importante en la formación y crecimiento del núcleo del hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La cadena H actúa como una ferroxidasa, catalizando al mismo tiempo la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$

---

<sup>1</sup>Knovich, M. A.; Storey, J. A.; Coffman, L. G.; Torti, S. V.; Torti, F. M. *Ferritin for the clinician*. Blood Rev. **2009**, 23, 95–104.

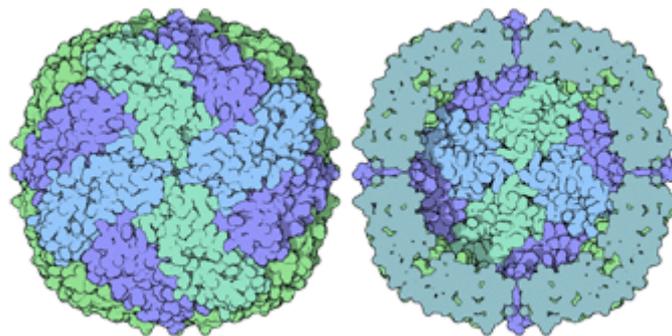
<sup>2</sup>Analizadores Elecsys y cobas; *Ferritina*; REF 0.737551.

<sup>3</sup>Theil, E. C. *Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism*. J. Nutr. **2003**, 133, 1549S-1553S.

intracelular a  $\text{Fe}^{3+}$  y la reducción del oxígeno. Tiene unos 183 aminoácidos con un peso molecular de 21200 Da. Esta molécula tiende a formar oligómeros y, cuando se encuentra en exceso en las células de los órganos de depósito, a condensarse en los lisosomas en forma de hemosiderina semicristalina.<sup>2</sup>

En el bazo y en el hígado la ferritina es rica en las subunidades L, tiene un cierto mayor contenido en hierro (1500 átomos de hierro/molécula, por lo menos). En el corazón y cerebro la ferritina está enriquecida con las subunidades H, teniendo un menor contenido en hierro (1000 átomos de hierro/molécula). Además de esto, la ferritina también se encuentra presente en el suero sanguíneo, utilizándose clínicamente junto a otros parámetros relacionados con el hierro (como por ejemplo el % de saturación de la transferrina) para poder conocer los niveles de hierro de un paciente.<sup>1</sup>

Las 24 subunidades de la ferritina se ordenan esféricamente generando una cavidad hueca de diámetro interno de 80 Å y de diámetro externo igual a 125 Å como se muestra en la Figura 1. Los 4500 átomos de hierro que se pueden llegar a incorporar a esta proteína se almacenan como cristales de hidróxido fosfato férrico  $[(\text{FeOOH})_8 \cdot \text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2]$ . En condiciones normales la ferritina no se encuentra saturada y suele contener un promedio de 2000 átomos de hierro.



*Figura 1. Imagen de la estructura cuaternaria de la ferritina.*

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de la ferritina se encuentra dentro de la célula, pero también puede hallarse en el medio extracelular de la sangre y el plasma. A diferencia de la ferritina que se encuentra en los tejidos, la sérica está formada principalmente por subunidades L glicosiladas (son denominadas G) con un contenido en hierro bajo, incluso cuando se da el caso de sobrecarga férrica. En la

sangre esta proteína se encuentra en niveles de traza y se cree que está constituida principalmente por subunidades H.

### 3.2. El papel de la ferritina en el metabolismo del Fe

Bajo condiciones fisiológicas, el hierro que entra diariamente en el cuerpo (aproximadamente 1 mg/día) se incorpora a un ciclo prácticamente cerrado que se repite de manera indefinida. Aunque el hierro puede ser absorbido por todo el intestino, su absorción es más eficiente en el duodeno<sup>4</sup> y la parte alta del yeyuno, donde el pH es ligeramente ácido. Esta absorción depende del tipo de hierro del cual se trata, existiendo el hierro inorgánico (+3) y el hierro "hemo" (+2). Este último se encuentra formando muchas metaloproteínas, encontrándose fundamentalmente en alimentos de origen animal. El hierro inorgánico sin embargo, se encuentra en alimentos de origen vegetal y en preparados farmacéuticos, y está formado fundamentalmente por sales inorgánicas de dicho metal.<sup>4</sup>

Gracias al ácido clorhídrico del estómago y de la enzima ferriredutasa, el hierro inorgánico pasa a hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), el cual es soluble y capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal<sup>5</sup>. La DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) es una proteína de membrana cuya función es la de transportar los iones ferrosos a través de las células epiteliales del intestino, siendo capaz también de transportar otros metales divalentes como el zinc, manganeso, cobre o plomo<sup>6</sup>.

En cuanto al hierro hemo, atraviesa la membrana celular bajo la forma de metaloporfirina intacta, separada de la globina gracias a proteasas endoluminales o de la membrana del enterocito. Este transporte lo realiza otra proteína, la HCP1<sup>7</sup> (Heme Carrier Protein-1). Una vez se encuentra en el citosol del enterocito el hierro pasa al torrente circulatorio mediante su asociación a la transferrina que lo transporta y distribuye a los distintos órganos: principalmente a la médula ósea para la síntesis de hemoglobina, una parte para la síntesis de mioglobina y otras enzimas y finalmente el

---

<sup>4</sup>Food and Nutrition Board, National Research Council: *recommended dietary allowances*. 10th ed. Washington, DC. **1989**, National Academy Press.

<sup>5</sup> Ponka, P.; Schulman, H. M.; Woodworth, R. C. *Iron transport and storage*. CRC Press, Inc.; **1990**.

<sup>6</sup> Aisen, P.; Wessling-Resnick, M.; Leibold, E. A. *Iron metabolism*. *Curr Opin Chem Biol.* **1999**, 3:200-6.

<sup>7</sup> Uzel, C.; Conrad, M. E. *Abortion of heme iron*. *Semin Hematol.* **1998**,35:27-34.

exceso se acumula en la ferritina del hígado fundamentalmente como se muestra en la Figura 2.

Existe una gran heterogeneidad en la ferritina, pudiendo diferenciar mediante la técnica del isoelectroenfoque<sup>8</sup> hasta 20 isoferritinas diferentes<sup>2</sup>. Esto se debe al contenido cambiante de las subunidades H y las L. Las isoferritinas básicas (ricas en subunidades L) garantizan el depósito de hierro a largo plazo, encontrándose en el hígado y bazo; mientras que las ácidas (ricas en subunidades H) contienen menos hierro, y su función se relaciona más con los procesos de síntesis, encontrándose en el miocardio, placenta y tejido tumoral<sup>2</sup>. Los puntos isoeléctricos de las mismas se encuentran comprendidos entre 4.8 y 5.8.

El organismo humano contiene de 200 a 1.500 mg de hierro en forma de ferritina y hemosiderina; 30% se encuentra en el hígado, otro tanto en la médula ósea y el resto en bazo y músculos.

En cuanto a la eliminación, el hierro se pierde sólo por hemorragias y en cantidades muy pequeñas por las heces, el sudor y la exfoliación normal del pelo y la piel. La mayor parte del hierro de las heces corresponde al que no se absorbió de los alimentos. La eficacia de la absorción depende del individuo y del alimento en que se encuentra. Por la orina casi no se elimina hierro.

La pérdida diaria de hierro es casi 1mg en el varón adulto y ligeramente menor en mujeres que no menstrúan; en la menstruación se pierde en promedio 0.5 mg/día. Sin embargo existen grandes variaciones entre las personas y en casi 5% de mujeres normales se han observado pérdidas menstruales de 1.4 mg/día de hierro.

---

<sup>8</sup> Drysdale, J. W. *Heterogeneity in tissue ferritins displayed by gel electrofocusing*. *Biochem J.* **1974**,141:627-32.

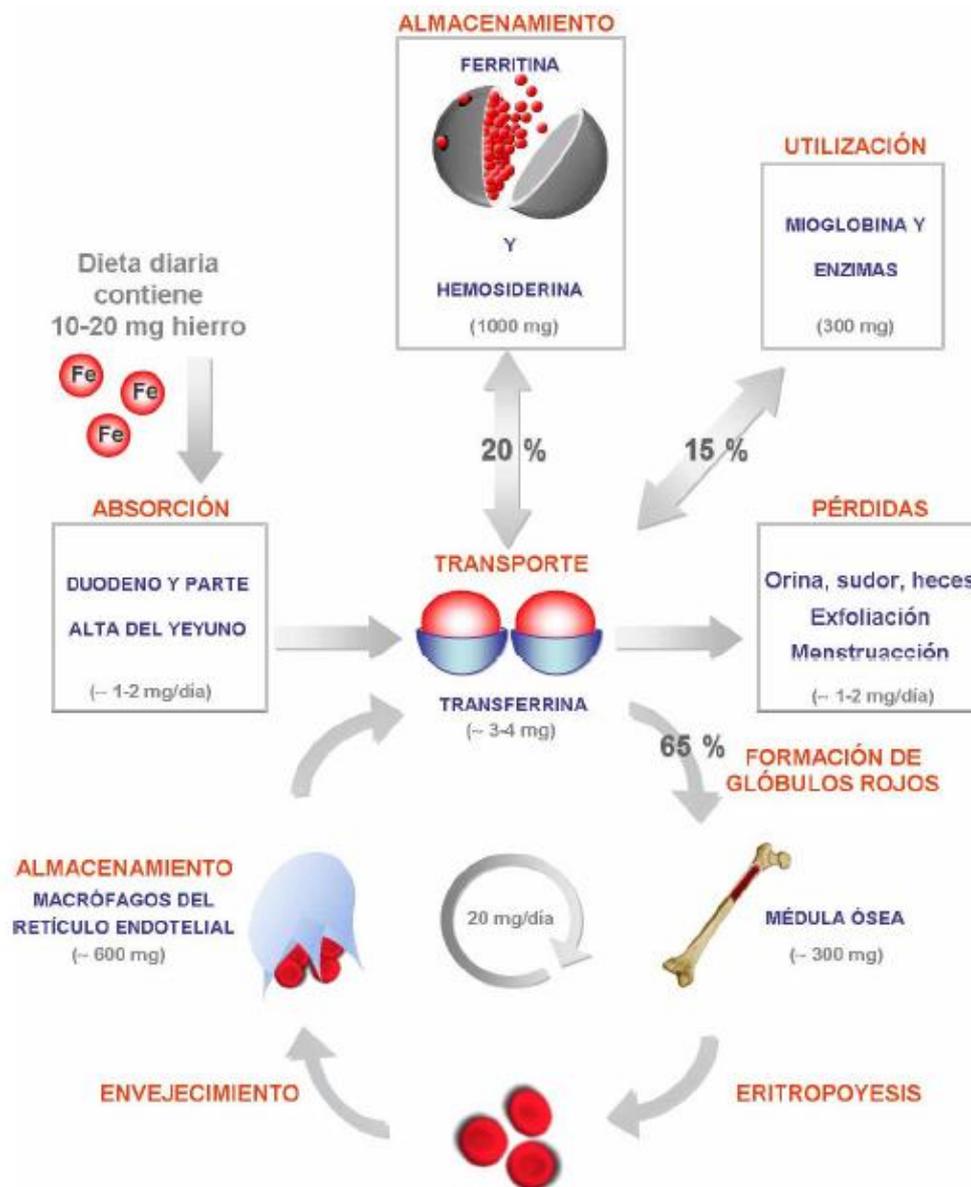


Figura 2. Ciclo biológico del hierro en el organismo humano.

### 3.3. Enfermedades relacionadas con el metabolismo del Fe

La deficiencia de hierro es la más común de todas las enfermedades por carencia humanas en países en desarrollo y desarrollados. Los grupos de mayor riesgo son los menores de dos años, niñas adolescentes, mujeres embarazadas y personas de edad avanzada.

La carencia de hierro se manifiesta finalmente por el desarrollo de anemia, que se corrige administrando dietas ricas en hierro absorbible y proporcionando suplementos de hierro en forma de sulfato o gluconato ferroso. La deficiencia de hierro

puede deberse a lesiones, hemorragias o enfermedades, también puede agravarse por una dieta mal equilibrada insuficiente en hierro, folato y vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> y C. En niños puede llevar a la presencia de bajo rendimiento escolar, disminución de la capacidad de atención y alteraciones en el crecimiento físico y desarrollo neuropsicológico.

Existen tres etapas generadas por los estados carenciales de este nutriente. La fase I trae consigo el inicio de la escasez del metal en los órganos de depósito para satisfacer las necesidades del organismo. En la fase II, denominada eritropoyesis ferropénica, los almacenes se vacían y comienza a existir una insuficiencia en el aporte de hierro a las células. Finalmente, la fase III o anemia ferropénica presenta valores para la hemoglobina por debajo de los considerados normales. En esta etapa última los síntomas manifestados van desde palidez por deficiencia de la hemoglobina, fatiga, uñas quebradizas, etc.

La determinación de la ferritina constituye un método apropiado para averiguar la situación metabólica del hierro. Las deficiencias en el depósito de hierro pueden ser detectadas precozmente en el sistema retículo-endotelial. El valor límite establecido clínicamente para la detección de la deficiencia prelatente de hierro es de 20 µg/L. Este valor indica de forma fiable la depleción de las reservas férricas disponibles para la síntesis de la hemoglobina. Valores inferiores a 12 µg/L se consideran como una ferrodeficiencia latente. En cuanto a los valores límites superiores, se encuentran en 400 µg/L. Valores superiores pueden ser indicadores de una necrosis celular, de un bloqueo de la eritropoyesis o de una síntesis de tejido tumoral<sup>2</sup>. Para la ferritina, los valores normales se encuentran entre 12 y 300 ng/mL para los hombres, y 12 y 150 ng/mL para las mujeres<sup>9</sup>.

Al igual que la deficiencia de hierro puede llevar problemas, también su exceso puede presentar alteraciones patológicas en muchos órganos, de manera especial se ve afectado el hígado, por sus múltiples vías de entrada y por ser el principal órgano de reserva de hierro. Dentro de las situaciones de exceso de hierro, la hemosiderosis se refiere a la presencia de hierro en un tejido sin llevar consigo daño tisular, por otro lado la hemocromatosis si implica dicho daño por depósito del metal mencionado, aunque es cierto que este daño no es evidente inicialmente.

---

<sup>9</sup> <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003490.htm>

Este exceso en el metal se puede producir por dos causas fundamentalmente, por un aumento de la absorción del hierro y por un aumento del catabolismo de los eritrocitos. En el primer caso el hierro se deposita en las células parenquimatosas del hígado, corazón y en algunos tejidos endocrinos. Cuando el aumento de la absorción del hierro es debido a factores genéticos se denomina hemocromatosis hereditaria o primaria. En el segundo caso el hierro se acumula primero en los macrófagos del sistema retículo endotelial y más tarde en las células parenquimatosas. En estos casos se habla de hemocromatosis adquirida o secundaria.

La hemocromatosis hereditaria es la forma más común de exceso de hierro. A largo plazo se genera una acumulación de hierro en hígado, páncreas y músculo cardiaco que acaban desembocando en fibrosis e insuficiencia funcional en dichos órganos afectados<sup>10</sup>.

### 3.4. La medida de la ferritina en el diagnóstico de otras enfermedades

Aunque como se ha comentado en el apartado anterior, la ferritina puede representar un valioso marcador de la homeostasis del Fe, dicha medida puede verse afectada por procesos inflamatorios. Estas situaciones proporcionan un aumento considerable de la concentración de ferritina en plasma, pero que no puede ser asociada específicamente a una enfermedad concreta. Algunos de estos casos se asocian con la enfermedad renal crónica, la artritis reumatoide o diversos desórdenes autoinmunes. Algunos pacientes en hemodiálisis tienen valores de ferritina circulante mayores de 500 ng/mL (hiperferritinemia), sin embargo esto no significa que tengan más hierro biodisponible para llevar a cabo la eritropoyesis sino que la proteína se encuentra elevada debido a procesos inflamatorios. Además, se ha observado que dichos pacientes tienen en su plasma sanguíneo un muy bajo contenido en hierro en su ferritina<sup>11</sup>. Una de las hipótesis que se emplean para explicar este fenómeno es que la ferritina en estos casos contiene otros metales diferentes al hierro que ocupan su centro activo (recordemos que puede alojar hasta 4500 átomos de Fe).

---

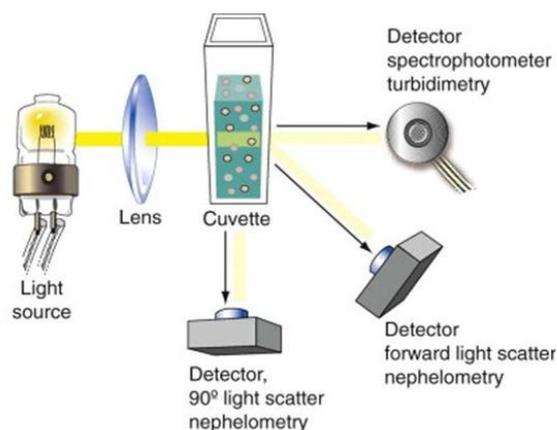
<sup>10</sup> Roy, C. N.; Andrews, N. C. *Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers*. Hum Mol Genet. **2001**, 10:2181-6.

<sup>11</sup> Spada, P.L.; Rossi, C.; Alimonti, A. et al. *Ferritin iron content in hemodialysis patients: comparison with septic and hemochromatosis patients*. Clin. Biochem. **2008**, 41: 997-1001.

Pese a que esta habilidad de la ferritina para enlazar metales diferentes al hierro es conocida, hay pocas publicaciones que muestren el contenido real de los metales dentro de la ferritina plasmática. Los escasos trabajos existentes en este sentido revelan la presencia iones metálicos en el interior del núcleo de ferritina como Al, Fe y Zn, mientras que otros como el Cr o el Mn también pueden estar presentes<sup>12</sup>. El metal que sustituye al hierro en mayor medida es el Al debido a sus características comunes.

### 3.5. Métodos de determinación de ferritina sérica

La determinación directa de la ferritina en el suero no es trivial debido a que los niveles en los cuales se encuentra presente este biomarcador son del orden de los ng/mL. Solamente métodos que posean una gran sensibilidad pueden ser utilizados para tal fin. En el análisis de rutina clínica, la ferritina circulante se determina habitualmente por inmunturbidimetría o nefelometría, así como por electro-quimioluminiscencia asociada a un inmunoensayo. En la inmunturbidimetría se emplean partículas de látex recubiertas del anticuerpo específico que se mezclan con la muestra. En la presencia del antígeno (ferritina), las partículas se aglutinan, resultando un aumento de turbidez de la muestra. El grado de la turbidez (medido mediante turbidimetría o nefelometría como muestra la Figura 3) es proporcional a la concentración del analito, permitiendo la cuantificación de la ferritina en las muestras.



**Figura 3.** Esquema de las medidas nefelométricas y turbidimétricas empleadas para la determinación de ferritina.

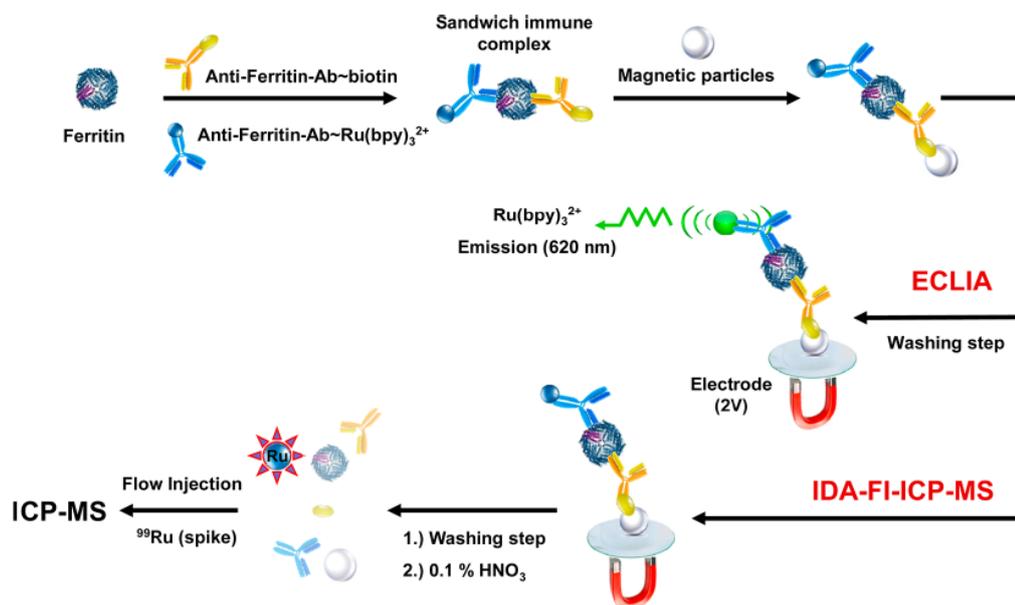
<sup>12</sup>Spada, P.L.; Rossi, C.; Alimonti, A.; et al. *Iron, zinc and aluminium ferritin content of hemodialysis hyperferritinemic patients: comparison with other hyperferritinemic clinical conditions and normoferritinemic blood donors.* Clin. Biochem. **2009**, 42:1654-1657.

El método basado en la luminiscencia se refiere comúnmente a la luz emitida por una molécula cuando cambia de un estado excitado a un estado de energía inferior, típicamente el estado fundamental. La luminiscencia puede ser de distintas formas, dependiendo del tipo de excitación que se emplee. En el caso de electroquimioluminiscencia (ECL), las moléculas son excitadas por una reacción electroquímica: una sustancia es electroquímicamente oxidada o reducida sobre la superficie de un electrodo. Esta especie oxidada o reducida se encuentra excitada (es energéticamente inestable) y emite una radiación de frecuencia específica al volver al estado fundamental

La ventaja de la electroquimioluminiscencia (ECL) es la extremada sensibilidad que proporciona y si esta se lleva a cabo a continuación de la reacción inmunoquímica, es posible además obtener una elevada selectividad. Por eso, el método ECLIA (electrochemoluminescentimmunoassay) es un método que proporciona excelentes características analíticas para la determinación de ferritina en las muestras de suero. Pese a todo ello, estos métodos revelan una concentración de ferritina basada en una curva de calibración, que debe ser hecha diariamente con estándares de concentración conocida (y hoy en día no existen métodos de normalización de la concentración de dichos estándares).

Es por eso que recientemente se han desarrollado modificaciones del método previamente detallado de ECLIA que resultan más cómodos y ventajosos por no requerir de esta curva de calibración; son los métodos absolutos basados en metodologías libres de calibrado. En este marco, la espectrometría de masas utilizando como fuente de ionización un ICP y apoyándose en un análisis por dilución isotópica es una técnica ampliamente utilizada.<sup>13</sup> Éste empleado para la ferritina y en que se basará el trabajo desarrollado en este TFM está basado en la formación de un inmunocomplejo con un anticuerpo biotinilado monoclonal específico anti-ferritina y otro anticuerpo específico monoclonal anti-ferritina marcado con quelato de rutenio, formando así un complejo tipo sándwich análogo al empleado en el método de ECLIA. Tras esta etapa se incorporan micropartículas esféricas recubiertas de estreptavidina formándose así un complejo por la interacción biotina-estreptavidina que puede lavarse del resto de los componentes de la disolución empleando un imán.

El complejo se disuelve en nítrico y una vez establecida la estequiometría entre el Ru y la ferritina, pueden llevarse a cabo medidas de la concentración de la proteína sin emplear patrones de calibrado como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Esquema de uno de los métodos para la detección de la ferritina en combinación con un análisis electroluminiscente y una detección por ICP-MS.<sup>13</sup>

<sup>13</sup>Konz, T.; Añón Alvarez, E.; Montes Bayon, M.; Sanz-Medel, A. *Antibody labelling and elemental mass spectrometry (ICP-MS) using isotope dilution for highly sensitive ferritin determination and iron-ferritin ratio measurement.* Anal. Chem. **2013**, 85, 8334–8340.

## 4. Objetivos

---

El presente trabajo tiene como objetivo general la *puesta a punto de un método analítico que permita la determinación de metales presentes en el núcleo metálico de la ferritina y elucidar si existe una relación entre dichos niveles y la enfermedad renal crónica*. Para llevar a cabo este objetivo general, es necesario desarrollar varios objetivos parciales:

- a) Puesta a punto de una metodología basada en análisis por inyección en flujo (FIA) para la determinación de cinco metales (Cu, Zn, Mn, Cr y Al) en micromuestras mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).
- b) Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de los metales previamente enumerados en muestras de suero humano y en patrones de ferritina humana comercial.
- c) Desarrollo de una metodología para aislar la ferritina del suero empleando un anticuerpo monoclonal biotinilado específico de la proteína y empleando para la recolección del compuesto micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina.
- d) Aplicación de la metodología desarrollada para la determinación de metales presentes en la ferritina de suero humano empleando el sistema FIA-ICP-MS previamente desarrollado.

Aunque la determinación de la ferritina total en los sueros estudiados se ha llevado a cabo en el Hospital Central Universitario de Asturias, se ha intentado correlacionar los datos obtenidos respecto a la proteína total con los obtenidos para los distintos metales.

## 5. Metodología experimental

---

### 5.1. Reactivos y disoluciones

El material de laboratorio que se utilizó de forma general fue:

- 1) Guantes de látex.
- 2) Pipetas pasteur de 1,5 y 3 mL.
- 3) Micropipetas de distinto volumen: 1-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- 4) Tips para micropipetas.
- 5) Filtros Millex Syringe-driven Filter Unit de 0.22  $\mu\text{m}$  de la casa comercial Millipore (Bedford, MA, USA).

Todas las disoluciones acuosas se prepararon en Agua Milli Q, obtenida mediante un sistema Milli Q Advance A10 de Millipore. Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

El ácido nítrico empleado para la limpieza del material de plástico y para la estabilización de las disoluciones metálicas se purificó previamente mediante una destilación lenta “sub-boiling” a partir de ácido nítrico concentrado al 65% (p/v) Merck (Darmstadt, Alemania).

Las disoluciones de calibración de los elementos analizados (Cr, Mn, Cu, Zn y Al) y de los elementos utilizados como patrones internos (Ge) fueron obtenidos de Merck. Las disoluciones fueron preparadas a partir de disoluciones de 1000 mg/mL de cada uno de los patrones individuales de calidad ICP con contenidos certificados de impurezas en medio ácido (en  $\text{HNO}_3$ ). Con éstos se prepara un stock de 1 ppm de una mezcla de Al, Cu, Cr, Zn y Mn en  $\text{HNO}_3$  0.1%. Así mismo se prepara un stock de 1 ppm de Fe para la determinación de la recuperación del ensayo, en  $\text{HNO}_3$  0.1%. También se prepara un stock de Ge en una concentración de 500 ppb a partir de otro de concentración de 1 ppm, preparados de igual modo en  $\text{HNO}_3$  0.1%.

Para el ensayo llevado a cabo con el fin de aislar la ferritina se utilizaron los siguientes reactivos: anticuerpos biotinilados monoclonales antiferritina (ratón) 3.0

mg/L, tampón fosfato 100 mmol/L pH 7.2; y micropartículas recubiertas de estreptavidina 0.72 mg/L. Todos ellos del kit del método Roche (Basilea, Suiza).

Para la optimización de la determinación de los metales así como para el estudio de la respuesta del equipo se preparó un stock de ferritina a partir de un patrón de dicha proteína de hígado humano de Sigma Aldrich (San Luis, MO, Estados Unidos) de 10 ppm. El stock se prepara tomando 40  $\mu$ L del patrón líquido y llevándolo a volumen de 500  $\mu$ L en 0.9% de NaCl (Merck) de pH 7.4. De este modo se prepara un stock de 500 ppb del cual preparar el resto de disoluciones.

Las muestras reales han sido utilizadas las proporcionadas por el Servicio de Bioquímica del HUCA, correspondientes a pacientes de hemodiálisis y recogidas cumpliendo los protocolos de ética aprobados por dicha institución.

## 5.2. Instrumentación

Para llevar a cabo el sistema de introducción de muestras se utilizó una jeringa de la casa Hamilton (Bonaduz, Suiza) de 25  $\mu$ L, inyectando en un bucle de 20  $\mu$ L la muestra mediante una válvula de seis vías de Rheodyne (Lake Forest, IL, Estados Unidos) de teflón. La salida de la válvula se conecta directamente a la entrada del sistema de nebulización del ICP-MS a través de un tubo de peek® de 0.25 mm de diámetro interno como se puede ver en la Figura 5. La fase de arrastre ( $\text{HNO}_3$ , 0.1%) se bombeó con el sistema de bomba peristáltica Gilson (Lewis Center, Ohio, Estados Unidos) a un flujo de 0.5 mL/ min.



*Figura 5. Sistema FIA-ICP-MS*

En cuanto a los equipos utilizados para la determinación de los metales se utilizaron dos sistemas de ICP-MS, el primero un Agilent 7700 de la casa comercial Agilent (Tokio, Japón) y el ThermoElement 2 de la casa ThermoScientific (Bremen, Alemania). Ambos constan de una fuente de ionización fuerte, el ICP, capaz de romper todos los enlaces de las moléculas presentes en la muestra obteniendo información elemental. La gran diferencia entre ambos reside en el analizador de masas, diferencia que se traduce en la resolución de los mismos, siendo el 7700 de baja resolución (analizador de masas de cuadrupolo) que permite la resolución de las interferencias espectrales a través del empleo de una celda de colisión/reacción. Se puede emplear uno u otro modo dependiendo del gas con el que se presuriza la celda (con helio de colisión ó con hidrógeno de reacción) así como los potenciales de entrada y salida de la propia celda. En este equipo la configuración de la celda fue presurizada con 3 mL/min de He como gas de colisión, para poder así eliminar las interferencias poliatómicas que afectan a algunos de los elementos en estudio. Las condiciones de trabajo aparecen recogidas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones empleadas en el Agilent 7700.

ICP-MS	7700 Agilent Technologies
Potencia RF	1550 W
Isótopos monitorizados	<sup>27</sup> Al, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>63</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>68</sup> Zn, <sup>72</sup> Ge, <sup>74</sup> Ge
Carrier gas	1.10 L/min
Fujo He en celda	3.0 mL/min
FIA	Bomba peristáltica
Flujo	0.5 mL/min
Fase de arrastre	HNO <sub>3</sub> 0.1%
Volúmen de inyección	20 µL

Por el contrario, el instrumento Element 2 utiliza como analizador de masas un sistema de doble enfoque así como un par de rendijas con tres amplitudes fijas que condicionan la resolución que se puede alcanzar ( $m/\Delta m$  400, 4.000, 10.000) consiguiendo así la resolución de interferencias poliatómicas. Las condiciones de trabajo se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones empleadas en el Element 2.

ICP-MS	ThermoElement 2
Potencia RF	1295 W
Resolución	4000 (Media)
Isótopos monitorizados	<sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>68</sup> Zn, <sup>72</sup> Ge, <sup>74</sup> Ge
Auxiliary gas	0.90 L/min
Sample gas	0.88 L/ min
Cool gas	15.94 L/min

### 5.3. Procedimientos experimentales

#### 5.3.1. Lavado del material

Se debe tener especial cuidado en la utilización de una bomba peristáltica para la realización del FIA, así como de lavar todo el material en el cual se vaya a realizar ensayos o disoluciones en HNO<sub>3</sub> al 10% durante como mínimo una noche para evitar posibles contaminaciones. Todas estas medidas deben llevarse a cabo por estar los analitos en concentraciones realmente bajas.

Para llevar a cabo los distintos ensayos y medidas de la ferritina se hizo uso de eppendorf de 1.5 mL, previamente lavados en HNO<sub>3</sub> 10% como mínimo una noche. Para la preparación de las disoluciones de calibrado se utilizan botes de plástico de 20 mL, lavados de igual manera en HNO<sub>3</sub> 0.1%.

#### 5.3.2. Optimización de las medidas de ICP-MS

En una primera instancia se inyectaron en el sistema patrones de 0, 2, 4, 8 y 20 ppb de cada metal mediante un sistema FIA. El ICP-MS cuenta con una CID con opción de utilizar como gas en dicha cámara He o H<sub>2</sub>. El utilizar estos gases radica en la búsqueda de la eliminación de las interferencias poliatómicas que puedan existir en el análisis, en particular en una matriz compleja como es el suero humano. Para los metales de estudio las interferencias existentes son las siguientes que se muestran en la Tabla 3.

En el suero aparecerán numerosas de estas interferencias poliatómicas. Ciertamente algunas son muy poco probables como la  $^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}$  en el  $^{65}\text{Cu}$ , pero es necesario comprobar experimentalmente la influencia de utilizar como gas en la CID He para eliminar estas interferencias. Es por ello que en primer lugar se realizó el calibrado antes descrito utilizando He en la CID y sin usarlo, para comprobar si existe una necesidad real de su uso con el objetivo de minimizar las interferencias antes descritas.

En caso de usar He como gas de celda, antes de la realización del *tunning* se lleva a cabo una purga de la misma con este gas para eliminar el resto de gases de la misma y garantizar que solo existe en ella el mismo gas. Las condiciones de la purga son un flujo de He de 10 mL/min durante 20 minutos. Tras la purga se lleva a cabo el acoplamiento al FIA y llevando a cabo la medida de las disoluciones antes descritas. El flujo de He en la CID es de 3 mL/min.

**Tabla 3.** Interferencias poliatómicas que pueden aparecer en la determinación de los elementos seleccionados.

ISÓTOPO	ABUNDANCIA (%)	INTERFERENCIA
$^{27}\text{Al}$	100	$^{12}\text{C}^{15}\text{N}$ , $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ , $^{14}\text{N}_2$ , $^1\text{H}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$
$^{63}\text{Cu}$	69.1	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2$ , $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ , $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}$ , $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}$ , $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^1\text{H}$ , $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}$ , $^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}$
$^{65}\text{Cu}$	30.9	$^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}$ , $^{40}\text{Ar}^{15}\text{Mg}$ , $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^1\text{H}$ , $^{32}\text{S}^{33}\text{S}$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$ , $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}$ , $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{35}\text{Cl}$ , $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$
$^{52}\text{Cr}$	83.76	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ , $^{46}\text{Ar}^{16}\text{O}$ , $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}$ , $^{34}\text{S}^{18}\text{O}$ , $^{36}\text{S}^{16}\text{O}$ , $^{48}\text{Ar}^{14}\text{N}$ , $^{46}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}$ , $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}$
$^{53}\text{Cr}$	9.51	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ , $^{48}\text{Ar}^{15}\text{N}$ , $^{48}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$ , $^{46}\text{Ar}^{17}\text{O}$ , $^{46}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}$ , $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}$ , $^{36}\text{S}^{17}\text{O}$ , $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$
$^{55}\text{Mn}$	100	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$ , $^{39}\text{K}^{16}\text{O}$ , $^{37}\text{Cl}^{18}\text{O}$ , $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$ , $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^{36}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}$ , $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}$ , $^{23}\text{N}^{32}\text{S}$ , $^{36}\text{Ar}^{19}\text{F}$

$^{64}\text{Zn}$	48.89	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$ , $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}$ , $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^1\text{H}$ , $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}$ , $^{32}\text{S}_2$ , $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ , $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$ , $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}_2$
$^{66}\text{Zn}$	27.81	$^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}$ , $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}$ , $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ , $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2$ , $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ , $^{32}\text{S}^{34}\text{S}$ , $^{33}\text{S}_2$
$^{68}\text{Zn}$	18.57	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2$ , $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ , $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2$ , $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ , $^{34}\text{S}_2$ , $^{36}\text{Ar}^{32}\text{S}$ , $^{34}\text{S}^{17}\text{O}_2$ , $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^{18}\text{O}$ , $^{32}\text{S}^{18}\text{O}_2$ , $^{32}\text{S}^{36}\text{S}$

### 5.3.3. Optimización del ensayo para aislar la ferritina

Para llevar a cabo el ensayo de purificación de la ferritina, en primer se trabajó con un patrón de la proteína. Para ello, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de dicho patrón y se añadieron 450  $\mu\text{L}$  del anticuerpo monoclonal biotinilado. La mezcla se incubó durante 10 minutos. Tras estos 10 minutos se añadieron las micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina y se dejaron transcurrir otros 10 minutos. Es importante añadir los reactivos mezclándolos bien para asegurar la completa reacción entre los mismos.

Realizados los pasos anteriores se colocó el eppendorf en un soporte imantado, quedando las partículas magnéticas, y en consecuencia la ferritina unida a los anticuerpos presentes en las mismas, en la pared del recipiente. Se eliminó el líquido sobrenadante y se lavó tres veces con 1 mL de búffer NaCl 0.9% pH 7.4.

Tras estos tres lavados se eliminó todo líquido presente en el eppendorf y se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  0.1%. De esta manera se desnaturaliza la unión del anticuerpo a la ferritina y quedan en disolución los metales para su posterior determinación. El esquema de trabajo se muestra en la Figura 6.

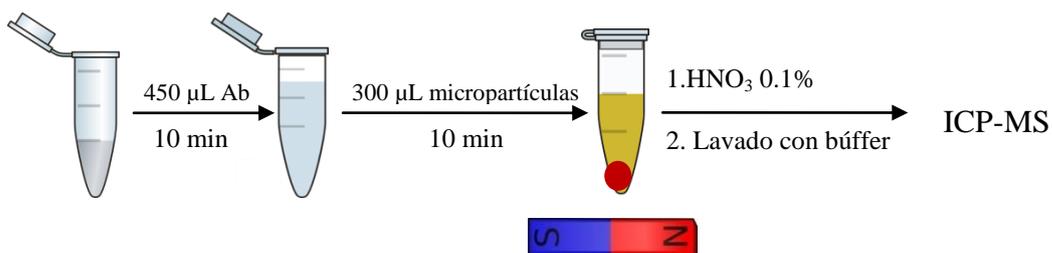
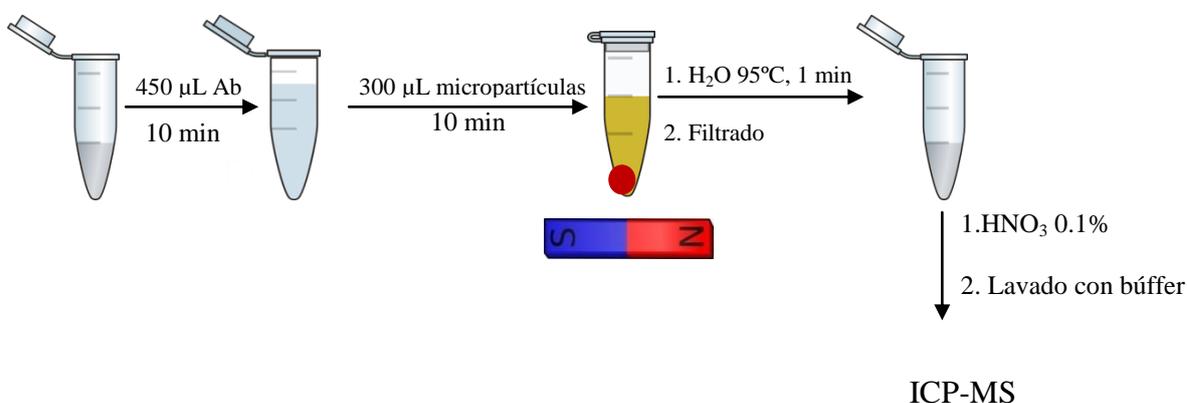


Figura 6. Esquema de preparación de la muestra para la separación de la ferritina.

Realizado el ensayo se añadió el patrón interno y se inyectó la muestra en el sistema FIA-ICP-MS, realizando como mínimo un triplicado de la medida, obteniendo así las concentraciones de los diferentes metales.

Paralelamente se llevó a cabo una evaluación de la posible separación de las micropartículas magnéticas para disminuir la posible contaminación que estas puedan aportar al análisis por ICP-MS. Para ello, aislada la ferritina y habiendo realizado los lavados antes descritos se añadió agua caliente (a 95°C) dejando la mezcla 1 minuto aproximadamente. De acuerdo con la literatura consultada,<sup>14</sup> el enlace existente entre la biotina y la estreptavidina puede romperse (reversiblemente) en estas condiciones. Por este motivo, de forma rápida, una vez roto el enlace la mezcla se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . El filtrado se recogió en otro eppendorf (previamente lavado) quedando las micropartículas metálicas retenidas en el filtro. Finalmente en este último eppendorf se añadió el patrón interno en  $\text{HNO}_3$  0.1%, de tal manera que como en el caso anterior, se desnaturalizó la proteína para liberar los metales presentes al medio, que fueron detectarlos en una siguiente etapa. El esquema de trabajo aparece recogido en la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema de preparación de la muestra para la separación de la ferritina aislando las micropartículas magnéticas.

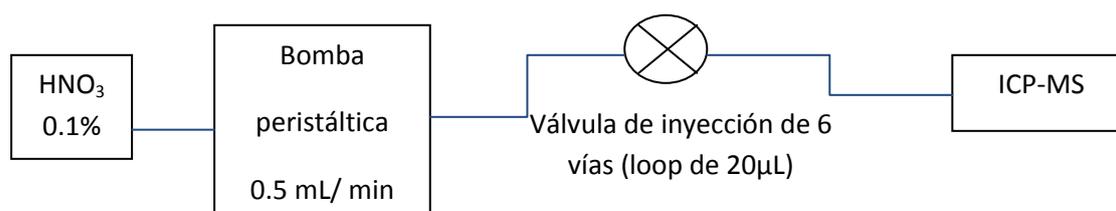
Al igual que anteriormente, filtrada la mezcla y añadido el patrón interno, se llevó a cabo el análisis en el sistema FIA para su determinación con ICP-MS.

<sup>14</sup>Holmberg, A.; Blomstergren, A.; Nord, O.; Lukacs, M.; Lundeberg, J.; Uhlén, M. *The biotin-streptavidin can be reversibly broken using water at elevated temperatures*; Electrophoresis. **2005**, 26, 501-510.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Sistema FIA-ICP-MS: optimización y características analíticas

Puesto que la finalidad del estudio propuesto es la determinación de metales en la ferritina previa purificación de dicha proteína, es posible que el volumen final donde se ha de llevar a cabo la medida sea relativamente pequeño (microlitros). Por tanto, en primer lugar será necesario optimizar un sistema de introducción de micromuestras en el ICP-MS y para ello se adopta la modalidad de análisis por inyección en flujo (FIA). Para ello se emplearon un sistema de bombas peristálticas y una válvula de inyección de peek® con la idea de minimizar la contaminación por metales que pudiera aparecer. El esquema de trabajo aparece recogido en la Figura 8.



*Figura 8. Esquema del sistema FIA-ICP-MS utilizado.*

Las primeras medidas se realizaron empleando el ICP-MS de cuadrupolo y se estudió la posibilidad de emplear o no gases de colisión en la celda para disminuir las interferencias espectrales. Para poder discernir si realmente se requería el empleo de He como gas de celda y siguiendo los pasos antes descritos en el apartado de "Procedimiento experimental" se realizó la medida de las disoluciones patrón, en primer lugar, en usencia de He en la CID. Los fiagramas obtenidos mostraron un aspecto diferente dependiendo del elemento, como el que se aprecia en las Figuras 9 y 10 correspondientes a los perfiles de  $^{27}\text{Al}$  y  $^{64}\text{Zn}$  respectivamente. En todos los casos se realizó un triplicado de la inyección de cada una de las disoluciones, incluyendo un blanco de reactivos (0.1%  $\text{HNO}_3$ ). Aunque en principio, el blanco de reactivos corresponde a la misma disolución portadora, el giro de la válvula siempre proporciona una distorsión en la señal que ha de ser tomada en cuenta en el área de los picos. Además, se inyectaron disoluciones de 2, 4, 8 y 20 ppb.

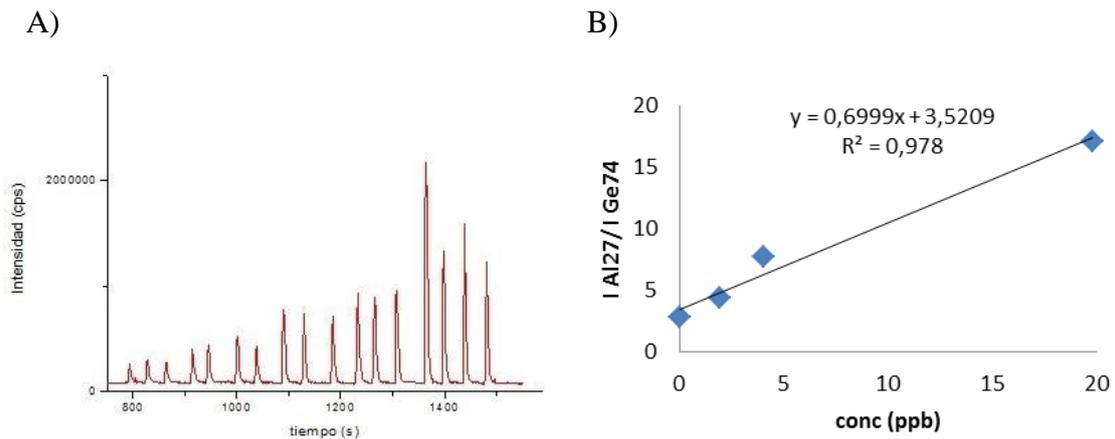


Figura 9. A) Fiagrama y B) calibrado obtenidos para el  $^{27}Al$ .

En el caso del Al, los perfiles (Fig. 9) que se observan son reproducibles y crecen linealmente con la concentración del elemento. Es necesario comentar que cada uno de los patrones de calibración contenía además 5 ppb de Ge como patrón interno para compensar pequeñas derivas de la señal durante el análisis.

Sin embargo, para otros elementos, por ejemplo el Zn, ni los fiagramas ni los calibrados resultaron adecuados como puede observarse en la Figura 10. Esto puede deberse a la presencia de este elemento como contaminante en las disoluciones o en las conexiones que complican la calibración lineal empleando este sistema.

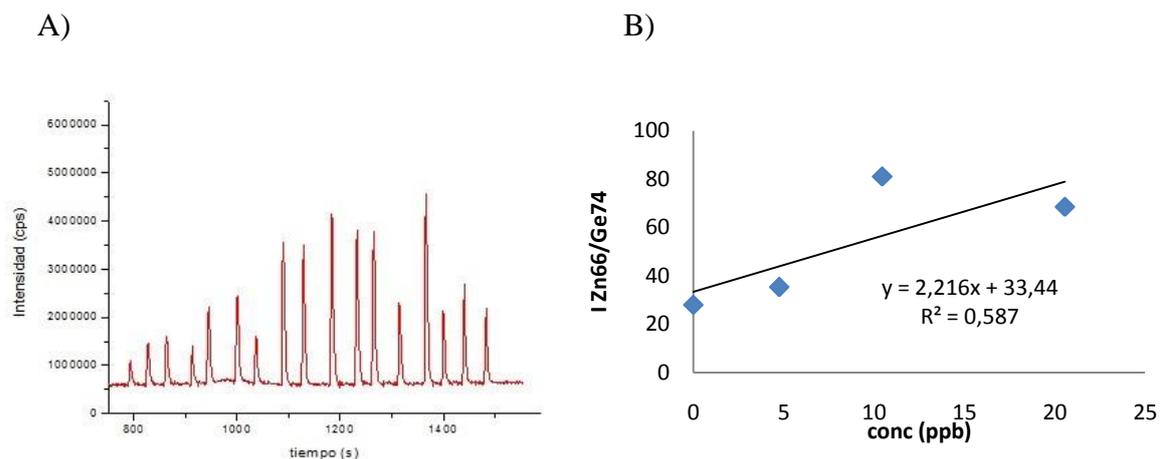


Figura 10. A) Fiagrama y B) calibrado obtenidos para  $^{64}Zn$

En este caso, los coeficientes de correlación lineal distan mucho de ser los deseados. Esta situación se observó igualmente para la medida de Cu. En cualquier

caso, los límites de detección<sup>15</sup> y las RSD obtenidas en las presentes medidas en las condiciones descritas, se aprecian en la Tabla 4:

**Tabla 4.** LOD y RSD obtenidos en los calibrados sin He en la CID.

Isótopo	LOD (ppb)	RSD (%)
<sup>27</sup> Al	0,52	3,94
<sup>52</sup> Cr	0,90	5,28
<sup>53</sup> Cr	0,09	5,04
<sup>55</sup> Mn	0,16	3,53
<sup>63</sup> Cu	1,19	12,90
<sup>65</sup> Cu	1,11	11,09
<sup>64</sup> Zn	-	-
<sup>66</sup> Zn	-	-
<sup>68</sup> Zn	-	-

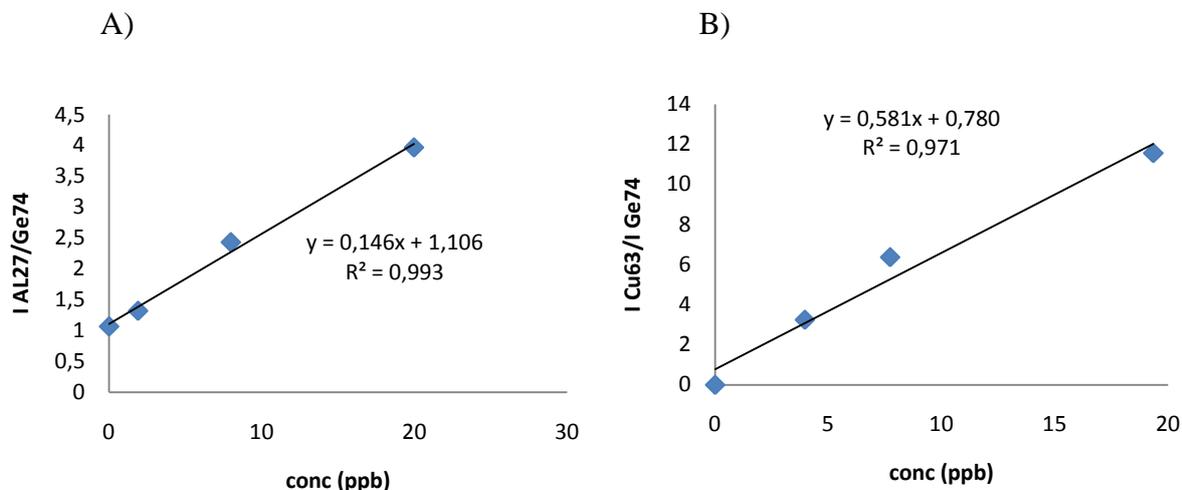
Se puede comprobar cómo los LOD fueron relativamente aceptables, con unas reproducibilidades en los pinchazos bastante elevada en el caso del Cu. Por tanto, se decidió evaluar a continuación el empleo de He como gas de celda de colisión.

Para ello, se repitieron exactamente los mismos calibrados que anteriormente pero utilizando ahora He en la CID tras su correspondiente purga, tal y como se indica en el "Procedimiento experimental". Se utilizó también el patrón interno. En este caso los calibrados obtenidos presentan mejores relaciones de linealidad para casi todos los elementos salvo para el Zn que sigue produciendo señales aleatorias y muy ruidosas. Como ejemplo se muestran en la Figura 11 los calibrados obtenidos para Al y Cu empleando 3 mL/min de He en la celda de colisión/reacción. Salvo para el caso del Zn, se vio que en el resto de elementos la regresión lineal mejoraba, mejorando los coeficientes de correlación.

El problema presentado para el Zn es común en este tipo de instrumentos de baja resolución, pues al ser un elemento muy abundante las fuentes de contaminación para el mismo son numerosas. A lo largo de todas las medidas se presentó este mismo problema, imposibilitando la cuantificación de dicho elemento con el ICP-MS de tipo

<sup>15</sup> Calculados como 3 veces la desviación estándar del fondo entre la pendiente del calibrado, quitando el patrón interno.

cuadrupolar, pues aunque en las muestras se pudo llegar a apreciar señal, en los calibrados no.



**Figura 11.** Calibrados obtenidos para A) el  $^{27}Al$  y B)  $^{63}Cu$  empleando He a 3 mL/min en la celda de colisión.

Las características analíticas en esta ocasión, en términos de límites de detección y RSD, son las que aparecen recogidas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** LOD y RSD obtenidos en los calibrados empleando He en la CID.

Isótopo	LOD (ppb)	RSD (%)
$^{27}Al$	0,05	1,16
$^{52}Cr$	0,18	2,49
$^{53}Cr$	0,03	2,40
$^{55}Mn$	0,11	1,08
$^{63}Cu$	0,25	2,92
$^{65}Cu$	0,04	4,55

Se ve como los límites de detección mejoraron en la mayoría de los isótopos, llegando incluso a mejorar en un orden de magnitud para el  $^{27}Al$ . Para el Cu el límite de detección mejoró incluso en dos órdenes de magnitud para el caso del  $^{65}Cu$ , mejorando también la regresión lineal del calibrado. En cuanto a los RSD de las medidas, mejoraron ligeramente al utilizar He en la CID.

Se comprobó así que el uso de la CID con He como gas de colisión en la misma en las condiciones descritas (flujo de 3 mL/min y una purga de 20 minutos a 10

mL/min) mejoraba la sensibilidad, regresión lineal, reproducibilidad y demás características analíticas de las medidas, pues empíricamente se probó lo que se intuía teóricamente, que era necesario eliminar las interferencias poliatómicas.

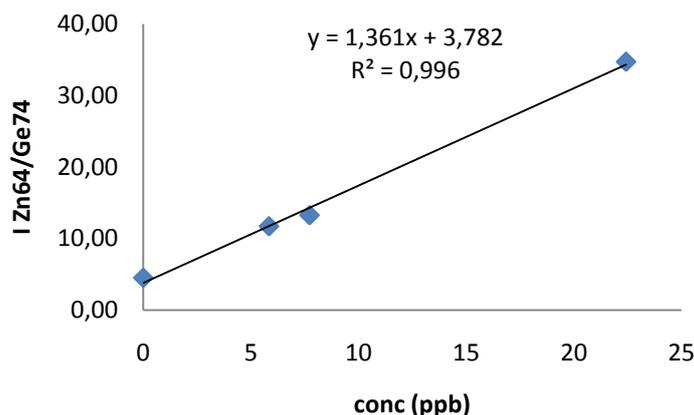
Además, se efectuó la evaluación de la mejora que proporciona el empleo de patrón interno, realizando una comparativa entre los calibrados obtenidos usando patrón interno y sin usarlo. No se representan las gráficas de los calibrados, pues son similares a las anteriormente mostradas, lo que se comparó fue el coeficiente de correlación lineal, pudiendo así discernir cómo se obtiene un mejor ajuste lineal. Esta comparación se puede ver en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Comparación entre los coeficientes de correlación lineal de los calibrados con patrón interno y sin patrón interno.

	Con patrón interno	Sin patrón interno
Isótopo	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>
<sup>27</sup> Al	0,992	0,989
<sup>52</sup> Cr	0,995	0,923
<sup>53</sup> Cr	0,996	0,939
<sup>55</sup> Mn	0,998	0,954
<sup>63</sup> Cu	0,996	0,993
<sup>65</sup> Cu	0,999	0,995

En vista a estos resultados se pudo ver cómo el hecho de utilizar un patrón interno mejora significativamente el ajuste lineal del calibrado, mejorando en todos los casos el coeficiente de regresión lineal. Es por ello que a lo largo de todo el trabajo se utilizó en todas las medidas dicho patrón (<sup>74</sup>Ge) en una concentración de 5 ppb.

Finalmente, y ante a la imposibilidad de cuantificar el Zn con el equipo de cuadrupolo previamente mencionado, se midió dicho elemento en un equipo doble enfoque trabajando en media resolución (que evita posibles interferencias poliatómicas además de proporcionar mejoras significativas en la sensibilidad instrumental). Los resultados obtenidos para uno de los isótopos del Zn con este aumento de resolución se muestran a continuación en la Figura 12, para el resto de isótopos los resultados son similares y se muestran en los Apéndices.

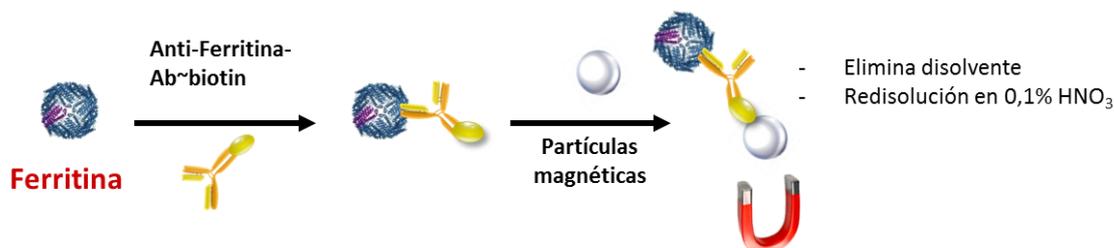


**Figura 12.** Calibrado obtenido para el  $^{64}\text{Zn}$  en un equipo ICP-MS de alta resolución Element 2.

Como se puede ver los calibrados son buenos, distinguiendo la relación lineal entre la relación de intensidades y la concentración, relación que en el equipo de baja resolución no se distinguía. Esto arrojó una importante conclusión y es que, en baja resolución no se eliminaron todas las interferencias que lleva asociado el Zn imposibilitando así su determinación y cuantificación. Al pasar a media resolución estas interferencias se pudieron ya eliminar, pudiendo cuantificar dicho elemento. Es por esta razón por la cual para cuantificar el Zn se utilizó siempre este equipo.

## 6.2. Análisis de elementos traza en patrones de ferritina

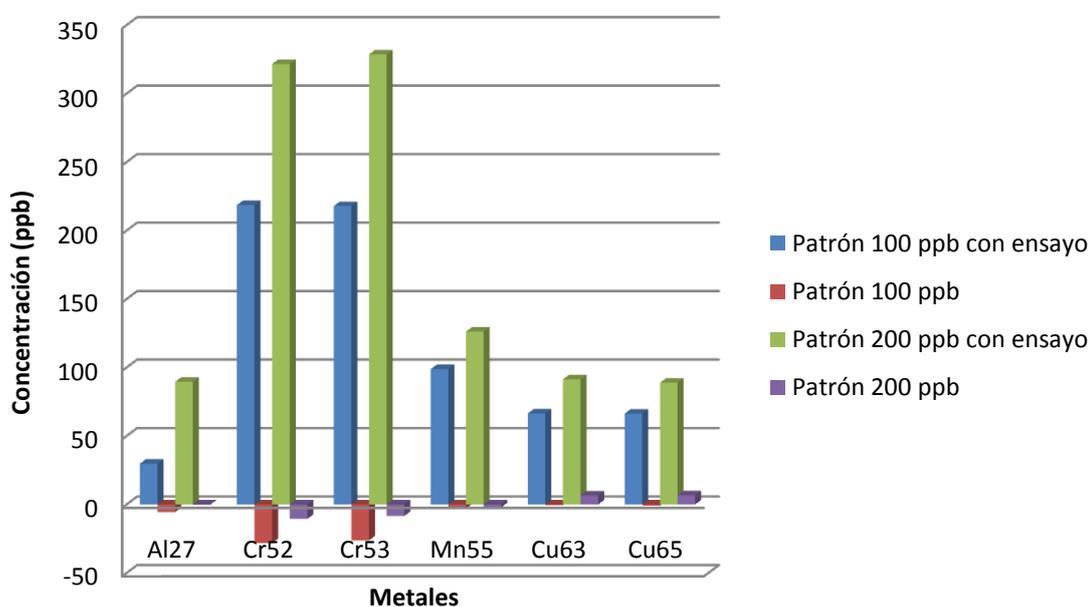
Optimizado el sistema de medida FIA-ICP-MS, se llevó a cabo el ensayo de tipo inmunológico tal y como se indicó en el apartado anterior, para aislar la ferritina del resto de componentes presentes en el suero. Primeramente se realizó el ensayo con dos patrones de ferritina de 100 y 200 ppb (según los volúmenes mostrados en los Apéndices). Como aparece recogida en la estrategia de la Figura 13, la ferritina se aisló mediante el empleo de un anticuerpo biotinilado y la precipitación del complejo con micropartículas magnéticas recubiertas de estreptavidina.



**Figura 13.** Esquema de purificación de la ferritina.

Se midió la concentración de los metales señalados en la ferritina aislada del patrón así como en el patrón directamente (sin aislar la proteína previamente) para apreciar posibles diferencias. Las disoluciones de los totales se prepararon en  $\text{HNO}_3$  0.1%, siguiendo las indicaciones mostradas en los Apéndices tras la incubación de los anticuerpos y de las partículas magnéticas y de los correspondientes lavados con buffer, se añadió  $\text{HNO}_3$  0.1% por las razones antes expuestas.

Los resultados obtenidos una vez deshechas las diluciones pertinentes, fueron los representados en la Figura 14.



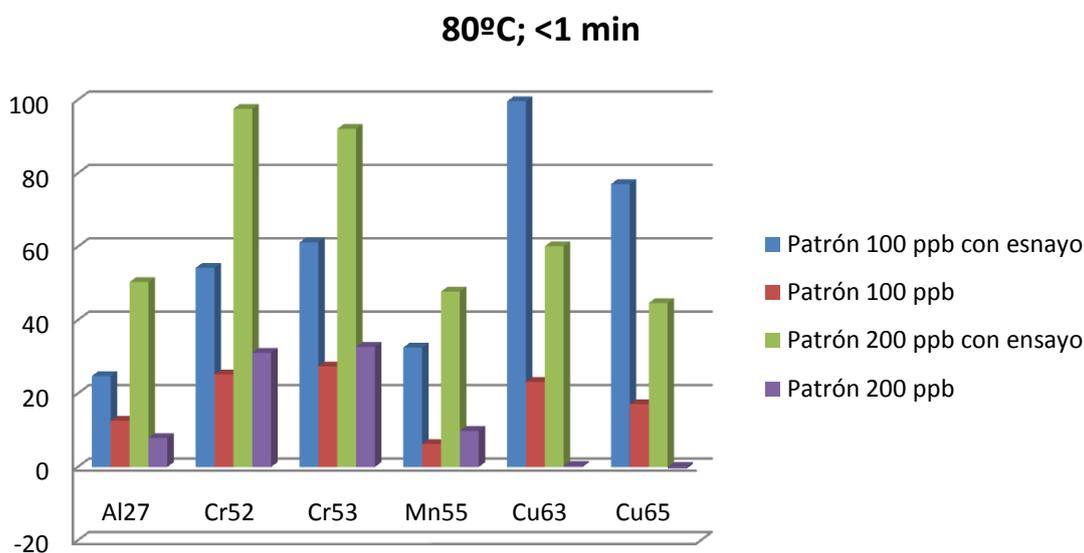
**Figura 14.** Concentraciones obtenidas directamente en los patrones de proteína de 100 y 200 ppb y después del ensayo.

Estos resultados mostraron que la concentración de metales presentes en la ferritina aislada tras el ensayo superaba con creces la concentración obtenida directamente en el patrón. Aparentemente esto es imposible, si dichos metales se encuentran presentes dentro de la estructura de la proteína. La única explicación a este hecho debía estar en que las micropartículas magnéticas del ensayo, que se disuelven parcialmente al añadir el  $\text{HNO}_3$  0.1%, permanecen en el medio aumentando los niveles de los metales y son una fuente de contaminación imposibilitando la determinación.

Con estos resultados anteriores fue obvia la necesidad de eliminar las micropartículas magnéticas del medio antes de añadir el  $\text{HNO}_3$  0.1%, pues desvirtuaban

el resultado de manera notable. Para ello se buscó romper el enlace biotina-estreptavidina una vez realizado el ensayo y los lavados, separando así la ferritina de las partículas magnéticas. Para poder llevar a cabo esta rotura se utilizó H<sub>2</sub>O milli-Q en caliente que según la literatura consultada<sup>14</sup> proporcionaba buenos resultados. Una vez roto el enlace se filtró la mezcla a través de 0.22 µm para aislar la ferritina de las bolas magnéticas, y se añadió el patrón de Ge en HNO<sub>3</sub> 0.1%, dando al medio el carácter ácido necesario para desnaturalizar la proteína.

En primer lugar se llevó este proceso a la práctica con las disoluciones patrón de ferritina de 100 y 200 ppb, utilizando H<sub>2</sub>O milli-Q a una temperatura de 80 °C y dejando menos de un minuto la mezcla. Tras el filtrado con la jeringa con filtro, los niveles de los metales fueron los representados en la Figura 15.

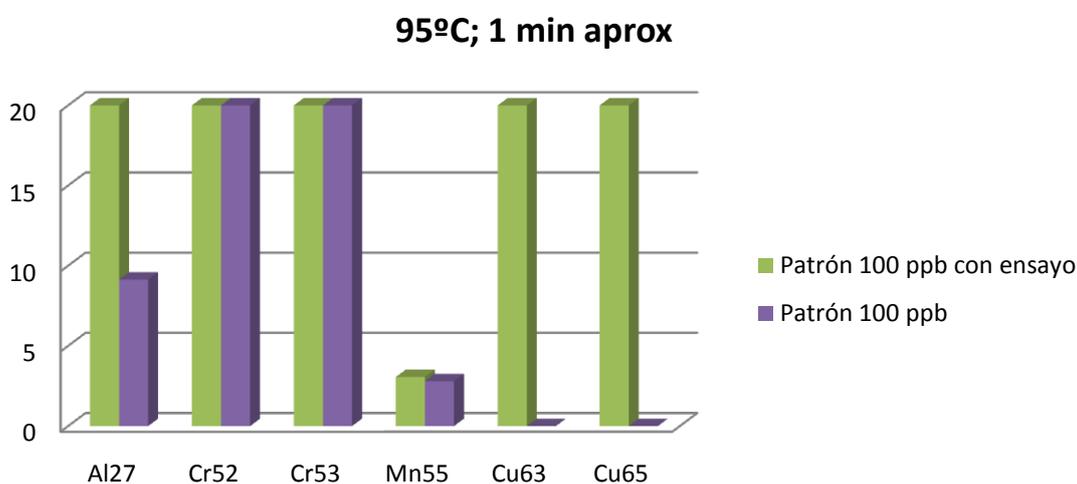


**Figura 15.** Concentraciones obtenidas con una rotura parcial del enlace biotina-estreptavidina.

Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de metales en el ensayo seguían siendo mayores que los niveles del patrón total. Estos resultados mostraban que el enlace biotina-estreptavidina no se había roto del todo. Sin embargo los niveles ya no eran tan elevados como en el caso anterior, mostrando por tanto una rotura parcial de estos enlaces en las condiciones descritas. Los niveles de los totales ya entraban dentro de los límites de detección del método. Esto se debió a que al ser medidos en diferentes días la sensibilidad del equipo varió, teniendo límites ligeramente diferentes. La sensibilidad del equipo el día de las medidas anteriores era demasiado baja además.

Ciertamente se logró romper parte de los enlaces, pero se buscaba romper la totalidad de los mismos. Por ello fue necesario optimizar esta etapa, variando los parámetros que en la misma participan, esto es la temperatura y el tiempo. Se realizó de nuevo una comparativa entre el contenido del patrón total y entre el contenido en la ferritina aislada, utilizando ahora H<sub>2</sub>O milli-Q a 95 °C y dejando la mezcla 1 minuto. En este caso las disoluciones utilizadas fueron de 50 y 100 ppb de patrón de ferritina. Al igual que anteriormente, los volúmenes usados para la preparación de los patrones y la realización de los ensayos se muestran en los Apéndices.

Los resultados obtenidos para el patrón de 100 ppb en esta ocasión se recogen en la Figura 16.



**Figura 16.** Concentraciones obtenidas con una rotura total del enlace biotina-estreptavidina.

En este caso, los niveles de los metales en el ensayo eran ya del orden de los niveles del patrón total aunque de nuevo se apreciaron niveles de los metales por debajo del límite de detección (para concentraciones de 50 ppb de patrón de ferritina que no se muestran en la Figura). Llama la atención que los niveles en el ensayo correspondiente a 100 ppb para el Cu parecían mayores que los del total. Esto en realidad no fue así, lo que ocurrió es que en la disolución del total no se vio señal alguna para estos isótopos a causa de un fondo excesivo. A lo largo de toda esta optimización se vio que el contenido en el patrón total era en algunos casos (p.e. aluminio) mayor que en la ferritina aislada. Esto era un indicio claro de que el patrón de ferritina comercial estaba contaminado por alguno de estos metales.

Se vio por lo tanto que el ensayo inmunológico debía modificarse en su etapa final para poder separar las partículas magnéticas de la ferritina. Así, tras las incubaciones y lavados, se debe añadir H<sub>2</sub>O milli-Q a una temperatura de 95 °C, dejando la muestra aproximadamente durante 1 minuto. Después se debe filtrar la mezcla y añadir el patrón en HNO<sub>3</sub> 0.1% para obtener la concentración deseada (5 ppb). En este contexto también fue preciso estudiar la recuperación o rendimiento de este último paso introducido en el ensayo para eliminar del medio las partículas magnéticas. Con esta intención se estudió el hierro presente en la ferritina aislada de un patrón de dicha proteína, relacionándolo con el presente en la disolución total, de manera que la relación de uno y otro hace una idea del rendimiento del proceso, pues al tratarse de un patrón el hierro solo se encuentra en el interior de la proteína y no en su exterior.

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración Fe tras el ensayo}}{\text{Concentración Fe total}} \times 100$$

Es por ello por lo que se llevó a cabo el ensayo con un patrón de 200 ppb de ferritina, así como una medida de dicha disolución total. Ambas fueron obtenidas a partir del stock de 500 ppb.

Los isótopos que menor fondo presentaban fueron el <sup>57</sup>Fe y el <sup>54</sup>Fe, por lo que fueron los cuantificados, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Concentraciones obtenidas en la ferritina aislada y en la disolución total.

Conc (ppb) Fe	
Ensayo	7,7 ± 0.3
Conc (ppb) deshaciendo diluciones	
Ensayo	16.5 ± 0.5
Total	18 ± 1
Recuperación	92.7 ± 1.6

De esta manera se calculó la recuperación del proceso, dividiendo la concentración obtenida para la ferritina aislada entre la obtenida en el total. El resultado aparece recogido en la Tabla 7 y muestra que la recuperación del ensayo es cuantitativa.

### 6.3. Medida de los metales en sueros de pacientes con distintos niveles de ferritina

Optimizada la determinación en el ICP-MS y el ensayo con la correspondiente rotura del enlace biotina-estreptavidina para la eliminación de las micropartículas magnéticas del medio debido a la contaminación que se generaba, se midieron los sueros reales de pacientes del HUCA de hemodiálisis recogidos en la Tabla 8.

*Tabla 8. Sueros medidos con sus correspondientes valores de ferritina.*

SUERO	Ferritina ng/mL
47292	6
42106	198
47228	199
45543	307
47088	426
45408	674
47286	704

Como se puede comprobar el contenido en ferritina en los distintos sueros es muy variado, teniendo sueros con ferritinas excesivamente bajas (6 ng/mL) y sueros con niveles elevados (704 ng/mL). En primer lugar, se llevó a cabo una cuantificación de la concentración total de los metales en estudio en estas muestras tras la realización de los calibrados con los patrones antes mencionados y la dilución (1+9) del suero que ha sido empleada en estudios previos en este tipo de muestras. Así mismo, se llevó a cabo el ensayo previamente optimizado para aislar la ferritina y la Figura 17 muestra los resultados obtenidos para la determinación total de dichos metales.

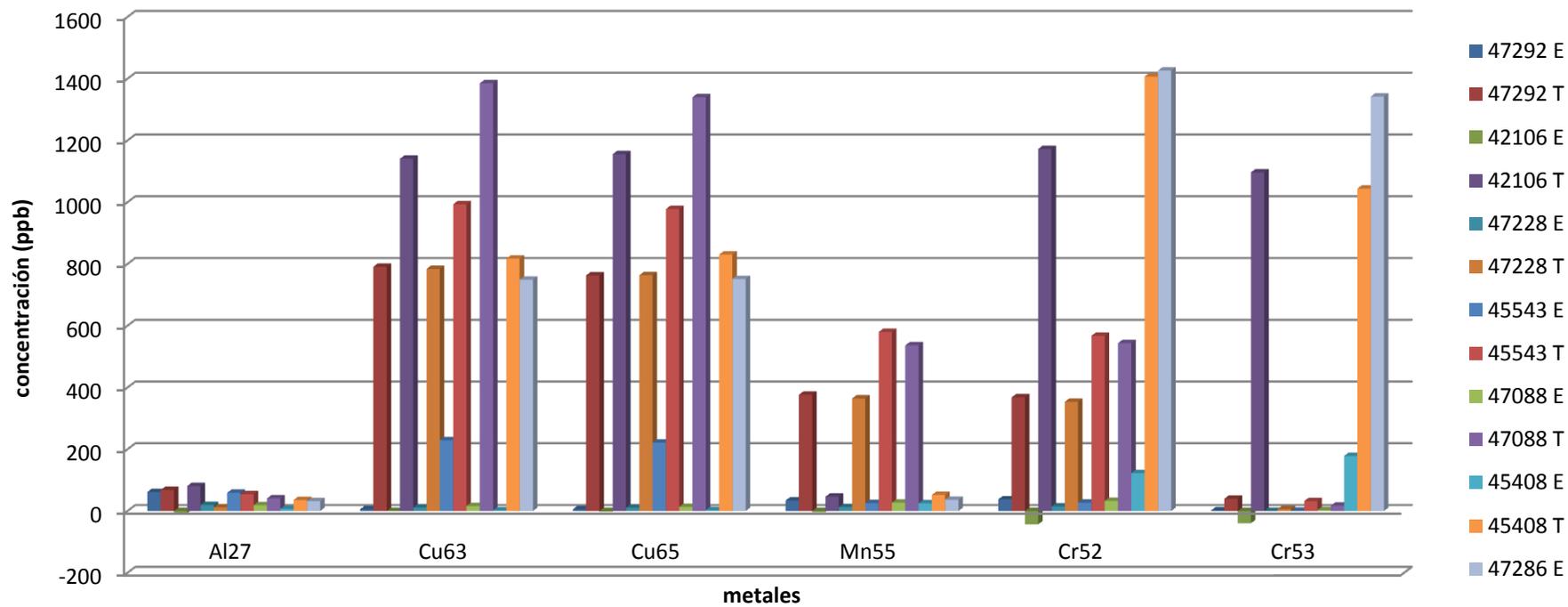
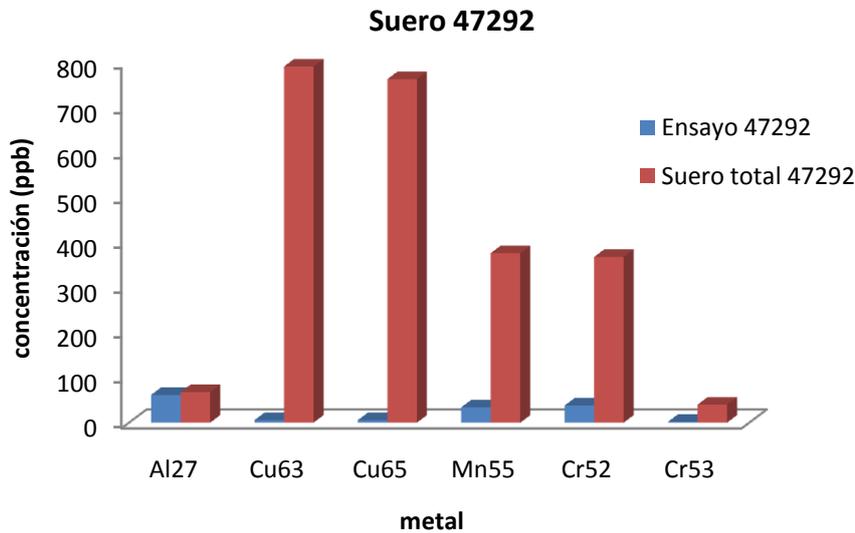


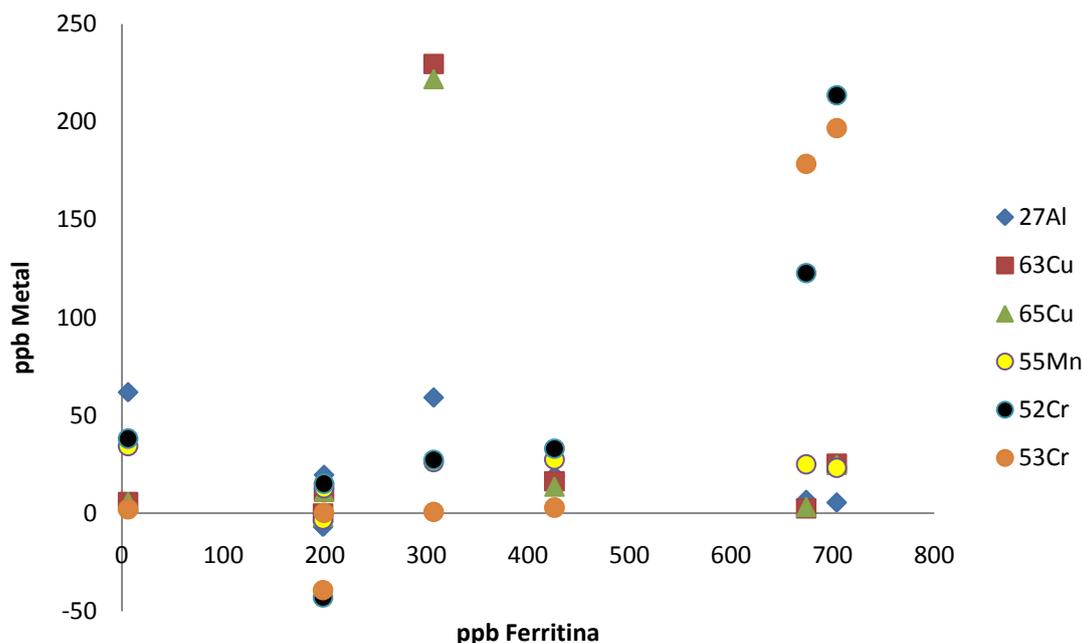
Figura 17. Concentración de los metales obtenida en el equipo 7700, comparando ensayos con totales.

Los sueros seguidos de una "E" hacen referencia al contenido en los metales en la ferritina aislada tras la realización del correspondiente ensayo. Los sueros seguidos de una "T" indican el contenido en el suero total. Representando solamente uno de los sueros, como ejemplo, en la Figura 18 (el resto de sueros tienen un aspecto similar, se adjuntan en Apéndices) se aprecia lo siguiente.



*Figura 18. Niveles de los metales en el suero 47292.*

Es interesante señalar que el contenido de cada metal en cada suero total siempre fue mayor que el contenido en la ferritina aislada, lo cual era lógico e indicaba que los ensayos se han realizado aislando de manera efectiva las partículas magnéticas de la ferritina. El hecho de que aumente la concentración de ferritina en los sueros no implica necesariamente un aumento de la concentración de los metales en la ferritina. Seguramente existan aspectos fisiológicos y otros relacionados con el paciente que hacen que se incorporen más o menos metales en dicha proteína. Sin embargo, es cierto que de manera general se aprecia una tendencia a este aumento, tanto en el suero total como en la ferritina aislada. Dicha tendencia se puede ver en la Figura 19 donde se representan los niveles de cada elemento obtenidos a través del ensayo en función de la concentración de ferritina. Esto tiene un cierto sentido, pues estudios realizados en este campo han observado que a mayor concentración de ferritina, menor concentración de hierro en las mismas, pudiendo dar lugar por lo tanto a un mayor contenido de resto de metales.



**Figura 19.** Concentraciones de los metales en función de la concentración de ferritina.

En cuanto a los niveles encontrados, por ejemplo, el Cu circulante está en consonancia con niveles previamente publicados de este metal (700-800 ng/mL). Sin embargo, el Mn se encuentra bastante elevado respecto a los valores normales (16-60 ng/mL). Además, en ciertas muestras se observó un contenido en Cr superior al que cabría esperar, pues es un elemento que lleva asociada una toxicidad y debería encontrarse en concentraciones inferiores a las obtenidas. En vista a este resultado se midió más adelante este elemento en un equipo que permita realizar medidas en media resolución, pues puede ser que la baja resolución del cuadrupolo no haya sido suficiente para eliminar las interferencias presentes en el Cr, dando lugar a estos datos llamativos.

Igualmente, como se indicó en el apartado anterior, el Zn se midió en el Thermo Element 2, empleando media resolución para eliminar interferencias poliatómicas. También se midió el Cr, pues como se indica anteriormente los resultados obtenidos para el mismo parecen demasiado altos. En este equipo se han obtenido los resultados para el Zn y para el Cr recogidos en la Tabla 9. El hecho de no tener resultados para la muestra 45543 se debe a que al realizar las correspondientes medidas y optimizaciones del ensayo y cuantificación, se agotó la muestra.

**Tabla 9.** Concentraciones de Zn y Cr obtenidas en los sueros en media resolución.

Muestra	<sup>64</sup> Zn	<sup>66</sup> Zn	<sup>52</sup> Cr	<sup>53</sup> Cr
47292E	49,3	55,7	25,3	33,6
42106E	49,8	62,2	10,7	12,2
47228E	34,4	37,5	33,8	45,3
47088E	25,2	32,1	25,5	23,9
45408E	53,9	58,2	21,9	46,3
47286E	27,9	31,5	31,6	48,9
47292T	115	144	441	480
42106T	103	124	362	306
47228T	111	145	405	443
47088T	105	124	265	239
45408T	130	153	347	392
47286T	32,6	52	108	137

Como se puede observar, en este caso los niveles de Zn se encuentran en consonancia con trabajos previamente publicados (80-120 ng/mL) sin embargo, los resultados de Cr continúan siendo anormalmente altos. Esto puede deberse a dos razones: por un lado, una contaminación de la muestra bien con las agujas de extracción de la muestra (aleaciones de Cr) o de los materiales empleados para almacenar la muestra o, por otro lado, puesto que se trata de pacientes en hemodiálisis, que haya ciertos líquidos de diálisis que presenten contaminación por este metal.

En cualquier caso, pueden observarse niveles más elevados de Zn en la ferritina de los sueros 47292E y 42106E que corresponden con los niveles más bajos de proteína mientras que los contenidos totales son muy parecidos entre muestras. De forma gráfica los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Figura 20.

### Medidas en el Element

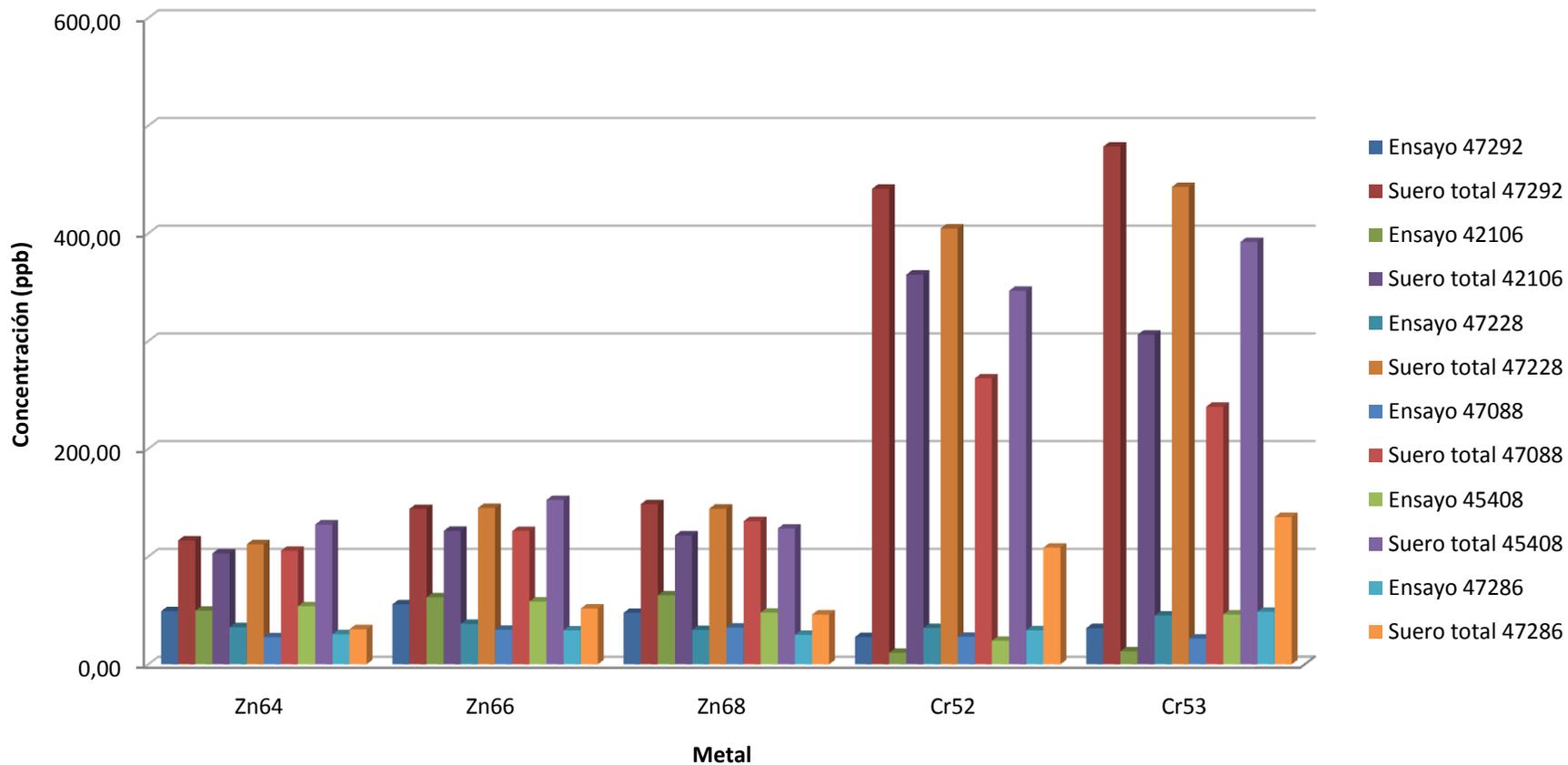
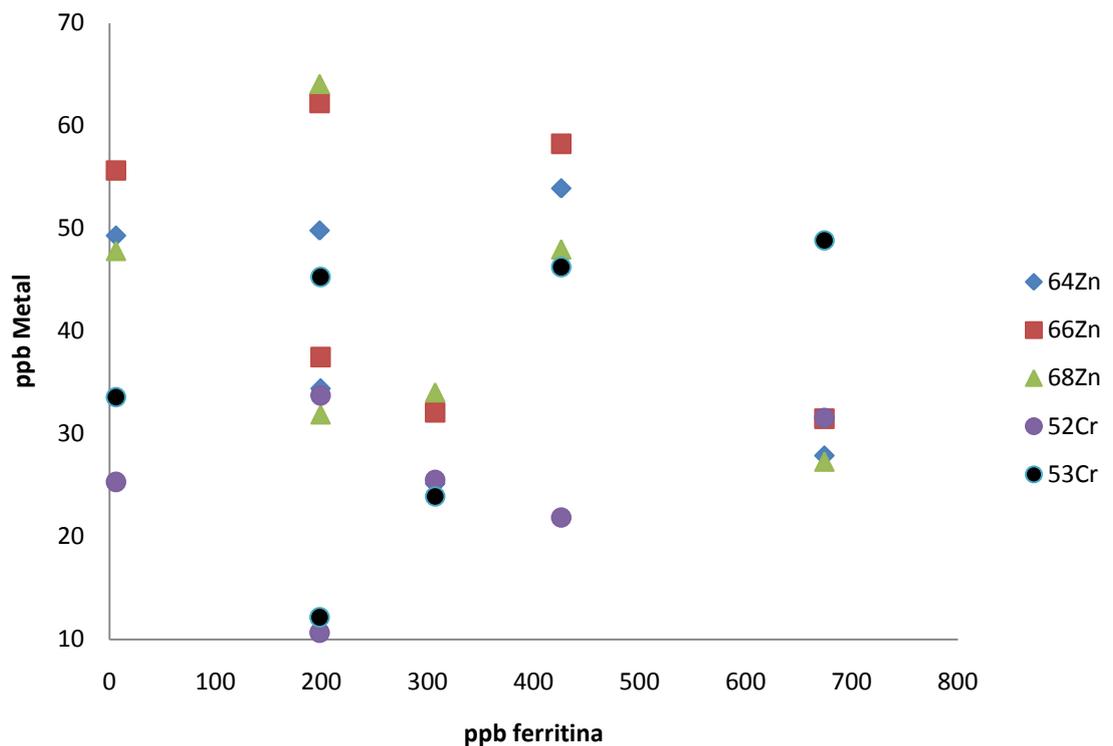


Figura 20. Concentraciones obtenidas para el Zn y el Cr en media resolución, comparando ensayos con totales.



*Figura 21. Concentraciones de Cr y Zn en función de la concentración de ferritina.*

En cuanto a la correlación de los datos obtenidos para Cr y Zn dentro de la proteína con la concentración de la misma, no se aprecia una tendencia ascendente clara. Los isótopos de Cr aumentan ligeramente, mientras que de manera general se puede ver unas concentraciones similares para el Zn. Para el Al, Cu y Mn los valores obtenidos son del mismo orden, pudiendo apreciar un ligero aumento para los isótopos del Cu.

Estos resultados siguen una cierta lógica y tienen sentido dentro de una de las hipótesis que intentan explicar porqué conforme aumenta el contenido en ferritina, disminuye el contenido de hierro en la misma.<sup>11</sup> Esta hipótesis<sup>12</sup> se sustenta en la presencia de otros metales distintos al hierro en el núcleo de dicha proteína. Según estos estudios, los metales que comúnmente sustituyen al hierro son el Al y el Zn, estando en menor concentración el Mn, Cd e incluso el Pb. El hecho de que existan diferencias en la presencia de dichos metales se cree que guarda estrecha relación con la biodisponibilidad de los mismos. Otra hipótesis barajada para la explicación de este fenómeno es la variación en subunidades H y L en la ferritina, que varían en función de la cantidad de hierro libre que exista en el medio.

La alta concentración que estos metales pueden llegar a tener en la ferritina, pone de manifiesto que esta proteína no solo actúa como un depósito de hierro, sino que también es capaz de regular la biodisponibilidad de iones como el Al o el Zn, de acuerdo con las hipótesis presentadas por Joshi et al<sup>16,17</sup>.

---

<sup>16</sup> Joshi, J. G.; Clauberg, M. *Ferritin: an iron storage protein with diverse functions*; BioFactors. **1988**, 1:207-12.

<sup>17</sup> Joshi, J. G.; Sczekan, S. R.; Fleming, J. T.; *Ferritin a general metal detoxicant*. Biol. Trace Elem. Res. **1989**, 21:105-10.

## 7. Conclusiones

---

Las principales conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo fin de máster, el cual gira en torno de la puesta a punto de un método analítico que permita la determinación de metales presentes en el núcleo metálico de la ferritina y elucidar si existe una relación entre dichos niveles y la enfermedad renal crónica, se pueden enumerar en función de los objetivos parciales mencionados en el apartado correspondiente:

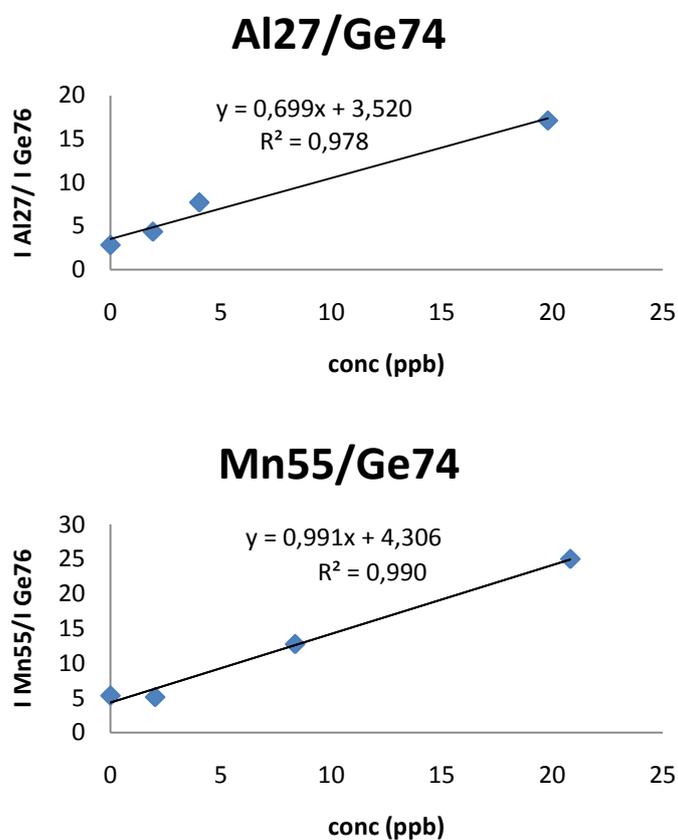
- a) Se ha conseguido desarrollar un método basado en un análisis en FIA para determinar mediante un acoplamiento con ICP-MS cinco metales (Cu, Zn, Cr, Mn y Al). Para el Cu, Mn y Al se ha podido realizar la determinación con un equipo de baja resolución, siendo necesario uno de media en el caso del Cr y especialmente del Zn, pues en baja resolución las interferencias poliatómicas imposibilitan su análisis.
- b) Basándose en la bibliografía existente se ha desarrollado y optimizado una metodología que permite aislar la ferritina del suero utilizando un anticuerpo monoclonal biotinilado específico y partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Se ha optimizado el proceso consiguiendo forzar la rotura entre los anticuerpos y las partículas magnéticas haciendo uso de agua caliente y un posterior filtrado de la mezcla. La recuperación de dicho proceso se puede considerar cuantitativa, con valores de 93%.
- c) Combinando la metodología que permite aislar la ferritina y separarla de las partículas magnéticas, con la metodología FIA-ICP-MS desarrollada se ha determinado los metales presentes en la ferritina de pacientes del HUCA de forma satisfactoria. Las determinaciones ofrecen resultados reproducibles, con buenos LOD y buenas RSD.
- d) Para la mayor parte de los elementos evaluados, no parece existir una relación entre su concentración en el suero y su concentración en el núcleo de la ferritina excepto en el caso del Zn donde los resultados muestran niveles mayores en algunos de los pacientes evaluados que deberá ser estudiado con mayor detalle en el futuro.

## 8. Apéndices

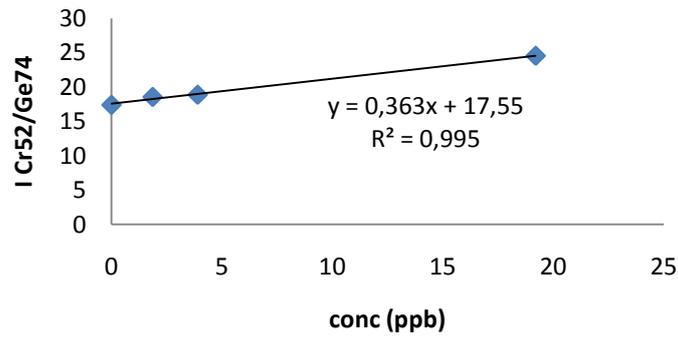
### 8.1. Calibrados obtenidos en el Agilent 7700

Los calibrados mostrados a continuación son los obtenidos en el estudio de la necesidad de utilizar He en la CID. Realmente se han obtenido muchos más, con mejores índices de correlación lineal, pero la importancia de éstos radica en que ponen de manifiesto la utilidad del uso del He en la CID.

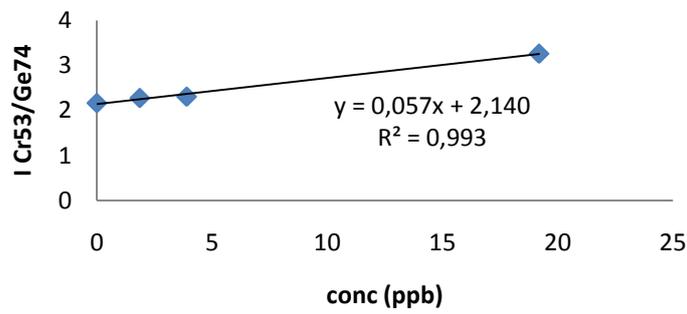
#### 8.1.1. Sin usar He en la CID



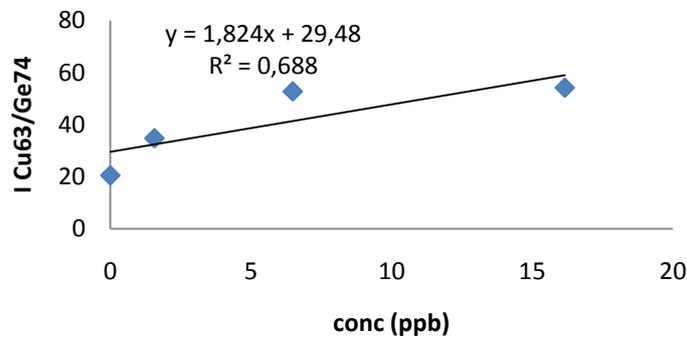
### Cr52/Ge74



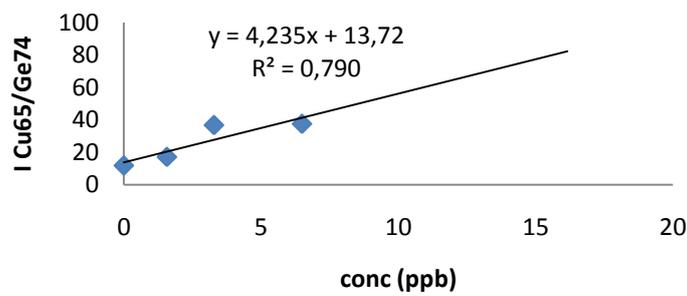
### Cr53/Ge74



### Cu63/ Ge74



### Cu65/Ge74



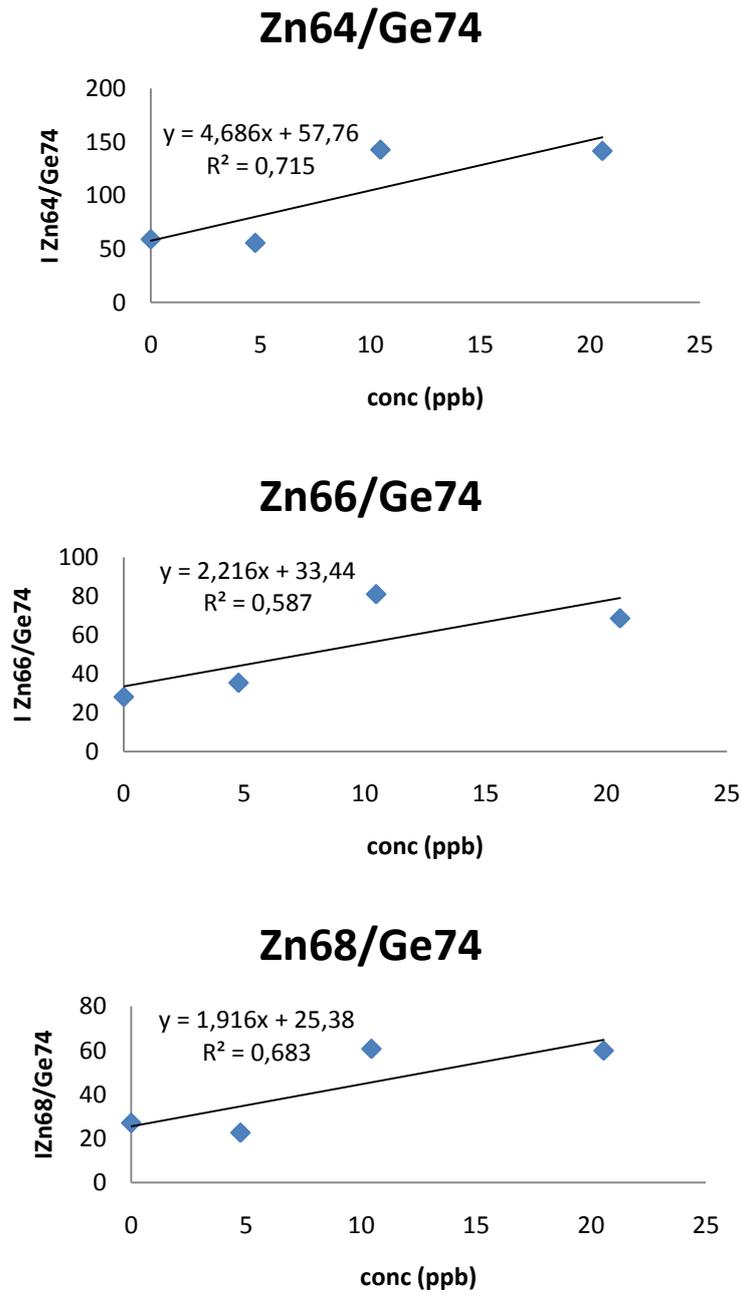
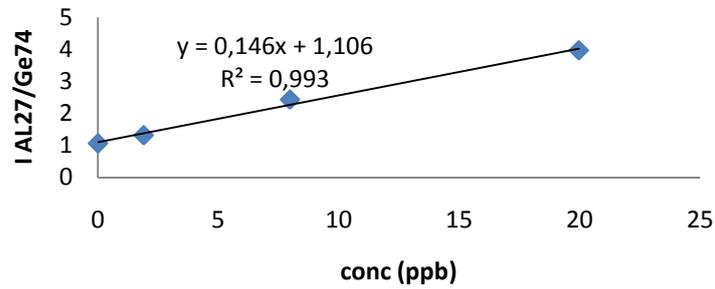


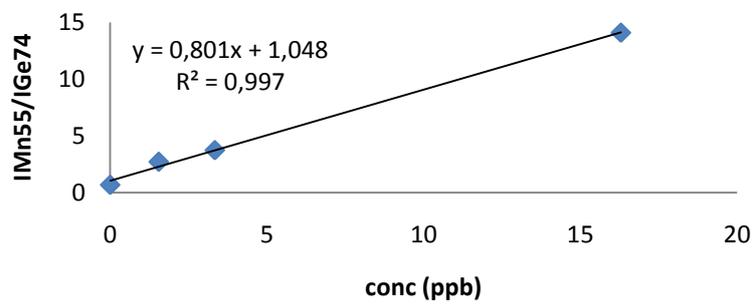
Figura 22. Calibrados obtenidos sin utilizar He en la CID.

8.1.2. Usando He en la CID

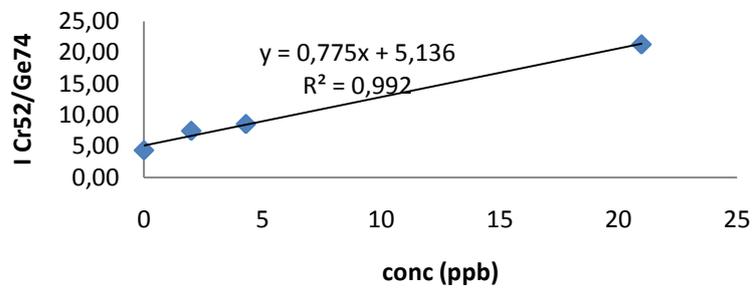
**Al27/Ge74**



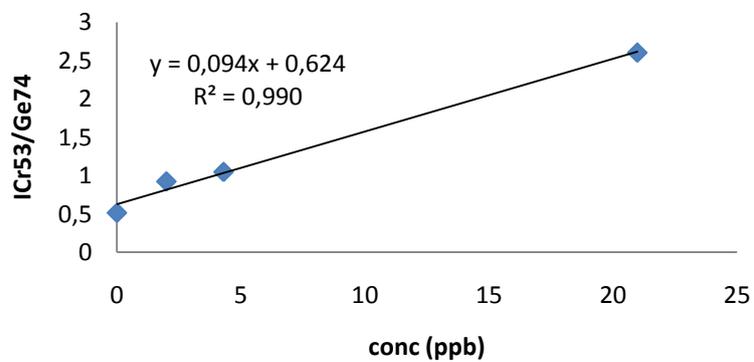
**Mn55/Ge74**



**Cr52/Ge74**



**Cr53/Ge74**



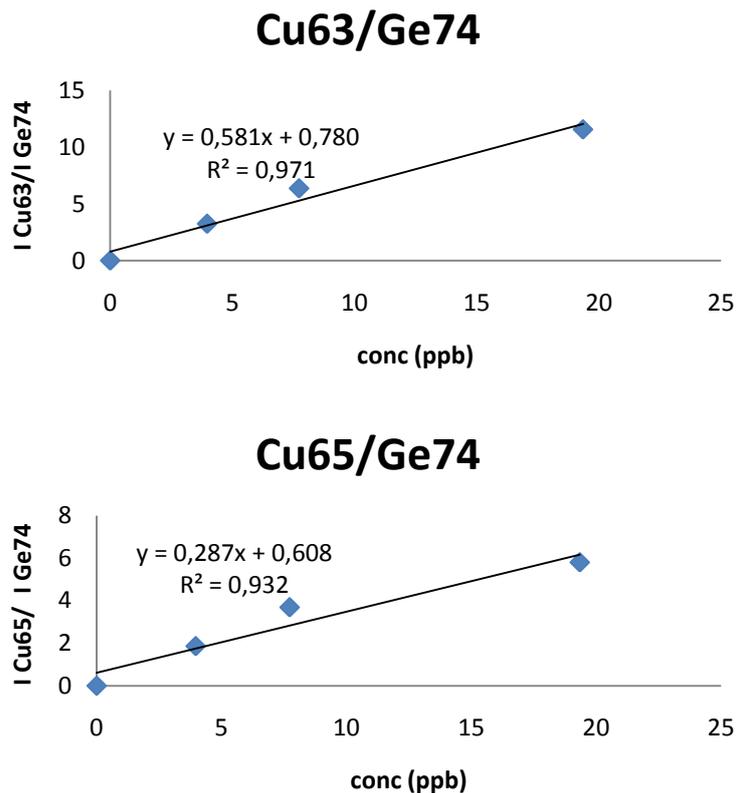
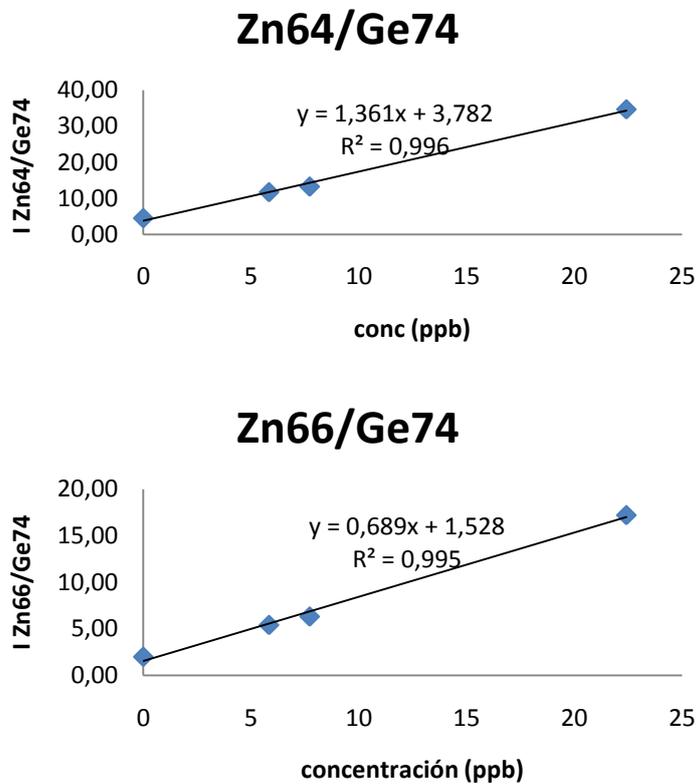
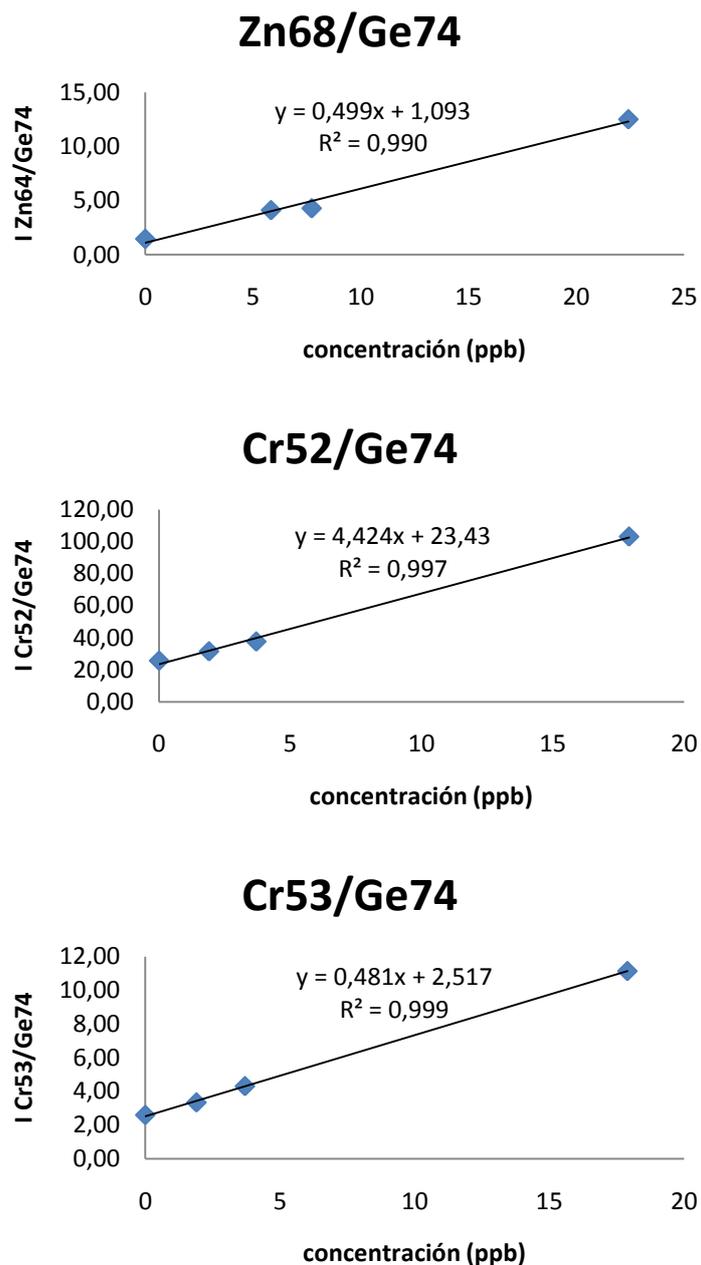


Figura 23. Calibrados obtenidos utilizando He en la CID.

8.2. Calibrados obtenidos en el ThermoElement 2





*Figura 24. Calibrados obtenidos en el Element 2.*

### 8.3. Preparación de las disoluciones de ferritina

Para la preparación de las disoluciones de 50, 100 y 200 ppb de patrón de ferritina a partir del stock de 500 ppb se han tomado los siguientes volúmenes. También se muestran los volúmenes necesarios para la realización de los correspondientes ensayos.

**Tabla 10.** Preparación disoluciones para los ensayos y los totales, de 100 y 200 ppb.

DISOLUCIONES PARA ENSAYOS		
Muestra	Vol. Ferritina patrón 500 ppb	Vol. Búffer
100 ppb	40 µL	160 µL
200 ppb	80 µL	120 µL

DISOLUCIONES PARA TOTALES			
Muestra	Vol. Ferritina patrón 500 ppb	Vol. HNO <sub>3</sub> 0,1%	Vol. Ge 100 ppb
100 ppb	40 µL	150 µL	10 µL
200 ppb	80 µL	110 µL	10 µL

**Tabla 11.** Volúmenes utilizados en la realización de los ensayos.

VOLÚMENES PARA LOS ENSAYOS				
Muestra patrón	Vol. para el ensayo	Vol. anticuerpo	Vol. partículas magn.	Vol. HNO <sub>3</sub> 0,1% final
100 ppb	50 µL de muestra de 100ppb	450 µL	300 µL	150 µL
200 ppb	50 µL de muestra de 200 ppb	450 µL	300 µL	150 µL

**Tabla 12.** Preparación disoluciones para los ensayos y los totales, de 50 y 100 ppb.

DISOLUCIONES PARA ENSAYOS		
Muestra	Vol. FERRITINA 500 ppb	Vol. Búffer
50 ppb	20 µL	180 µL
100 ppb	40 µL	160 µL

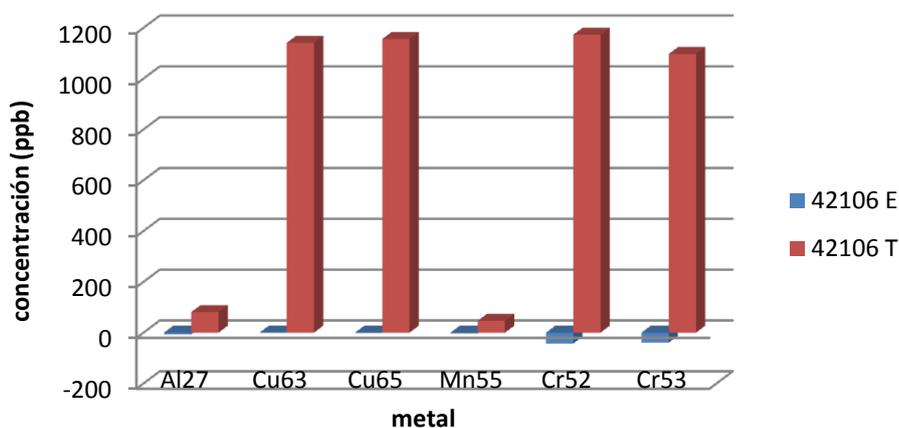
DISOLUCIONES PARA TOTALES			
Muestra	Vol. FERRITINA 500 ppb	Vol. HNO <sub>3</sub> 0,1%	Vol. Ge 100 ppb
50 ppb	20 µL	170 µL	10 µL
100 ppb	40 µL	150 µL	10 µL

**Tabla 13.** Volúmenes utilizados en la realización de los ensayos.

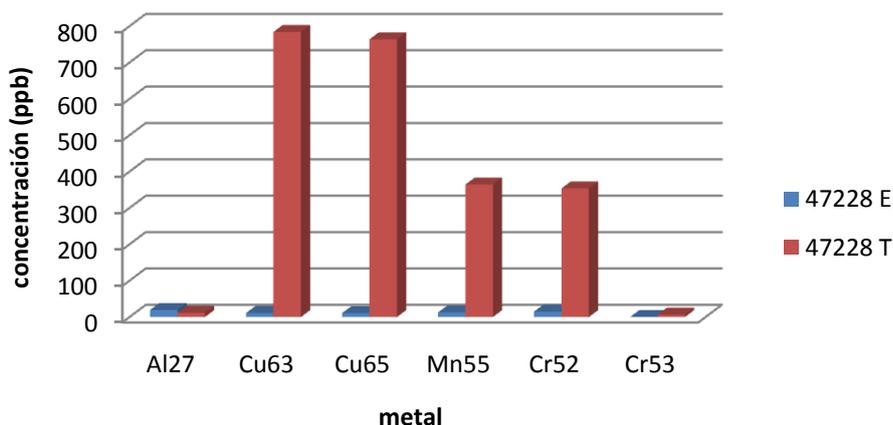
VOLÚMENES PARA LOS ENSAYOS				
Muestra patrón	Vol. para el ensayo	Vol. anticuerpo	Vol. partículas magn.	Vol. H <sub>2</sub> O final
50 ppb	50 µL de muestra de 100ppb	450 µL	300 µL	150 µL
100 ppb	50 µL de muestra de 200 ppb	450 µL	300 µL	150 µL

### 8.4. Concentraciones de metales en los diferentes sueros

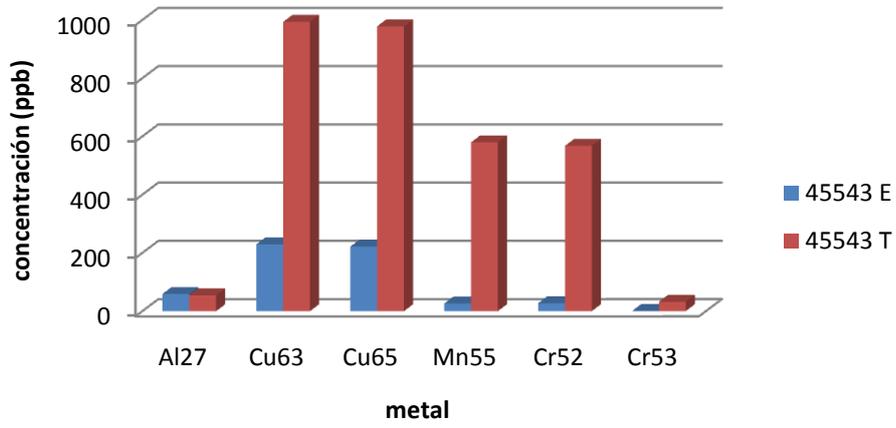
#### 42106



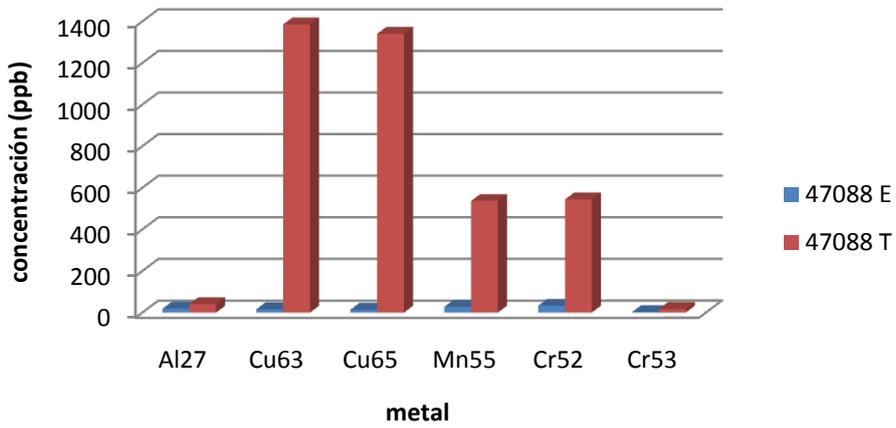
#### 47228

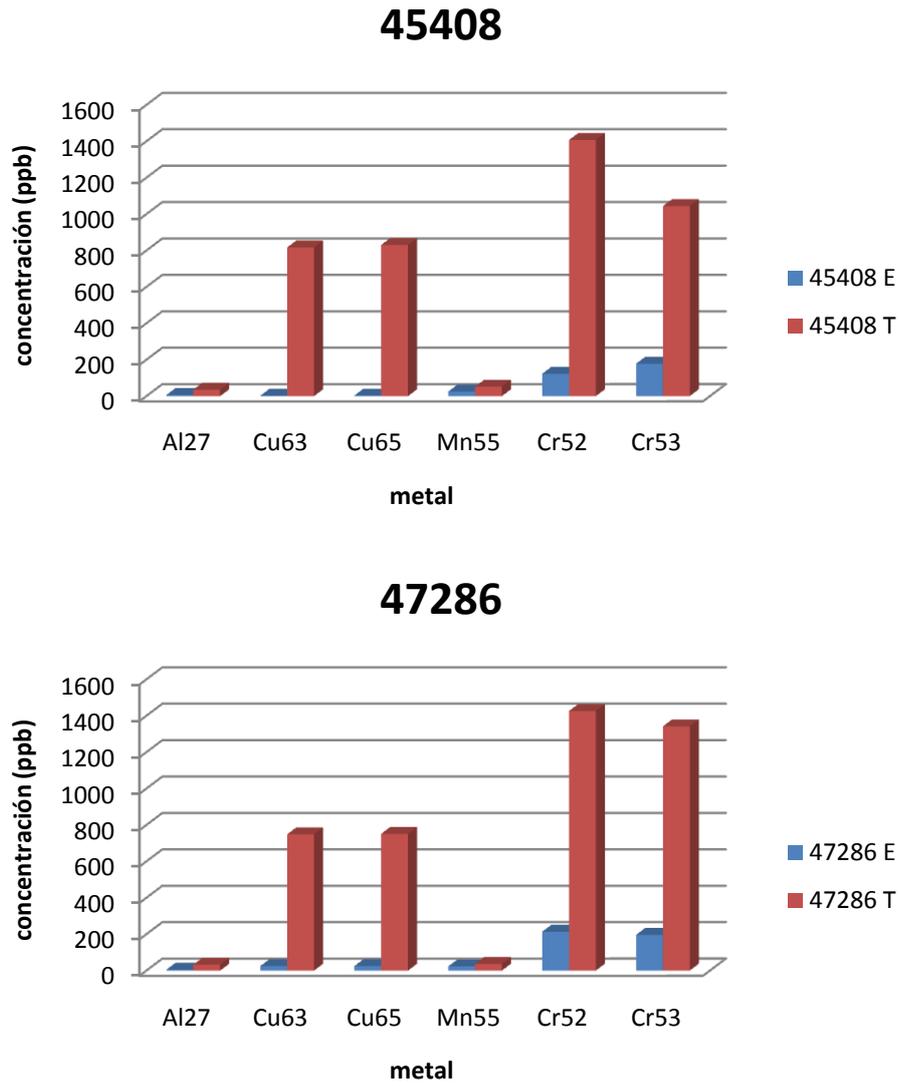


### 45543



### 47088





*Figura 25. Concentraciones de los diferentes metales en cada suero.*