

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

*Trabajo Fin de Máster*

**DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA EN  
FLUIDOS BIOLÓGICOS: POSIBLE BIOMARCADOR DE  
GLAUCOMA**

Raquel González de Vega

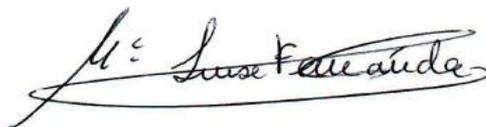
Julio 2012, Oviedo

**MARIA LUISA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ**, Profesora titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química, Universidad de Oviedo,

**CERTIFICA:**

Que el presente trabajo titulado “Determinación de Glutación Peroxidasa en fluidos biológicos: posible biomarcador del glaucoma” ha sido realizado por la Licenciada Raquel González de Vega en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección, constituyendo el Proyecto Fin de Máster de la interesada, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio 2012

A handwritten signature in black ink, reading "M<sup>c</sup> Luisa Fernández Sánchez". The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish at the bottom.

Fdo. María Luisa Fernández Sánchez

---

<b>A. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
A.1. ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA ESENCIALES.....	3
A.2. SELENIO.....	5
A.2.1 <i>Selenoproteínas</i> .....	5
A.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL SELENIO.....	8
A.3.1 <i>Mecanismos celulares de defensa frente a las ROS</i> .....	8
A.3.2 <i>Estrés oxidativo</i> .....	9
A.3.3 <i>Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo</i> .....	10
A.4. GLAUCOMA Y DEGENERACIÓN MACULAR.....	11
A.4.1 <i>El glaucoma como neuropatía óptica</i> .....	11
A.4.2. <i>Enfermedades oculares y estrés oxidativo</i> .....	12
A.5. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEINAS MEDIANTE TÉCNICAS.....	13
A.6.OBJETIVOS.....	16
<b>B. EXPERIMENTAL</b> .....	17
B.1 REACTIVOS, MATERIALES Y MUESTRAS.....	17
B.2 INSTRUMENTACIÓN.....	18
B.2.1 <i>Espectrómetro de masa elemental. ICP-(ORC)MS</i> .....	18
B.2.2. <i>Instrumentación cromatográfica: sistema HPLC y columnas</i> .....	20
B.2.3. <i>Separación de selenoproteínas en suero mediante HPLC-ICPMS</i> .....	20
B.2.4 <i>Condiciones de operación</i> .....	22
B.3. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LAS SELENOPROTEÍNAS.....	24
B.4.SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA EN MUESTRAS DE SUERO .....	27
B.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	32
<b>C. CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>D. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40

## A. INTRODUCCIÓN

### A.1. ELEMENTOS TRAZA Y ULTRATRAZA ESENCIALES

La importancia de elementos traza (mg/L) y ultratrazas ( $\mu\text{g/L}$ ) en Biología y Medicina es indiscutible. A pesar de su aparente insignificancia cuantitativa, hoy está bien demostrado que dichos elementos juegan un papel primordial en conocidas funciones vitales de sistemas biológicos. Concretamente en los humanos se consideran esenciales el Fe, Zn, Cu, Se, I, Cr y Co, pues su deficiencia ocasiona trastornos de funciones biológicas bien determinadas. A estos elementos esenciales, cuya deficiencia en el hombre ha sido ampliamente estudiada, se les denomina también oligoelementos<sup>1</sup>

Se considera que un elemento traza es “esencial” si:

- a) Su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, las cuales pueden revertir cuando el elemento recupera su nivel fisiológico óptimo.
- b) El organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin ese elemento.
- c) El elemento posee una influencia directa sobre el organismo y está involucrado en sus procesos metabólicos.
- d) El efecto concreto de un elemento esencial no puede ser logrado totalmente por ningún otro elemento.

El carácter esencial de un oligoelemento conduce inmediatamente a relacionarlo con el concepto de requerimiento. Es decir, se ha de establecer una cantidad mínima del citado oligoelemento para el buen funcionamiento del organismo. Por debajo de ese nivel la funcionalidad del organismo puede verse seriamente afectada y esta un exceso del elemento, comienza a generar efectos tóxicos y finalmente, puede llegar a ser letal. De este modo, existe un rango de concentración (ventana biológica) para cada oligoelemento donde la respuesta fisiológica es óptima<sup>2</sup> y fuera del cual se observan efectos carenciales o tóxicos. En la Figura B.1, se muestra gráficamente como varía la funcionalidad de estos elementos (línea verde) con la concentración de los mismos.

Además de los elementos traza esenciales en los organismos vivos, pueden existir otros elementos a nivel de traza y ultratrazas (p.ej. Cd, Hg, Al y Pb) sin una función fisiológica conocida hasta la fecha, pudiendo actuar como tóxicos en el organismo ya a muy bajas concentraciones ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (ver Figura b.1, línea roja).

Finalmente, existen elementos que se suministran con fines terapéuticos (p.ej. Au, Pt, Li, etc.) y cuya concentración en el organismo debe controlarse igualmente.

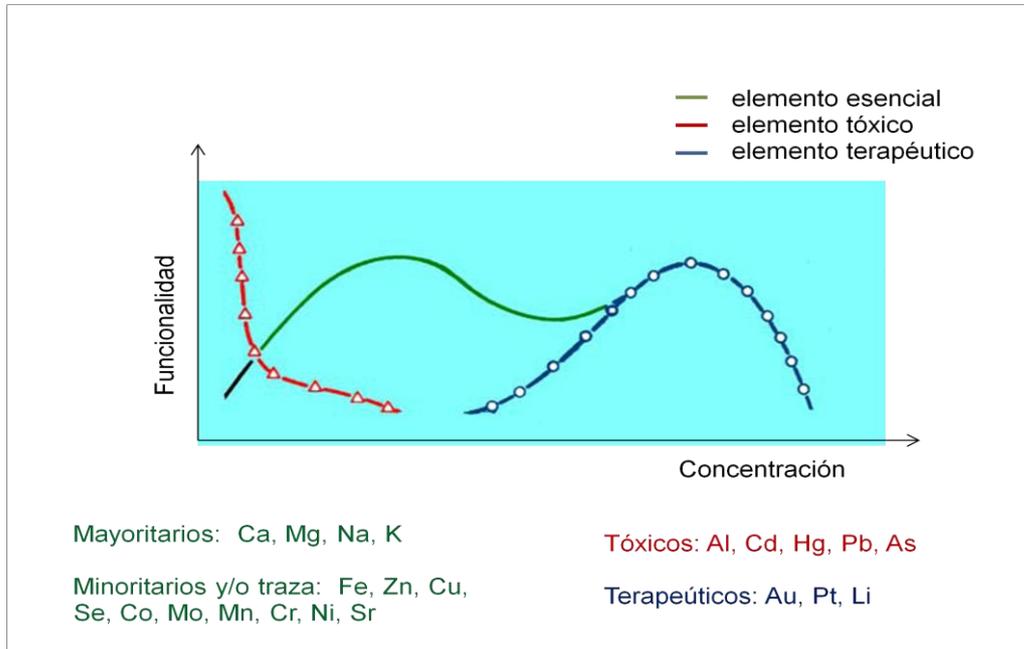


Figura a.1. Relación entre la dosis ingerida o disponible de un elemento esencial, tóxico o terapéutico y la funcionalidad del organismo

De todos los elementos esenciales citados, el selenio es el objeto de estudio de la presente memoria. Por eso se detallará el papel que desempeña dicho elemento en el organismo humano.

## A.2. SELENIO

El selenio es un metaloide que puede estar presente en la naturaleza en formas inorgánicas (p. e. la forma metálica  $\text{Se}^0$  y de oxoaniones selenito y selenato) así como en formas orgánicas (p. e. selenoaminoácidos, como la selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet)). Se ha demostrado que el selenio juega un papel esencial para el hombre ya que forma parte de las denominadas selenoproteínas.

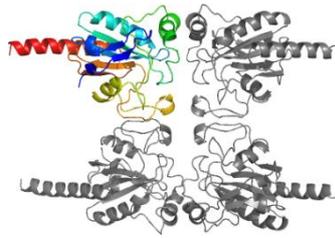
Además, el selenio se puede encontrar en proteínas por incorporación inespecífica de selenometionina, que sustituye a los residuos de metionina, y que no son consideradas selenoproteínas.

### A.2.1 Selenoproteínas

El selenio forma parte de las selenoproteínas en las que se incorpora como el aminoácido selenocisteína (SeCys)<sup>3</sup>. En células y tejidos humanos se han identificado más de 25 selenoproteínas diferentes conteniendo selenocisteína<sup>4</sup>, mostrándose en la Figura a.2.2 alguna de ellas, y su posible función. La glutatión peroxidasa (GSHPx) es la selenoproteína más conocida.

En los mamíferos se han descrito cinco isoformas de la GPx que se expresan en tejidos específicos<sup>5</sup>: GPx intracelular o citosólica (GPx1), GPx gastrointestinal (GPx2), GPx extracelular o plasmática (GPx3) y una GPx con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx4).

La GPx3, es la única enzima extracelular de la familia de las GPx. Esta proteína homotetramérica glicosilada del tamaño de 90-100kDa, es producida en el interior de las células dentro del epitelio tubular proximal y las células parietales de la cápsula de Bowman del riñón, y luego secretada al plasma, donde constituye alrededor del 15-20% del selenio total. Tanto la GPx3 como el mRNA se expresan en numerosos tejidos, en particular en el corazón y en la glándula tiroides, donde esta enzima juega un papel importante debido a su capacidad antioxidante. El residuo de Secys en la GPx3 está localizado en la posición 73 de la secuencia del aminoácido.



**Figura a.2.1** GPx3

Como una proteína secretada, GPx3 se propone como un captador importante de especies de oxígeno reactivas (ROS) en el espacio extracelular y dentro de la vasculatura.

Otras selenoproteínas que contienen selenio y han sido identificadas son, por ejemplo, la selenoproteína P (Se-P), la selenoproteína W, la tiorredoxín reductasa y la selenoproteína de la cápsula. De estas, la selenoproteína P es una glicoproteína extracelular muy abundante, conteniendo entre el 60-80% del Se del plasma<sup>6</sup>. Comparada con el resto de selenoproteínas conocidas, es inusual porque tiene 10 residuos de selenocisteína por molécula. La función de la Se-P permanece incierta, aunque se pensó originalmente que tenía una función de transporte, distribuyendo el Se a los diferentes órganos por la circulación. Actualmente se le asocia una actividad antioxidante extracelular.

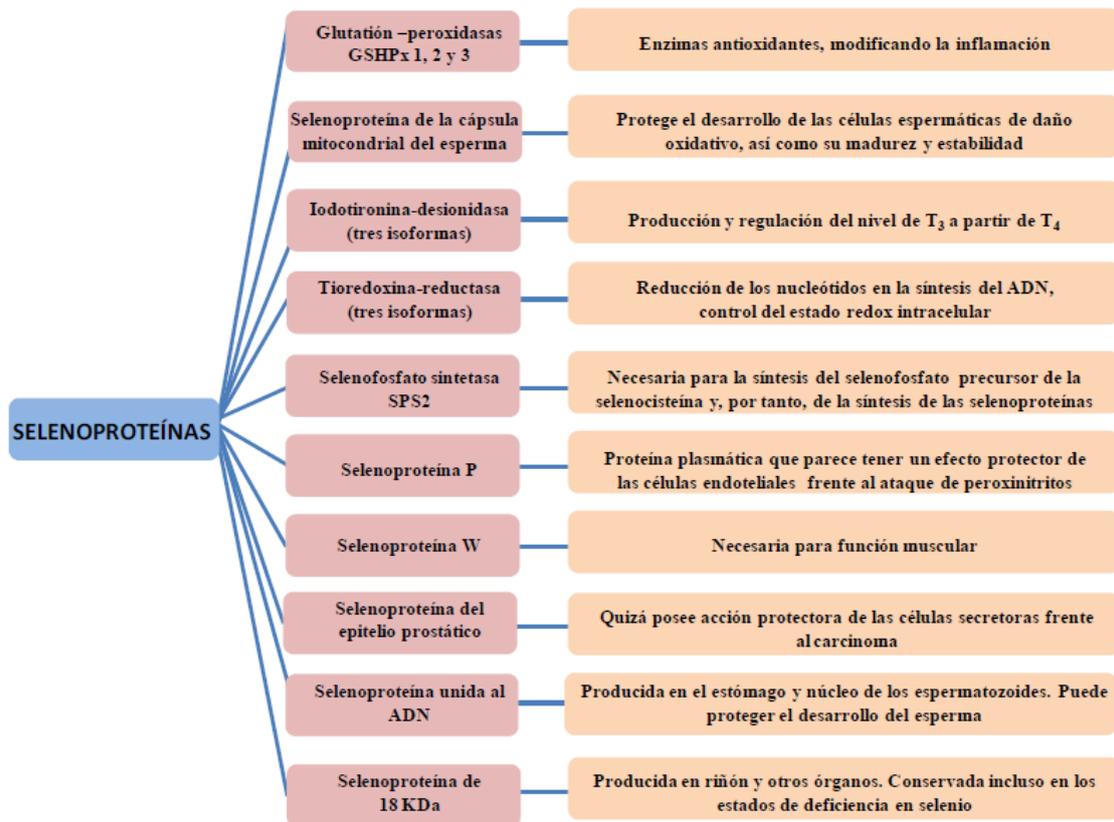


Figura a.2.2 Selenoproteínas y su posible función

### A.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL SELENIO

Como hemos comentado en las selenoproteínas el selenio es incorporado en forma de selenocisteína. Ésta se integra en la cadena polipeptídica principal como el aminoácido selenocisteína el cual es el responsable de su actividad catalítica. Estructuralmente, la selenocisteína es idéntica a la cisteína, con la excepción que contiene selenio en el lugar del azufre, lo que confiere ventajas funcionales ya que los grupos selenol se ionizan más que los grupos tiol a pH fisiológico<sup>7</sup>. Cuando en lugar de la selenocisteína se sitúa una cisteína, la actividad catalítica se reduce drásticamente.

La función más importante del selenio es como antioxidante ya que se encuentra en cada uno de los cuatro centros catalíticos de la enzima **glutación peroxidasa**, de la cual se han descrito ocho isoformas. Esta enzima, junto con la catalasa, superóxido dismutasa y la vitamina E son una parte esencial de los mecanismos de defensa celular contra el ataque de los radicales libres<sup>8</sup>, producidos por las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las ROS son especies tremendamente reactivas, capaces de oxidar indiscriminadamente muchas estructuras biológicas fundamentales para la viabilidad celular como ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos o proteínas, alterando su función.<sup>9</sup>

#### A.3.1 Mecanismos celulares de defensa frente a las ROS

La producción de las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) es un proceso natural, inevitable y constante; un continuo biológico. Todas las células, independientemente de su tipo, están permanentemente produciendo estas especies químicas que, paradójicamente, son especies muy oxidantes que pueden dañar biomoléculas esenciales para el desarrollo y crecimiento de las células. Por ello, los organismos aerobios han tenido que desarrollar una serie de estrategias adaptativas para paliar la producción indeseada de dichos agentes oxidantes y minimizar sus efectos<sup>10</sup>. De esta manera, se mantiene un estado redox celular constante (homeostasis redox), que se caracteriza por la existencia de un equilibrio dinámico entre la producción de agentes oxidantes y los mecanismos celulares para su detoxificación.

Estos mecanismos celulares de defensa frente a las ROS se clasifican en:

- ✚ Mecanismos antioxidantes
  - Antioxidantes no enzimáticos
  - Antioxidantes enzimáticos

Se estudiará el comportamiento de los antioxidantes enzimáticos: estos antioxidantes son enzimas que catalizan reacciones en las que se utilizan las ROS como sustratos, transformándolas en productos más estables y sin propiedades oxidantes. Las más importantes son:

- Superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD) que catalizan la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno.
- Catalasa (CAT) que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>.
- Glutatión peroxidasas (GPx) que catalizan la conversión no solo del peróxido de hidrógeno sino también de diferentes hidroperóxidos orgánicos (ROOH) en H<sub>2</sub>O usando glutatión reducido (GSH) que es transformado en glutatión oxidado (GSSG).

La descripción esquemática de los mecanismos de defensa enzimáticos frente a las ROS se muestran en la figura siguiente.

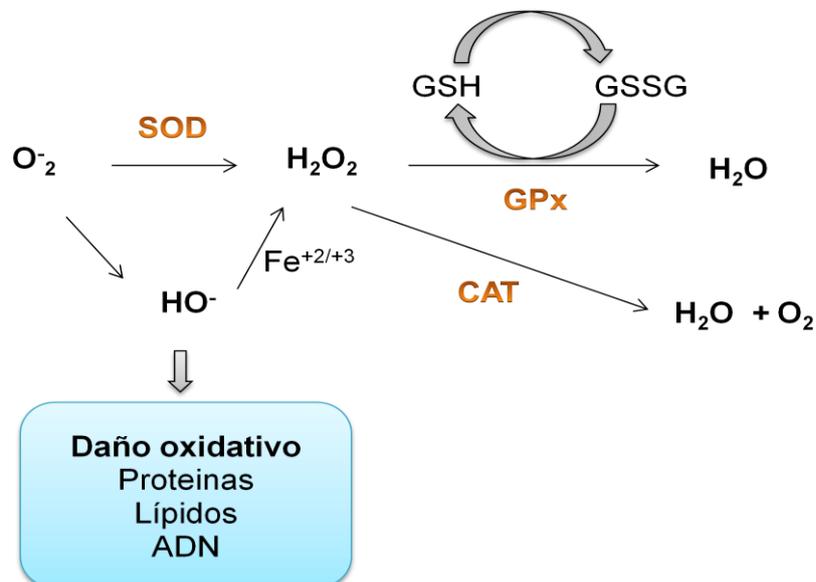


Figura a.3.1 .Defensa enzimática celular frente a las ROS

### A.3.2 Estrés oxidativo

Los agentes antioxidantes garantizan el mantenimiento de la homeostasis redox en condiciones fisiológicas normales, pues son capaces de variar sus niveles para neutralizar directamente a las ROS generadas por el metabolismo celular. Sin

embargo, pueden darse situaciones en las que existe un aumento en la velocidad de generación de las ROS y/o una disminución de los sistemas de defensa antioxidantes, que da lugar a una mayor concentración, en estado estacionario, de ROS. De esta manera se produce una alteración de la homeostasis redox; es decir, se altera el equilibrio dinámico entre la producción de ROS y los mecanismos celulares antioxidantes de defensa. Esta situación de desequilibrio es conocida como estrés oxidativo<sup>11</sup>.

En esta situación de estrés oxidativo es en la que se manifiesta el daño que producen las ROS al reaccionar con las diferentes biomoléculas: lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, alterando su función y pudiendo llevar, si el daño es muy extenso, a la muerte celular<sup>12</sup>.

### *A.3.3 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo*

Si bien, tradicionalmente, el estrés oxidativo ha sido considerado un proceso estático de daño celular derivado del metabolismo aerobio, su trascendencia clínica ha ido adquiriendo relevancia de forma progresiva, hasta el punto de que, en la actualidad, se considera que el estrés oxidativo, agudo o crónico, afecta a una amplia variedad de funciones fisiológicas y está implicado en un gran número de enfermedades humanas y en el proceso de envejecimiento. Algunas de las patologías más relevantes relacionadas con el estrés oxidativo son<sup>13</sup>:

- Enfermedades cardiovasculares
- Patologías digestivas
- Enfermedades neurodegenerativas
- Diabetes
- Cáncer
- Artritis reumatoide
- Envejecimiento

En presente trabajo se centrará en el estudio de la posible relación entre el estrés oxidativo, en concreto en pacientes con glaucoma y degeneración macular.

#### A.4. GLAUCOMA Y DEGENERACIÓN MACULAR

El ojo es el órgano base del sentido de la vista. Asociado a él, existen diferentes defectos y enfermedades, entre los que se encuentra la ceguera. Las causas de ceguera a nivel mundial son muy diversas, pero la mayoría de ellas son resultado de enfermedades. Así pues, puede hablarse de ceguera causada por: catarata (48%), glaucoma (12%), degeneración macular asociada a la edad (9%), retinopatía diabética (5%), diferentes trastornos agrupados como ceguera en la infancia (3.9%), y tracoma (3.6%). Muchas de estas enfermedades tienen tratamiento, por lo que en los países desarrollados las causas principales de ceguera son el glaucoma y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

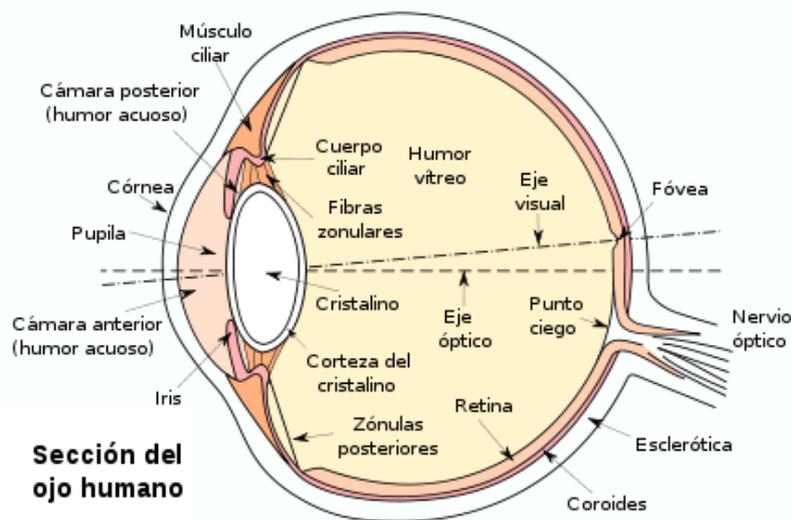


Figura a.4.1 Sección del ojo humano

##### A.4.1 El glaucoma como neuropatía óptica

El glaucoma engloba un grupo de neuropatías ópticas, genéticamente heterogéneas, caracterizadas por causar una ceguera progresiva e irreversible debida a la muerte apoptótica (muerte celular regulada genéticamente) de células ganglionares de la retina. Esta enfermedad constituye la principal causa de ceguera en países industrializados y se estima que están afectadas 70 millones de personas en todo el mundo.

De los distintos tipos de glaucoma, el glaucoma primaria de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma exfoliativo, están considerados como las formas más prevalentes

clínicamente definidas en España y su frecuencia se incrementa con la edad, a partir de los cuarenta con una prevalencia del 2% en mayores de 60 años.

- Glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA): se describe claramente como una neuropatía óptica multifactorial que es crónica y progresiva, con una pérdida característica adquirida de las fibras del nervio óptico. Lo que provoca anomalías del campo visual, y que la presión intraocular sea demasiado alta para la buena salud del ojo.
- Glaucoma exfoliativo (GE): es un tipo de glaucoma primario de ángulo abierto donde las capas exteriores del cristalino se desprenden y bloquean el flujo normal del humor acuoso ocular, aumento de presión intraocular.

Otra enfermedad ocular común es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), es una enfermedad ocular causada por la degeneración, daño o deterioro de la mácula. La mácula es una capa amarilla de tejido sensible a la luz situado en la parte posterior del ojo en el centro de la retina, esta área proporciona la agudeza visual que permite al ojo percibir detalles finos y pequeños.

#### *A.4.2. Enfermedades oculares y estrés oxidativo*

El estrés oxidativo conlleva un aumento sobre los valores fisiológicos en los concentraciones intracelulares de especies de oxígeno reactivas (ROS).

Esta situación se refleja en cambios en los niveles de defensas antioxidantes que pueden verse incrementadas, como una respuesta de protección, o agotadas debido a la acción de las ROS. El estrés oxidativo ha sido implicado en la posible fisiopatología, de diferentes enfermedades oculares, tales como la retinopatía prematura, la degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y la uveítis<sup>14</sup>.

Como se ha comentado en apartados anteriores, los enfermos de patologías asociadas al estrés oxidativo pueden sufrir un desequilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes de eliminación de las mismas. Por lo que los cambios en los niveles de las enzimas implicadas en la detoxificación de los ROS pueden ser utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo. Una de estas enzimas, como vimos, es la glutatión peroxidasa y los niveles de dicha proteína en fluidos biológicos puede ser indicador de dichas patologías.

## A.5. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICAS INTEGRADAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

El objetivo de la proteómica es el estudio del proteoma (conjunto completo de proteínas) en un tejido, célula o fluido biológico en un momento determinado. Dado el elevado número de proteínas que pueden estar presentes en una muestra biológica y la multiplicidad de formas en las que cada una de ellas puede presentarse, así como las interacciones que pueden darse entre ellas, este objetivo resulta muy difícil de alcanzar.

Por tanto, hasta la fecha, la mayoría de los estudios de proteómica se enfocan hacia la identificación y caracterización estructural de proteínas y su expresión diferencial en la muestra de interés, utilizando técnicas de espectrometría de masas molecular con fuente de ionización suave, como la ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) o la ionización por electrovaporización ("electrospray ionization", ESI). Sin embargo, cada vez se hace más patente la necesidad de conocer de manera exacta y precisa los cambios en los niveles de las proteínas, es decir, es necesario llevar a cabo análisis cuantitativos<sup>15</sup>.

El empleo de las técnicas de MALDI o ESI para análisis cuantitativos no es eficaz, pues estas técnicas son muy susceptibles a la matriz y la naturaleza química de los analitos, por lo que no proporcionan una respuesta lineal entre la concentración y la intensidad de la señal. En cambio, la utilización de la espectrometría de masas con una fuente de ionización altamente energética como es el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) ha demostrado, en los últimos años, un gran potencial para llevar a cabo análisis cuantitativos en proteómica.

En el ICP-MS las muestras son completamente atomizadas, de manera que se mide la señal procedente de los elementos presentes en la muestra de manera multielemental. Más del 70% de los elementos de la Tabla Periódica proporcionan señales medibles por ICP-MS con gran sensibilidad y selectividad, entre estos elementos se incluyen la mayoría de los heteroátomos (Fe, Cu, Zn, Se, S, P, etc.) presentes en muchas (metalo-) proteínas.

De este modo, el ICP-MS permite la monitorización de las proteínas a través de sus heteroátomos asociados. Además, también permite la medida de las abundancias de los isótopos de dichos heteroátomos, por lo que se puede utilizar la técnica de la dilución isotópica para la cuantificación absoluta de proteínas.

Evidentemente, la técnica de ICP-MS no aporta información estructural. De manera que, su empleo en estudios de proteómica (*heteroatom (isotope)-tagged proteomics*) requiere del acoplamiento del ICP-MS como detector a técnicas de separación poderosas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para separar las proteínas de interés; así como el uso complementario de técnicas de espectrometría de masas molecular para caracterizar e identificar dichas proteínas<sup>16</sup>.

Para la cuantificación de estas proteínas se utiliza el análisis por dilución isotópica. Es un método de cuantificación para elementos poli-isotópicos basado en la medida de las relaciones isotópicas entre la muestra problema y una disolución enriquecida (conocida como trazador o *spike*) en uno de los isótopos minoritarios (que llamaremos isótopo b) del elemento poli-isotópico presente en la muestra<sup>17</sup>. Conocidas las abundancias naturales de los diferentes isótopos del elemento en la muestra y la concentración y abundancias de dichos isótopos en el *spike* podemos, tras medir las relaciones isotópicas de la mezcla muestra/*spike*, aplicar la siguiente expresión para calcular la concentración del elemento en la muestra:

$$C_s = C_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_n}{M_{sp}} \frac{A_{sp}}{A_n} \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_n}$$

Donde:

- $C_s$  es la concentración del elemento en la muestra.
- $C_{sp}$  es la concentración del elemento en el spike.
- $m_s$  y  $m_{sp}$  son las masas de muestra y spike, respectivamente.
- $M_s$  y  $M_{sp}$  son las masas atómicas del elemento en la muestra y en el spike.
- $A_{sp}$  es la relación de abundancia de la mezcla en el spike.
- $A_n$  es la relación de abundancia natural de la mezcla
- $R_{sp}$  es la relación de la mezcla en el spike.
- $R_m$  es la relación entre los isótopos a y b en la mezcla.
- $R_n$  es la relación natural de los isótopos

Todos estos parámetros son conocidos excepto  $R_m$  que se determina midiendo las intensidades de emisión de los isótopos a y b en la mezcla muestra/spike mediante ICPMS.

## A.6.OBJETIVOS

El selenio es un elemento traza esencial para la salud humana. Alrededor de 25 seleno-proteínas han sido identificados en el proteoma humano. Una de las funciones más conocidas de las selenoproteínas es la defensa antioxidante y la regulación del estado redox. En los últimos años, el interés de utilizar dichas metaloenzimas como posibles biomarcadores de diversas enfermedades.

En el presente trabajo se estudiará la posibilidad de utilizar los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa en fluidos biológicos como bioindicador de glaucoma, una de las principales causas de ceguera.

En el presenta trabajo se estudiará la posibilidad de utilizar los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa en fluidos biológicos como bioindicador de glaucoma, una de las principales causas de ceguera.

Este objetivo se llevará a cabo a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Puesta a punto de un método para la especiación de selenio en suero mediante HPLC-ICP-MS
2. Comparación de los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa en suero, de personas con y/o sin glaucoma.
3. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa en suero de personas sanas con y sin glaucoma.

## B. EXPERIMENTAL

### B.1 REACTIVOS, MATERIALES Y MUESTRAS

#### *Reactivos*

- H<sub>2</sub>O ultrapura (18,2 Ω de resistividad) obtenida a partir de agua destilada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Acetonitrilo grado HPLC (VWR Internacional SAS).
- Acetato de amonio (Panreac Química SAU, Barcelona, España).
- Glutación peroxidasa de eritrocitos bovinos, actividad 300-700 U/mg. (Sigma-Aldrich Chemie).
- Ácido nítrico 65% (Panreac Química SAU).
- Seronorm<sup>TM</sup> Trace Elements Serum LOT 0903106 (SERO AS, Billingstad, Noruega).
- Patrón enriquecido <sup>74</sup>Se (98,84 % de abundancia en el isótopo <sup>74</sup>Se), nuevamente proporcionado por “Cambridge Isotope Laboratories” (Andover, MA, EEUU) en forma de polvo elemental y disuelto en un volumen mínimo de ácido nítrico “sub-boiling” y posteriormente diluido con agua ultrapura, según necesidad.
- Kit para la medida de la actividad de la glutación peroxidasa (CGP1, Sigma Aldrich)

#### *Materiales*

- Tubos de centrifuga de 0,5; 1; 15 y 50 ml.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Pipetas de plástico de 3 y 1 ml.
- Tubos para ultrafiltración con membrana porosa Amicon Ultra de 10 KDa (Millipore Co., Billerica, USA).
- Micropipetas: 1-10 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl, Eppendorf.
- Jeringa de inyección de 250 µl (Hamilton Co., Reno, USA).

#### *Muestras*

Las muestras de suero empleadas fueron proporcionadas por la Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Vega (FIO).

## B.2 INSTRUMENTACIÓN

### *B.2.1 Espectrómetro de masa elemental. ICP-(ORC)MS*

Para las medidas de los isótopos de hierro y selenio se ha utilizado un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo, con detector tipo cuadrupolo y equipado con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORS, Sistema de Octapolo de Reacción), modelo 7500 ce de Agilent Technologies (Santa Clara, EE.UU.).

El principio de funcionamiento del ICP-MS es relativamente sencillo (Figura III.1). La muestra, formando un fino aerosol líquido, se introduce a través del canal central de la antorcha en el plasma de argón (que es el gas normalmente empleado), que se encuentra parcialmente ionizado (aproximadamente un 1%) y que posee una temperatura entre 6000 y 8000 K. Dicho aerosol se forma por aspiración de la muestra líquida, empleando una bomba peristáltica (controlada, en este caso concreto, por el programa informático del equipo) hacia el sistema de nebulización, constituido por un nebulizador (tipo Meinhard) y una cámara de nebulización de doble paso (tipo Scott, refrigerada por efecto Peltier a una temperatura de 2°C). La antorcha (tipo Fassel) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el flujo de Ar portador (o nebulizador), el intermedio para el Ar auxiliar y el exterior para el Ar plasmógeno. En el plasma la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada.

Los iones formados en el ICP son extraídos del canal central del plasma a una interfase que se encuentra a vacío (aproximadamente 1 torr) a través del cono de extracción o sampler (constituido por una base de cobre y una punta de níquel, con un orificio central de 1 mm de diámetro) produciéndose una expansión adiabática. A continuación el haz de iones es transmitido a través de un segundo cono metálico o skimmer (de níquel, con un orificio de 0.4 mm). Ambos conos constituyen la interfase de extracción por medio de la cual pasa el haz de iones (aproximadamente el 1 % de los iones formados en el plasma) hacia el sistema electrostático de enfoque que se encuentra sometido a alto vacío ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  torr) por la acción de una bomba turbomolecular.

Posteriormente el haz de iones es conducido al sistema de lentes electrostáticas (Figura b.2.1): En primer lugar están las lentes de extracción, cuya función principal es acelerar los iones muestreados. Luego, se produce el enfoque iónico con tres lentes Einzel que mediante campos electromagnéticos adecuados permiten obtener un haz

colimado de iones. Por último, se encuentra un grupo de lentes Omega, que actúan eliminando los fotones.

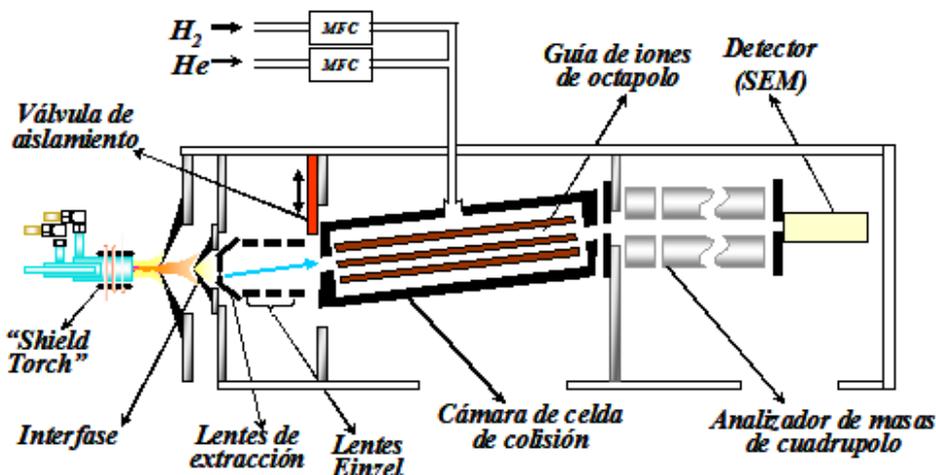


Figura b.2.1 Esquema de un ICP-ORS-MS Agilent HP 7500ce

Entre el sistema de lentes de extracción y enfoque iónico y el analizador de masas, se encuentra la celda de colisión (octapolo), la cual actúa como una guía de iones y opera en modo de radiofrecuencia. La cámara del octapolo puede ser presurizada con He, H<sub>2</sub> o mezclas de ambos, así como otro tipo de gases como Xe u O<sup>2</sup>. Los gases se introducen en la celda bajo un controlador de flujo másico a través de una línea de acero para minimizar las posibles interferencias poliatómicas (es decir, los iones procedentes del plasma van a colisionar y/o reaccionar en la celda con las moléculas del gas rompiendo así los posibles iones interferentes).

Una vez en el analizador de masas, los iones son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Nuestro equipo consta de un analizador de masas tipo cuadrupolo, constituido por cuatro barras de Mo cilíndricas sometidas a corrientes continuas y alternas de radiofrecuencias. Variando los voltajes aplicados, el cuadrupolo actúa como un filtro de masas, de modo que sólo aquellos iones con una relación  $m/z$  determinada conseguirán pasar a través del centro del cuadrupolo. Finalmente, solo los iones emergentes son detectados por un multiplicador de electrones secundario (SEM), que funciona en modo digital y en modo analógico (dependiendo de la intensidad de los iones).

### B.2.2. Instrumentación cromatográfica: sistema HPLC y columnas

La instrumentación empleada en las separaciones por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, “High Performance Liquid Chromatography”) fue la siguiente:

- Para la separación cromatográfica, con detección elemental mediante ICP-MS, se ha empleado un equipo de cromatografía de alta resolución Shimadzu LC-20 AD (Kyoto, Japón), compuesto por una bomba de alta presión de doble pistón junto con una válvula de inyección de seis vías Rheodyne modelo 7125 (Cotati, Ca., EE.UU.), con bucle de inyección tipo peek (100µl).
- Columnas preparativas de afinidad “HiTrap-heparin sepharose” y “Hitrap-blue sepharose” con un volumen de 1 mL cada una (Pharmacia, Uppsala, Suecia), utilizadas para la separación de especies de selenio en suero.



**Figura.b.2.2** Cartuchos de afinidad Hi Trap Heparin HP y Hi Trap Blue HP

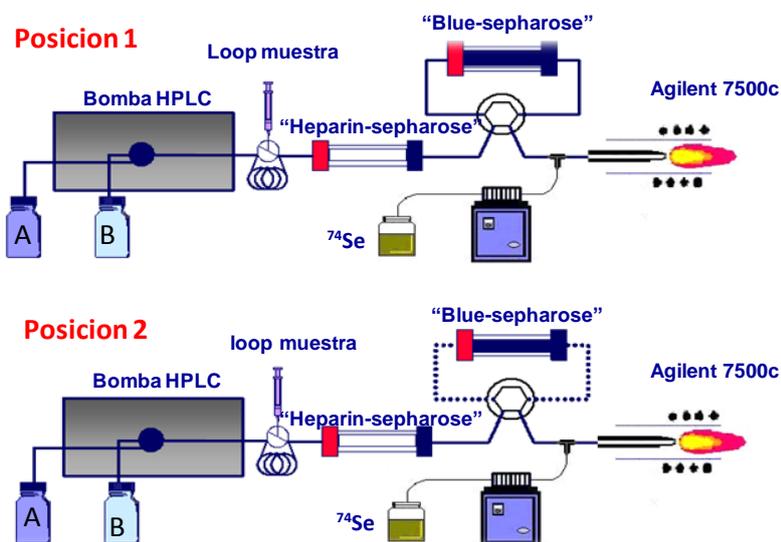
El “análisis de especiación” cuali- y cuantitativo se llevó a cabo empleando técnicas “híbridas” por acoplamiento del sistema de HPLC con el ICP-MS, (HPLC-ICP-MS).

### B.2.3. Separación de selenoproteínas en suero mediante HPLC-ICPMS

La separación de selenoproteínas en suero se llevo a cabo mediante una cromatografía de afinidad, que consiste en el uso de dos cartuchos de afinidad, descritos anteriormente. Siguiendo el siguiente esquema<sup>18</sup>:

- Fase móvil A : Acetato de amonio 0.05M pH 7
- Fase móvil B: Acetato de amonio 1.5M pH 7

- Flujo: 1 ml/min
- Disolución spike:  $^{74}\text{Se}$  3ppb
- Flujo post-columna: 0.1 ml/min
- Volumen de inyección: 100  $\mu\text{l}$



**Figura.b.2.3** Instrumentación para la especiación de selenoproteínas en suero mediante cromatografía de afinidad.

El cartucho de heparina retiene al Selenoproteína P de forma selectiva, del mismo modo que el cartucho de “blue sepharosa” retiene la albúmina. Con el fin de utilizar ambas columnas en línea, las muestras de suero se inyectan en “posición 1” cuando la fase móvil A pasa a través del sistema. De este modo Sel P queda retenida en el cartucho de heparina y la albúmina en el cartucho de “blue sepharosa”. La glutatión peroxidasa no queda retenida en el sistema y sale en primer lugar. Seguidamente, se bombea la fase móvil B a través del sistema con la válvula de inyección cerrada (“posición 2”) para eluir la Sel P. Finalmente, se vuelve a abrir la válvula de inyección (“posición 1”) para la elución de la albúmina con la fase móvil B. Tras la elución, la fase móvil A se hace pasar de nuevo a través del sistema para equilibrarlo antes de la siguiente inyección.

Tiempo (s)	Fase móvil	Posición (válvula 2)
0	100 % A	Inyección 1
300	100 % B	Carga 2
600	100 % B	Inyección 1
900	100 % A	Inyección 1
1200	Paramos el cromatograma	

La cuantificación se llevo a cabo mediante dilución isotópica post-columna, usando la ecuación de la dilución isotópica escrita anteriormente. Para ello el eluyente de la columna se mezcla con una disolución enriquecida de  $^{74}\text{Se}$ .

#### B.2.4 Condiciones de operación

La detección específica del Se presente en las muestras de suero se llevo a cabo mediante ICP-ORS-MS. Pare ello se optimizaron los parámetros instrumentales que afectan a la señal analítica del Se en ICP-MS, como son: la posición de la antorcha, la potencia de radiofrecuencias, el flujo del gas portador, los voltajes de las lentes iónicas y la distancia de muestreo. Esta optimización de las condiciones de medida del ICP-ORS-MS se llevó a cabo utilizando, primero una disolución de calibrado estándar acuosa, que contenía Li ( $m/z=7$ ), Na ( $m/z=23$ ), Sc ( $m/z=45$ ), Co ( $m/z=59$ ), Y ( $m/z=89$ ), In ( $m/z=115$ ), Ba ( $m/z=137$ ), Tb ( $m/z=159$ ), Tl ( $m/z=205$ ) y Th ( $m/z=232$ ) a nivel de 1 ppb, permitiendo así cubrir todo el rango de masas.

También, se optimizaron las condiciones experimentales de la celda de colisión/reacción para la eliminación de las interferencias poliatómicas espectrales que afectan a la medida de Se mediante ICP-MS, especialmente la interferencia debida al  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  que afecta al isótopo mayoritario del selenio, el  $^{80}\text{Se}$ . La celda se puede presurizar con He si se opera en el modo celda de colisión, o con  $\text{H}_2$  operando en modo celda de reacción, por lo que la optimización de la celda consiste en la selección del gas y del flujo del mismo. Para ello un blanco y una disolución patrón de Se de 20ppb en 1% en  $\text{HNO}_3$  fueron medidas con ambos gases y a diferentes flujos (de 0 a 5 mL/min), observando que con  $\text{H}_2$  y a un flujo de 4 mL/min se conseguían eliminar las interferencias espectrales sin pérdida excesiva de sensibilidad.

Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla b.2.4

#### Condiciones del plasma

Potencia de radiofrecuencia /W	1500
Flujo de gas refrigerante / Lmin-1	15
Flujo de gas portador /L min -1	1,1
Distancia de muestreo/nm	5,8
Parametros de las lentes iónicas	Optimizadas diariamente

#### Parámetros de la celda de colisión

Flujo de H2 gas / ml min-1	4
Octapolo bias/V	-18
QP bias/ V	-16

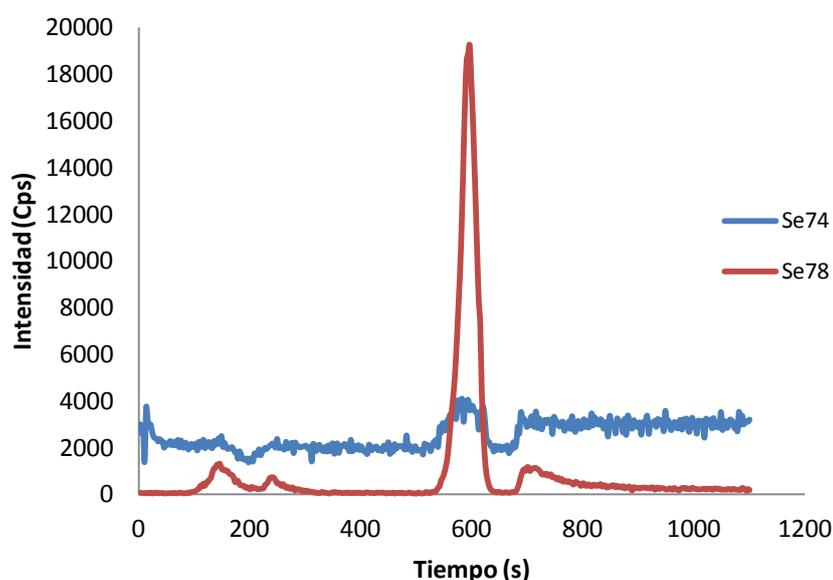
#### Parámetros de adquisición

Isotopos monitorizados	74,76,77,78,79,80,81,82,83
Puntos por pico	3
Tiempo de adquisición por pico/s	4
Replicas	5

**Tabla.b.2.4** Condiciones de trabajo del ICP-ORS-MS acoplado a HPLC para la medida de los diferentes isótopos de Se.

### B.3. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LAS SELENOPROTEÍNAS

Tras la optimización de las condiciones de medida del Se por ICP-ORS-MS se procedió a su empleo como detector en la separación de la GPx por cromatografía de afinidad. Para ello y, puesto que el flujo de la fase móvil utilizada para la separación (1 ml/min) es compatible con el flujo del nebulizador Meinhard del equipo de ICP-MS. Se realizó una prueba previa para la validación del método con un suero de referencia y se obtuvo el siguiente resultado:



**Figura.b.3.1** Cromatograma obtenido por cromatografía de afinidad. Se inyectaron 100  $\mu$ l de suero de referencia. Fueron monitorizados los isótopos  $^{78}$  Se y  $^{74}$  Se (utilizado para la cuantificación).

Se puede observar en el cromatograma (Figura b.3.1) la separación de las tres selenoproteínas presentes en el suero según la metodología propuesta en el apartado anterior. El primer pico que se observa corresponde a la glutatión peroxidasa (no retenida), el segundo a la selenoproteína P y el tercero pico corresponde a la albúmina.

La medida de relaciones isotópicas en el ICP-MS está sujeta a una serie de errores sistemáticos debido a interferencias espectrales, tiempo muerto del detector y factor de discriminación de masas, que se deben corregir antes de proceder a la cuantificación.

Así, la intensidad de las cuentas se corrigieron teniendo en cuenta el tiempo muerto del detector (en nuestro caso 49ns), las interferencias espectrales  $^{40}\text{Ar}^{+40}\text{Ar}^{+}$  se eliminan utilizando un flujo de gas  $\text{H}_2$  pero se forman nuevas interferencias poliatómicas como  $\text{BrH}^{+}$  y  $\text{SeH}^{+}$  las cuales se eliminan mediante el uso de correcciones matemáticas que se indican a continuación:

$$^{77}\text{Se} = ^{77}\text{I} - f_{\text{Se}} \cdot (^{76}\text{I})$$

$$^{78}\text{Se} = ^{78}\text{I} - f_{\text{Se}} \cdot (^{77}\text{I})$$

$$^{79}\text{Br} = ^{79}\text{I} - f_{\text{Se}} \cdot (^{78}\text{Se})$$

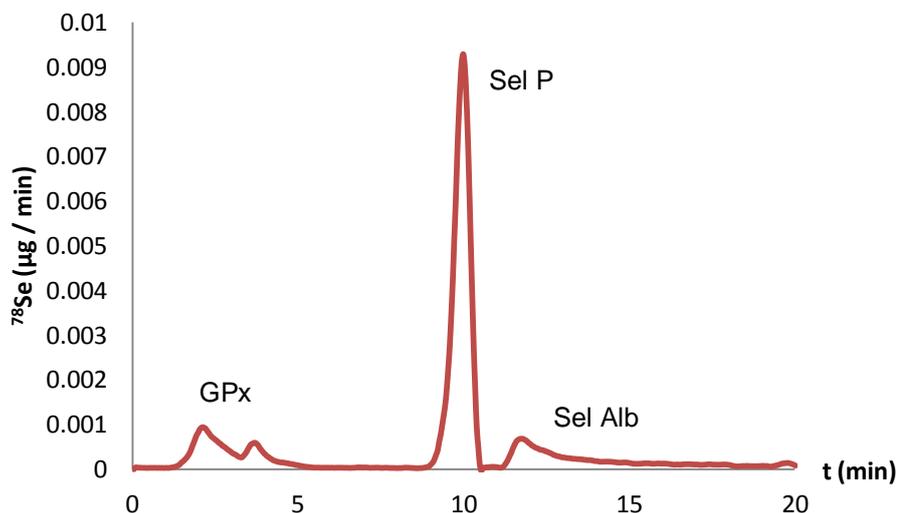
$$^{80}\text{Se} = ^{80}\text{I} - f_{\text{Br}} \cdot (^{79}\text{Br})$$

$$^{81}\text{Br} = ^{81}\text{I} - f_{\text{Se}} \cdot (^{80}\text{Se})$$

$$^{82}\text{Se} = ^{82}\text{I} - f_{\text{Br}} \cdot (^{81}\text{Br})$$

Donde  $f_{\text{Se}} = \text{SeH}^{+}/\text{Se}^{+} = ^{83}\text{I}/^{82}\text{I}$  y  $f_{\text{Br}} = \text{BrH}^{+}/\text{Br}^{+} = ^{82}\text{I}/^{81}\text{I}$

Se utilizó la ecuación de la dilución isotópica descrita anteriormente para transformar este cromatograma de intensidades en un cromatograma de flujo másico. (Figura b.3.2)



**Figura b.3.2** Cromatograma de flujo másico obtenido aplicando la ecuación de la dilución isotópica post-columna.

La cantidad de selenio en cada fracción se calcula mediante la integración de los correspondientes picos cromatográficos usando un programa informático, Origin 8.0 (Micocal Software Inc., Northampton, MA, USA). La concentración de selenio en cada proteína se calcula dividiendo la cantidad de selenio encontrada entre el volumen de muestra inyectado.

La validación de la metodología se llevó a cabo analizando por triplicado un suero de referencia (Valor de referencia Se =  $59.2 \pm 2.8$   $\mu\text{g/l}$ ). La concentración encontrada, como suma del selenio presente en cada selenoproteína (GPx + Sel P + Alb), fue de Se =  $56.8 \pm 0.9$  ppb que concuerda con el valor certificado.

Una vez validada la metodología se procedió a la medida del selenio total y de selenoproteínas de las muestras de suero objeto de estudio.

#### B.4.SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GLUTATIÓN PEROXIDASA EN MUESTRAS DE SUERO

Una vez optimizados las condiciones de operación y validación de la metodología desarrollada por HPLC-ICP-MS de la determinación de Se en suero, se procedió a su aplicación en el análisis de muestras de suero humano objeto de estudio. Las muestras suministradas por la Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Vega fueron las siguientes:

<b>Muestra</b>	<b>Controles sanos</b>	<b>Controles con cataratas</b>	<b>POAG</b>	<b>PEGX</b>	<b>DMAE</b>
<b>N =</b>	10	10	10	10	10

Controles sanos: pacientes sanos sin ninguna enfermedad

Controles con cataratas: pacientes con cataratas pero sin glaucoma

POAG: pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto

PEGX: pacientes con glaucoma exfoliativo

DMAE: pacientes con degeneración macular asociada a la edad

Se aplicará la metodología descrita anteriormente para el análisis de las muestras de suero así como para su posterior cuantificación. Se compararán los niveles de selenio total, glutatión peroxidasa y selenoproteínas obtenidos para los distintos grupos en estudio con el fin de encontrar un posible biomarcador.

Los resultados para los distintos Grupos se muestran en las siguientes tablas:

Tabla b.4.1. Resultados del contenido total y de selenoproteínas en el grupo de personas sanas.

MUESTRA	GPx Se(ppb)	SeIP Se(ppb)	SeAlb Se(ppb)	Setot (ppb)
SS1 (hombre 71)	13,15	63,86	10,11	87,12
SS2 (mujer 61)	16,33	102,09	12,68	131,1
SS3 (hombre 62)	22,48	84,58	16,56	123,63
SS4 (mujer 31)	12,44	55,06	11,39	78,9
SS6 (mujer 43)	23,07	73,11	19,15	115,34
SS7 (hombre 67)	23,36	76,32	12,53	112,21
SS8 (mujer 31)	18,98	72,98	15,99	107,95
SS15 (hombre 26)	26,4	55,79	12,98	95,17
SS17 (hombre 48)	31,36	45,12	13,27	92,75
SS18 (hombre 67)	11,69	59,42	8,73	79,84

Tabla b.4.2. Resultado del selenio total y selenoproteínas encontrados en el grupo de pacientes control cataratas.

MUESTRA	GPx Se(ppb)	SeIP Se(ppb)	SeAlb Se(ppb)	Se tot(ppb)
SC 29 (femenino 50)	20	47	11	78,12
SC 81 (femenino 53)	17	60	11	88,13
SC 59 (femenino 64)	16,5	41,5	8,5	66,80
SC 53 (femenino 80)	16,5	61,5	8	86,16
C-008/10 (masculino 50)	23,6	71,6	13,3	108,70
SC 74 (masculino 53)	24	62	12	99,01
SC 69 (masculino 63)	23	64	10	97,30
SC 57 (masculino 77)	17,5	46	11	74,33
SC 54 (masculino 85)	13	55	15	83,41

Tabla b.4.3. Resultado del selenio total y selenoproteínas encontrados en el grupo de pacientes POAG.

MUESTRA	GPx Se(ppb)	SeIP Se(ppb)	SeIAlb Se(ppb)	Se tot(ppb)
SG 36p (mujer 48)	22	66	13	98,65
SG 98p (mujer 56)	17	55	12	83,03
SG 54p (mujer 68)	21	63	14	97,46
SG 105p (mujer 76)	17	55	11	83,73
SG 119p (mujer 81)	16	50	8	74,14
SG 13p (hombre 36)	19	67	11	96,92
SG 6p (hombre 44)	20	58	14	91,69
SG 33p (hombre 64)	21	63	10	93,83
SG 123p (hombre 73)	13	35	8	55,67
SG 37p (hombre 89)	19	56	12	86,28

Tabla b.4.4 Resultado del selenio total y selenoproteínas encontrados en el grupo de pacientes PEGX.

MUESTRA	GPx Se(ppb)	SeIP Se(ppb)	SeIAlb Se(ppb)	Se tot(ppb)
SG 121x (mujer 55)	23	58	12	92,90
SG 113x (mujer 65)	20	52	11	83,10
SG 69x (mujer 73)	17	47	11	75,61
SG 115x (mujer 74)	17	54	10	80,52
SG 64x (mujer 82)	14	53	8	74,63
SG 62x (hombre 60)	17	57	10	84,09
SG 83x (hombre 62)	19	70	12	100,27
SG 52x (hombre 73)	21	59	13	93,54
SG 53x (hombre 81)	12	30	8	49,98
SG 9x (hombre 92)	20	56	15	91,36

Tabla b.4.5 Resultado del selenio total y selenoproteínas encontrados en el grupo de pacientes DMAE.

MUESTRA	GPx Se(ppb)	SelP Se(ppb)	SelAlb Se(ppb)	Se tot(ppb)
SD 1d (hombre 81)	16	42	10	67,79
SD 2dw(hombre 77)	27	65	14	105,82
SD 3dw (hombre 72)	17	46	11	73,87
SD 4dw (?)	20	66	13	98,12
SD 5w (mujer 85)	17	55	10	81,34
SD 6d (hombre 83)	17	50	10	77,38
SD 7w (hombre 73)	17	55	9	81,36
SD 8d (mujer 86)	16	41	9	66,22
SD 9w (hombre 78)	18	55	10	81,86
SD 12d (mujer 81)	19	47	10	76,46

Se resumen los resultados obtenidos en los siguientes gráficos:

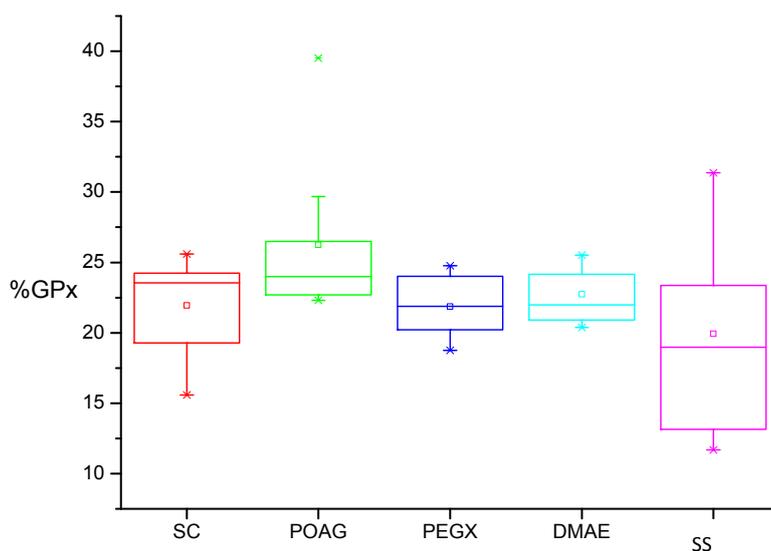
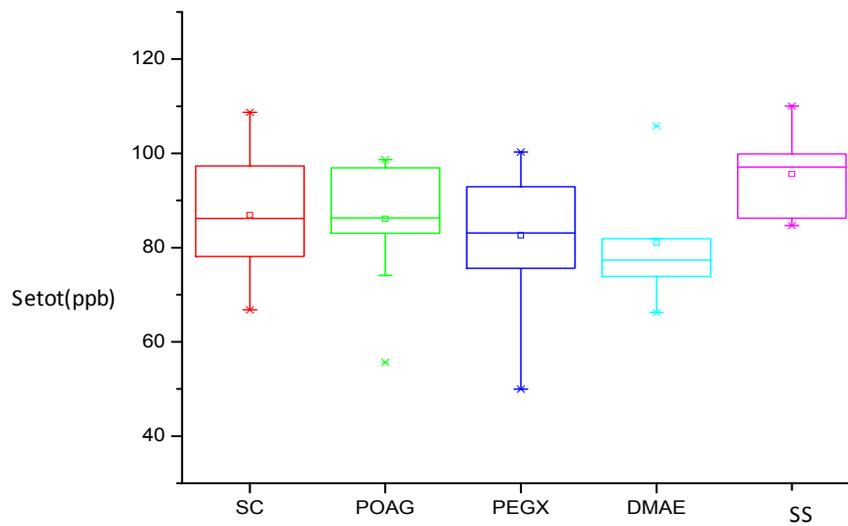


Figura b.4.1. Representación de % de glutatión peroxidasa en las diferentes muestras de suero



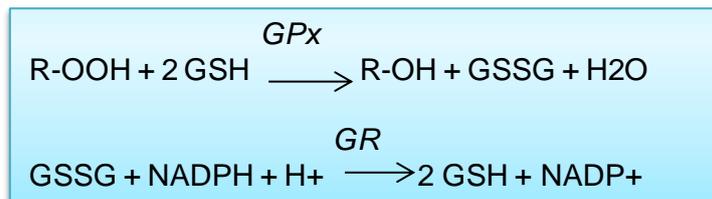
**Figura.b.4.2** Representación del selenio total presente en las diferentes muestras de suero

Como se puede observar en los gráficos anteriores, no existen diferencias significativas entre los distintos grupos de pacientes. Por lo que se decidió medir la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa para intentar obtener mejores resultados.

## B.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA

La presencia de selenio en la estructura de esta enzima (glutatión peroxidasa) permite relacionar la concentración del selenio con la actividad de la GPx. Una unidad de actividad enzimática se define como: (símbolo U) la cantidad de enzima que en una reacción enzimática cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg de proteína o U/mL) para señalar, respectivamente, la actividad enzimática específica o la concentración de actividad enzimática.

Para la medida de la actividad usaremos un kit comercial el cual dispone de todos los reactivos necesarios para la medida de dicha actividad. El kit utiliza un método de determinación indirecta. Se basa en la oxidación de glutatión (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) catalizada por GPx, que luego se acopla a GSSG el cual se vuelve a transformar en GSH utilizando glutatión reductasa y NADPH ( $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, Reducido). Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



Por lo que se relaciona la disminución del NADPH durante la oxidación, medida a 340nm, con la actividad de la GPx.

### Reactivos

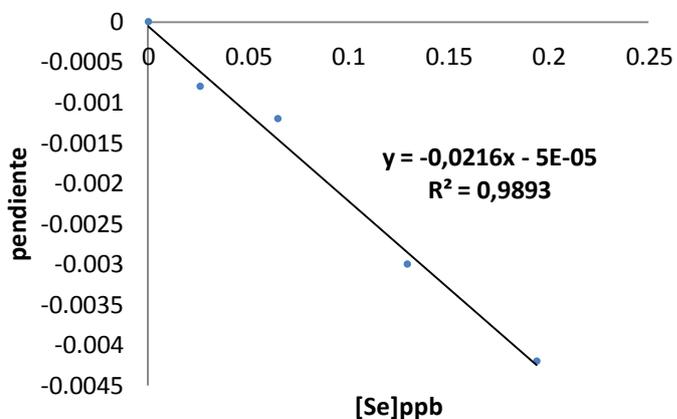
- Buffer de glutatión peroxidasa (50mM Tris HCl, pH 8, contiene 0.5mM EDTA)
- Reactivo NADPH (reconstituir en 1.25ml agua, cada vial contiene 5mM NADPH, 42mM glutatión reducido, y 10 unidades/ml de glutatión reductasa)
- Disolución de tert-butilhidroperóxido 30 mM
- Patrón de glutatión peroxidasa

	GPx buffer (μl)	NADPH reagent (μl)	Enzima (0.25 U/ml) (μl)	Muestra	30mM t-BuOOH (μl)
Blanco	940	50	-	-	10
Control positivo	890-920	50	20-50	-	10
Muestra	890-930	50	-	10-50	10

**Tabla b.5.1** Volúmenes necesarios para la medida de la actividad.

Para realizar la curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones del patrón comercial de GPx bovina, cuya concentración de selenio se había calculado mediante ICP-MS y resultó ser de 258.6 ppb. Para cada punto del calibrado se registró la velocidad de la disminución de la absorbancia a 340 nm frente al tiempo durante 2 minutos (representada como pendiente) de una disolución de NADP(H) en presencia de t-Bu-OOH, Glutatión reductasa y el patrón de GPx. Para las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro. Diluimos el patrón 1:10 y añadimos volúmenes diferentes de esta disolución patrón a la cubeta (Vf=1ml) con el resto de los reactivos constantes. Con los resultados obtenidos se trazó la curva de calibrado recogida en la figura siguiente.

μl añadidos	Se-GPx (ppb)	pendiente
0	0	0
1	0,02586	-0,0008
2,5	0,06465	-0,0012
5	0,1293	-0,003
7,5	0,19395	-0,0042



Transformamos la grafica anterior en actividades vs a concentración mediante la siguiente ecuación:  $(\Delta A_{340}/6.22) \cdot (DF/V)$ . Donde :

$$\Delta A_{340} = A_{340}/\text{min}_{(\text{blanco})} - A_{340}/\text{min}_{(\text{muestra})}$$

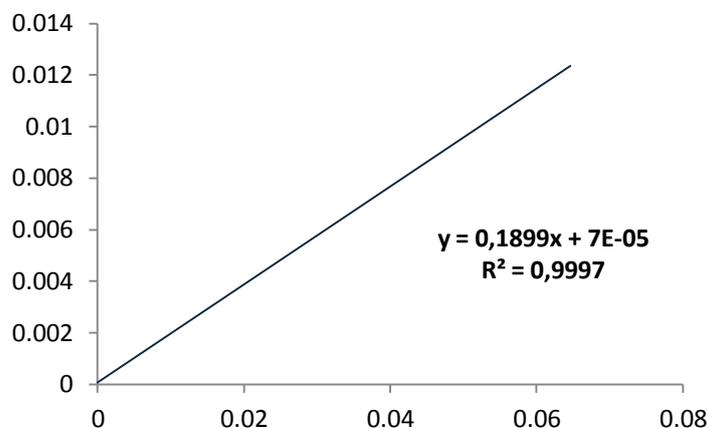
$$6.22 = \epsilon^{mM} \text{ para NADPH}$$

DF= factor de dilución de la muestra antes de ser añadida a la reacción

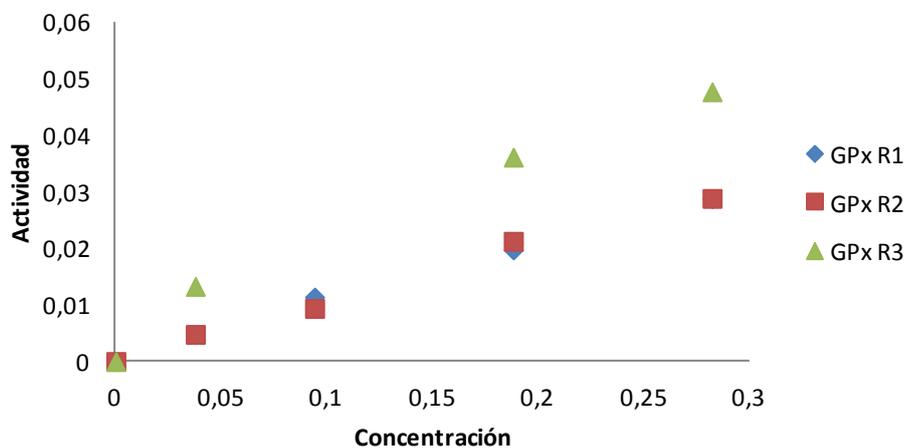
V= volumen de la muestra en ml

A continuación se representó la concentración de Se y la actividad obteniéndose la siguiente recta:

Se-GPx (ppb)	Actividad
0	0
0,02586	0,0051
0,06465	0,0123
0,1293	0,0125
0,19395	0,0126



Además del calibrado anterior se llevo a cabo un calibrado con un patrón nuevo de glutatión peroxidasa de 376.9 ppb (cuantificado previamente por HPLC-ICP-MS) para comprobar la estabilidad del patrón en diferentes días. Se realizaron tres réplicas del calibrado obteniéndose los siguientes resultados.



$$\text{GPx R1: } y = 0.1008x + 0.0008$$

$$\text{GPx R2: } y = 0.1035x + 0.0004$$

$$\text{GPx R3: } y = 0.1443x + 0.0093$$

$$1 \text{ ppb Se} = 0.12 \pm 0.03 \text{ U Actividad}$$

A continuación se mide la estabilidad de una muestra de suero con el tiempo (almacenada en el congelador) es importante realizar este estudio ya que las muestras de suero se conservan congeladas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	<b>Actividad</b>	<b>Concentración</b> <b>(ppb)</b>
<b>24 h</b>	0.0023	1.17
<b>48 h</b>	0.0021	1.07
<b>10 días</b>	0.0019	0.96
<b>20 días</b>	0.0023	1.17

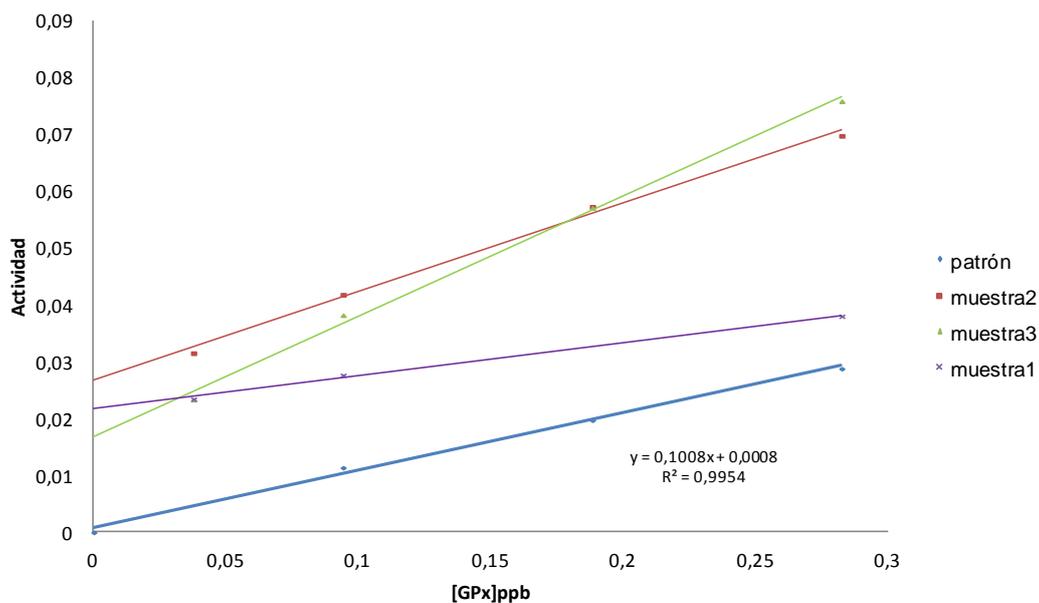
⇒ **1.1 ± 0.1 ppb**

La conclusión de este estudio es que la actividad de la muestra permanece constante con el tiempo , por lo que se procedió a medir las muestras de suero.

Se analizó la actividad de 27 muestras de suero.

Muestra	Actividad suero	Concentración Se(ppb)	Se-GPx especiación (ppb)
SS1	0,0046	2,39	13
SS2	0,0027	1,38	16
SS3	0,0074	3,86	22
SS4	0,0042	2,17	12
SS7	0,0038	1,96	23
SS8	0,0019	0,96	19
SS17	0,0053	2,75	31
SS18	0,0023	1,17	12
SG62x	0,0035	1,81	17
SG69x	0,0039	2,02	17
SG113x	0,0038	1,96	20
SG115x	0,0047	2,44	17
SG121x	0,0046	2,39	23
SG142x	0,0051	2,65	26
SG13p	0,0024	1,23	19
SG33p	0,0050	2,60	21
SG37p	0,0096	5,02	19
SG54p	0,0035	1,81	21
SG100P	0,0052	2,70	14
SG105p	0,0023	1,17	17
SG123p	0,0033	1,70	13
SD1d	0,0051	2,65	16
SD6d	0,0023	1,17	17
SD7w	0,002	1,02	17
SD8d	0,0011	0,54	16
SD9w	0,0025	1,28	18
SD12d	0,0054	2,81	19





Se observa que cada muestra se comporta de distinta manera, además las pendientes son distintas de la recta de calibrado con patrón GPx, por lo que se puede deducir que la actividad se ve influenciada por la matriz de la muestra. Estos efectos de matriz se pueden deber a que hay alteraciones en la estructura de la proteína, la presencia de activadores e inhibidores o también la presencia de otras sustancias que actúan y que pueden aumentar o disminuir la actividad.

## C. CONCLUSIONES

Como resultado de los estudios realizados a lo largo del presente proyecto encaminados a evaluar los niveles de selenio y glutatión peroxidasa en fluidos biológicos como bioindicador de glaucoma o degeneración macular.

Del estudio realizado se puede concluir :

1. El método propuesto para la especiación de selenio en suero mediante HPLC-ICP-MS con dilución isotópica post-columna ha permitido la determinación de selenio total y diferentes selenoproteínas presentes en suero humano.
2. La comparación de los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa en suero, de personas con y/o sin glaucoma se puede concluir que no se observan diferencias en los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa para los distintos tipos grupos de personas analizados.
3. Del estudio de estabilidad de las muestras de suero podemos decir que tanto la actividad como la concentración de selenio son estables durante al menos 20 días, manteniendo las muestras almacenadas en el congelador.
4. Se llevó a cabo la medida de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa en las muestras objeto de estudio sin encontrar una diferencias significativas para las actividades encontradas entre grupos.
5. A partir de las medidas de la actividad se calculó la concentración de glutatión peroxidasa y se comparó con los valores de glutatión peroxidasa obtenidos por medidas de Se por total HPLC-ICP-MS. De dicho estudio podemos decir que no existe una relación lineal entre los niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa en suero y la actividad de la GPx.

---

**D. BIBLIOGRAFÍA**

- <sup>1</sup> A. Mas, J. M. Azcue, *Metales en sistemas Biológicos*; Promociones y Publicaciones Universitarias; (1993), Barcelona.
- <sup>2</sup> W. Mertz, *Trace elements in human and animal nutrition*, Academic Press, Inc., (1987), Nueva York
- <sup>3</sup> D. A. Bender, *Introduction to Nutrition and metabolism*, Taylor and Francis, Incorporated, (2002), Florence, KY, USA
- <sup>4</sup> B. Moghadaszadeh and A. H. Beggs, *Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways*, *Physiology*, (2006), 21:307-315
- <sup>5</sup> J. R. Arthur. *The glutathione peroxidases*. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1825–1835
- <sup>6</sup> R. F. Burk and K. E. Hill, *Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis*, *Annu. Rev. Nutr.*, (2005), 25: 215-235.
- <sup>7</sup> Stadtman TC, *Bacterial Selenocysteine*. *Annu Rev Biochem* 1996; 65:83-100.
- <sup>8</sup> J. Nordberg, E.S. Arnér, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system* *Free Radic Biol Med*, 31 (2001), pp. 1287–1312
- <sup>9</sup> Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T.D. Cronin, Milan Mazur, Joshua Telser. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 44–84.
- <sup>10</sup> W. Dröge, *Free radicals in the physiological control of cell function*, *Physiol. Rev* (2002), 82: 47-95.
- <sup>11</sup> 4. Halliwell B. *Free radicals and antioxidants – quo vadis?*. *Trends in Pharmacological Sciences*, V(2011), Vol. 32, No. 3
- <sup>12</sup> H. Steinbrenner, H. Sies, *Protection against reactive oxygen species by selenoproteins*, *Biochim. Biophys. Acta* (2009), doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.014
15. B. Halliwell. *The wanderings of a free radical*. *Free Radical Biology & Medicine* 46 (2009) 531–542.
- <sup>13</sup> A. Pérez de la Cruz, J. Abilés y J. Castaño Pérez. *Estrés oxidativo y su implicación en distintas patologías*. *Nutrición Clínica en Medicina*. (2008) Vol. II - Número 2 pp. 45-64.
- <sup>14</sup> Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF *Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients*. *Am J Ophthalmol*. 2004 Jan;137(1):62-9.
- <sup>15</sup> Ong S-E, Mann M. *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. *Nat. Chem. Biol.* (2005);1:252-62.

<sup>16</sup> Jörg Bettmer, María Montes Bayón, Jorge Ruiz Encinar, María Luisa Fernández Sánchez, María del Rosario Fernández de la Campa, Alfredo Sanz Medel. *The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis*. Journal of Proteomics 72 (2009) 989–100.

<sup>17</sup> P. Rodríguez González, M.M. Marchante Gayón, J.I. García Alonso and A.Sanz-Medel. *Isotope Dilution Analysis for elemental speciation: a tutorial review*. Spectrochimica Acta Part B (2005), 60:151-207.

<sup>18</sup> Hinojosa Reyes L, Marchante-Gayón JM. García Alonso JI, Sanz-Medel A. *Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS*. J Anal At Spectrom (2003); 18(10):508-13.