

# ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y EFECTO A METALES PESADOS: ACTIVIDAD CATALASA EN ERITROCITOS



NOMBRE ALUMNO:

FECHA:

3º GRADO EN BIOQUÍMICA

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los metales forman parte de la composición de la corteza terrestre por lo que se encuentran de forma natural y ubicua en el medio ambiente. La meteorización de las rocas, la lixiviación de suelos o las erupciones volcánicas pueden lograr que estos metales queden disponibles en la biosfera. Sin embargo, las actividades humanas, especialmente tras la Revolución Industrial, han supuesto un aumento de la redistribución de los metales en los distintos compartimentos del medio, siendo el plomo y el zinc los metales de mayor emisión. Desde el punto de vista toxicológico y de salud pública, el cadmio y el plomo junto con el mercurio son los metales más peligrosos.

Entre los mecanismos de acción tóxica de los metales, encontramos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante distintos mecanismos. Cuando la producción de ROS sobrepasa la capacidad antioxidante del organismo, se produce estrés oxidativo que es la causa primaria de peroxidación lipídica, alteraciones de la fluidez de membrana, daño en la cadena de ADN, alteraciones en las enzimas antioxidantes y finalmente carcinogénesis. Para combatir estos efectos, los organismos aerobios poseen mecanismos antioxidantes dependientes de enzimas como las peroxidasas, el sistema de glutatión o las catalasas.

Las catalasas son enzimas que catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando hierro o manganeso como cofactor. Estas proteínas se localizan en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariotas.

Un biomarcador se define como cualquier cambio a nivel bioquímico, molecular, celular, histológico, morfológico o de comportamiento inducido en los seres vivos como consecuencia de la exposición a un agente xenobiótico. En el caso de la exposición a metales, la medición de la actividad de distintas enzimas antioxidantes, incluida la catalasa, puede ser utilizada como biomarcador de exposición y efecto en distintas especies de seres vivos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- 1 ml de sangre
- NaCl 0,9%
- Tampón fosfato-K 0,05 M pH 7,0.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,030 M
- Centrífuga
- Espectrofotómetro de UV

### *Preparación de la muestra*

- Centrifugar 1 ml de sangre heparinizada (10,000 g 5 min a 6°C)
- Separar el plasma (será 0,5 ml aprox) y conservar la fracción celular (pellet)
- Lavar el pellet con solución salina para eliminar restos de plasma (añadir 0,5 ml de solución salina, se vuelve a centrifugar (10,000 g 5 min a 6°C), y se retira el sobrenadante.
- Homogeneizar el pellet con NaCl 0,9% en proporción 1:10 (1 g en 10 ml). Agitar en vórtex.
- Preparar solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,030 M.
- En un eppendorf añadir 0,5 ml de homogeneizado. Centrifugar a 4 grados, 15 min, 10000 g.
- Tomar 20 µl de sobrenadante y añadir 180 µl de tampón fosfato-K 0,05 M pH 7,0.

*Parámetros espectrofotómetro:*

- Seleccionar 240 nm en espectrofotómetro para medición.
- Modo cinético.

*Medición incremento absorbancia por minuto:*

- Hacer autocero con dos cubetas con agua milli Q
- Medir 3 blancos (cubetas vidrio): 1900 µl de tampón + 1000 µl de solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl del tampón que se usó para homogeneizar el pellet
- Medir muestras: 1900 µl de tampón + 1000 µl de solución H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl muestra diluida (se añaden al final justo antes de medir porque comienza la reacción)
- Enjuagar cubetas entre muestras con agua destilada.