

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA



FERRITINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.

IMPLICACIONES NANOBiomédicas

TESIS DOCTORAL

MARÍA BELÉN FERNÁNDEZ LÓPEZ

Granada, 30 de abril de 2009

FERRITINAS NATURALES Y SINTÉTICAS.

IMPLICACIONES NANOBIOMÉDICAS

Memoria presentada por **D^a. María Belén Fernández López** para aspirar al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Granada, Abril del 2009

María Belén Fernández López

LOS DIRECTORES DE LA MEMORIA

Dr. José Manuel Domínguez Vera.
Profesor Titular del Departamento de
Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

Dra. Natividad Gálvez Rodríguez.
Contratada Ramón y Cajal en el
Departamento de Química
Inorgánica. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

El Fe es un elemento esencial en la vida de la mayoría de los seres vivos, pero un pequeño exceso de este elemento químico es altamente tóxico para el organismo, por ello debe almacenarse de forma adecuada. La principal forma de almacenaje del Fe en los organismos es la ferritina, polipéptido constituido por 24 subunidades que se autoasocian formando una esfera hueca, de 12-13 nm de diámetro, con una cavidad central de unos 6 nm, capaz de almacenar hasta 4500 átomos de Fe en forma de un mineral tradicionalmente descrito como ferrihidrita.

La función de la ferritina es almacenar el Fe que no es requerido inmediatamente por el organismo, protegiéndolo frente a la generación de los radicales libres. El Fe(II) libre es capaz de generar, mediante la reacción de Fenton, radicales hidroxilos OH⁻, especies altamente tóxicas que provocan graves daños celulares e incluso muerte celular.

Debido a la importancia del Fe en el organismo el estudio de su metabolismo podría ayudarnos a entender el origen y desarrollo de ciertas enfermedades, especialmente aquellas en las que aparentemente los radicales libres juegan un papel principal. Sin embargo el papel del Fe en la mayoría de las enfermedades, y por tanto el de la ferritina, ha pasado desapercibido.

Recientemente, se ha considerado el daño oxidativo generado por los radicales libres como una causa primaria en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, como puede ser el Alzheimer (AD). También se ha observado que en la mayoría de estas enfermedades neurodegenerativas el Fe se acumula de forma anómala. Un hecho sorprendente que ha demostrado la relación entre la ferritina y las enfermedades neurodegenerativas, es que el mineral de Fe de la ferritina sufre ciertas modificaciones en su estructura en los enfermos de Alzheimer con respecto a individuos sanos. En concreto se observa un incremento en la concentración de una mezcla de óxidos de Fe²⁺-Fe³⁺ (ej. magnetita) en los cerebros de enfermos de Alzheimer.

Considerando todo lo anteriormente dicho podemos sugerir que un mal metabolismo de la ferritina puede estar involucrado en la generación de Fe(II) libre y por tanto en la síntesis de radicales libres capaces de provocar daños celulares mediante estrés oxidativo favoreciendo el desarrollo y progreso de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como puede ser el Alzheimer. Por tanto, el estudio de la estructura del núcleo metálico de la ferritina, podría permitirnos localizar la alteración de la ferritina y el papel que juega en el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas.

En este estudio se ha demostrado que el núcleo metálico de la ferritina está formado por distintas fases de óxidos de Fe (principalmente ferrihidrita y magnetita), cuya proporción va modificándose al eliminar progresivamente Fe de la ferritina mediante un proceso de

eliminación reductiva. Concretamente, al ir eliminando Fe de la ferritina se incrementa el porcentaje de magnetita y disminuye el de ferrihidrita. Por tanto, hemos llegado a la conclusión de que el contenido de magnetita en la ferritina está directamente relacionado con el proceso de eliminación reductivo de Fe. En condiciones de exceso de reductor y carencia de la chaperona que captura el Fe(II) se da una eliminación descontrolada de Fe. Numerosos estudios han demostrado que la homocisteína (H-Cys), un aminoácido no esencial, aparece a altas concentraciones en los enfermos de Alzheimer mientras que el ácido fólico, posible quelante de Fe(II), es deficiente. Debido a los resultados experimentales obtenidos, hemos propuesto un protocolo de diagnóstico precoz de AD, en el que asumimos que altas concentraciones de H-Cys promueven la liberación de Fe(II) que puede por una parte intervenir en la reacción de Fenton generando radicales libres y por otra reinternalizarse en la cavidad de la ferritina generando magnetita, al reaccionar con la ferrihidrita propia de la ferritina.

Por tanto, un incremento en los niveles sanguíneos de homocisteína y el incremento en la concentración de magnetita a nivel cerebral podrían usarse como un doble marcador para el diagnóstico precoz de Alzheimer. Esta hipótesis requiere un estudio *in vivo* más detallado.

La cavidad de la ferritina ha sido ampliamente usada como un nanoreactor para la síntesis de nanopartículas metálicas. Históricamente, la ferritina ha sido la primera biomolécula utilizada en la síntesis de nanopartículas metálicas, por lo que la podemos considerar una “molécula escuela”, que ha permitido establecer principios de síntesis que luego podrán ser extrapolados a otros sistemas que ofrezcan alguna posibilidad diferente a la que nos ofrece la ferritina, como pueden ser cavidades más complejas como las cápsidas víricas.

La capa polipeptídica externa de la ferritina a su vez posibilita su funcionalización química. Puesto que la superficie externa de la ferritina expone ciertos residuos de lisina hacia el exterior que permiten unir covalentemente ciertas moléculas, confiriéndole así una nueva propiedad a las nanopartículas de ferritina. Al manipular conjuntamente la superficie externa de la ferritina y el material que alberga en su interior podemos obtener una librería de nanopartículas bifuncionales solubles en agua con una gran aplicación tecnológica, tanto en nanociencia como en biomedicina. En bibliografía se pueden encontrar distintos tipos de nanopartículas metálicas sintetizadas en el interior de la ferritina mediante distintos protocolos, sin embargo muy pocos son los casos descritos sobre la funcionalización externa de la misma. La síntesis de nanopartículas con una bifuncionalidad magnético-óptica es de especial interés para estudios de biomarcaje, por ejemplo mediante MRI-OI.

A lo largo de esta tesis se han unido de forma covalente a la superficie externa de la ferritina colorantes orgánicos, fluoróforos, y los denominados quantum dots (QDs). El marcate de la ferritina con colorantes orgánicos nos permite cambiar su color y con los fluoróforos podemos modificar sus propiedades ópticas. Al incubar la proteína con dos fluoróforos de la familia Alexa Flúor (AF350 y AF430), hemos obtenido un fenómeno

denominado FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), en este fenómeno la longitud de onda de emisión del fluoróforo dador (a 350 nm) coincide con la de excitación del aceptor, permitiéndonos obtener una única emisión del fluoróforo aceptor (a 430 nm) cuando irradiamos únicamente al dador. El fenómeno de FRET requiere la presencia de ambos fluoróforos (AF350 y AF430) en la misma subunidad de la ferritina a una distancia suficientemente corta como para que pueda darse la transferencia de energía.

El éxito obtenido en la funcionalización de la ferritina en su superficie externa nos abre la posibilidad de “decorar” partículas de ferritina nativas y artificiales (en las que se ha modificado su material interno) con distintas finalidades. Siguiendo esta dinámica de síntesis de nanoestructuras bifuncionales magnético-fluorescentes, un paso más ambicioso ha sido funcionalizar la capa externa de la ferritina con nanopartículas metálicas del tipo quantum dot (QD), ya que las nanopartículas de semiconductores ofrecen numerosas ventajas frente a los fluoróforos orgánicos tradicionales, debido a su alta fotoestabilidad, alto rendimiento cuántico, estrecha emisión, etc. Los conjugados QD-MFt tienen una gran aplicación como sensores ópticos y magnéticos en MRI-OI (magnetic resonance imaging-optical imaging).

Tres QDs de CdSe/ZnS (core/shell) con emisiones a 525-, 655-, y 800 nm (QD525, QD655 y QD800 respectivamente) se unieron de forma covalente a nanopartículas de ferritina con un contenido de 200 átomos de Fe en forma de magnetita predominantemente (MFt). Mediante estudios de TEM, (HAADF-STEM y EELS) se demostró que estas nanoestructuras se organizaban en forma de dímeros MFt-QD. Las propiedades magnéticas y fluorescentes de cada uno de los precursores de estas nanoestructuras se mantienen en el bioconjugado.

El par MFt-QD800 se ha probado en ensayos *in vivo* como un posible agente bimodal MRI-OI. Hay que recordar que el QD800 emite cercano al infrarrojo lo cual es esencial para las aplicaciones biomédicas, puesto que permite penetrar en los tejidos.

La medida de la relajación transversal, r_2 , del par MFt-QD800 es un parámetro crucial para evaluar la potencialidad de dicha nanoestructura como un posible agente de contraste en MRI. El valor obtenido para r_2 fue extremadamente bajo, $\sim 6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que indica claramente que se requiere un incremento en los valores de magnetización espontánea de la partícula de ferritina. Sin embargo los resultados de OI indican que el bioconjugado, MFt-QD800, presenta una alta vida media en sangre y se dirige de forma preferencial a los pulmones. Esto indica que dicha nanoestructura no es rápidamente detectada por el sistema inmunitario y persiste el tiempo suficiente en la sangre como para reaccionar de forma específica con ciertos tejidos. Por tanto podemos concluir que las nanoestructuras MFt-QD800 representan una vía prometedora para la preparación de agentes bimodales MRI-OI con altos valores de vida media en sangre, que en un futuro pueden ser vehiculados de forma específica a un tejido concreto.