

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III

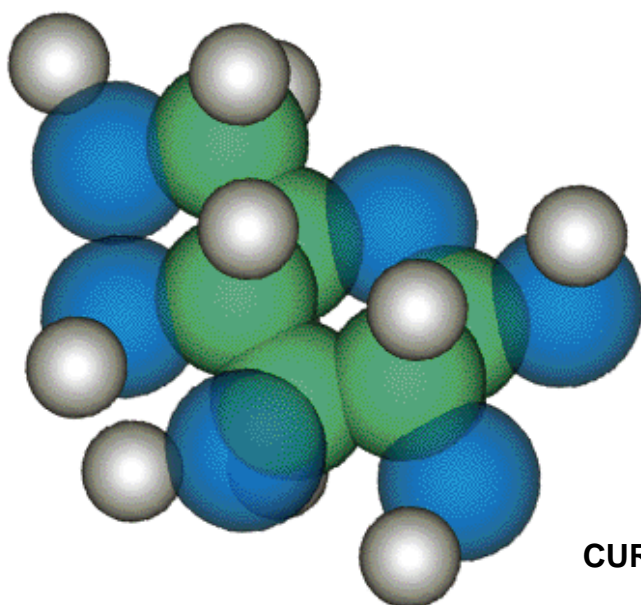
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CUADERNO DE PRÁCTICAS

REGULACIÓN DEL METABOLISMO

Grado en Nutrición y Dietética



CURSO ACADÉMICO 2014/2015

INDICE

1. Práctica #1:

Determinación cuantitativa de glucosa y valoración clínica

2. Práctica #2:

- Electroforesis de proteínas plasmáticas.
- Cuantificación de proteínas séricas por el método de Biuret

PRACTICA #1: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA Y VALORACIÓN CLÍNICA

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo. El nivel de glucosa es la cantidad de glucosa (azúcar) que contiene la sangre, también se denomina glucosa en suero ó glucemia y se mide en milimoles por litro (mmol/L) o en miligramos por decilitro (mg/dL).

En condiciones fisiológicas, la concentración de glucosa plasmática no debe sobrepasar los 11 mmol/L, incluso tras la ingesta de grandes cantidades de hidratos de carbono. Tras la ingesta de alimentos, la absorción intestinal de carbohidratos hace que las concentraciones de glucosa en sangre aumenten con rapidez y ello estimula la secreción pancreática de insulina. Gracias a la actividad hormonal, los adipocitos, las células musculares y los hepatocitos captan la glucosa sanguínea. La insulina controla el consumo y la movilización de compuestos energéticos en el estado postprandial, gracias a sus diversos efectos sobre las células sensibles a la hormona. Su efecto central es permitir la entrada de glucosa a las células, en particular del hígado, tejido graso y músculo, para su utilización ya sea en la vía oxidativa, en la cual da lugar a energía, agua y dióxido de carbono, o no oxidativa, en la que la glucosa es almacenada como glucógeno hepático o muscular.

Se considera que hay una intolerancia a la glucosa cuando se sobrepasa esta concentración en condiciones postprandiales, e hiperglucemia basal si la concentración de glucosa en ayunas está por encima de los valores normales. Si la alteración es grave, se excretan cantidades elevadas de glucosa por la orina ya que se sobrepasa la capacidad de los túbulos renales para reabsorberla. Esto lleva unido una sintomatología característica de polidipsia, polifagia y poliuria. En una fase más avanzada, si el control no es adecuado pueden aparecer micro o macroangiopatías. Este síndrome es definido como DIABETES y es el más común de los desordenes metabólicos, afectando al 5-10% de la población en las países occidentales.

La diabetes mellitus es un desorden metabólico crónico, caracterizado por niveles persistentemente elevados de glucosa en sangre, como consecuencia de una alteración en la secreción y /o acción de la insulina, que afecta además al metabolismo del resto de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Hasta el momento se han postulado varias clasificaciones de la diabetes, la última de las cuales fue emitida por un comité de expertos internacionales, reunidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), cuyos miembros clasificaron la enfermedad con base en la etiología de la misma.

Las normas de la ADA y de la organización mundial de la Salud (OMS) recomendaron las siguientes categoría de diabetes:

- Diabetes tipo 1
- Diabetes tipo 2
- Diabetes mellitus gestacional (DMG)
- Otros tipos de diabetes

Si bien existen varios tipos de diabetes, la gran mayoría de casos corresponde a dos clases principales; la diabetes mellitus tipo 1 y la tipo 2 . En la primera, el evento patogénico más relevante es la destrucción masiva de las células β del páncreas, de manera que la secreción de insulina es nula o insignificante. En la diabetes tipo 2, la deficiencia hormonal no es tan marcada y el trastorno principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la hormona.

La prueba bioquímica característica para el diagnóstico de la diabetes es la determinación de glucosa en sangre. Se determina en condiciones basales o tras la sobrecarga oral. La determinación de los niveles de glucosa en ayunas se considera de valor diagnóstico, y como ya se ha indicado, niveles por encima de 11mmol/L son indicativos de diabetes tipo 1.

La determinación de glucosa tras sobrecarga oral sirve para evaluar la tolerancia a la glucosa en aquellas personas que tienen niveles basales intermedios entre los fisiológicos y diabéticos. Para ello se administra al paciente 75 gr de glucosa por vía oral y se determinan los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos. En un individuo normal se debe alcanzar el máximo entre 30 y 60 minutos; a partir de este momento se produce un descenso gradual de forma que a los 120 minutos se regresa a valores basales. En los casos de disminución de tolerancia a la glucosa estos valores están elevados aunque no existe una frontera bien definida entre la respuesta fisiológica y la alterada. En general se considera que la concentración de glucosa a los 120 minutos es el valor con mayor capacidad discriminante, lo que permite clasificar como diabéticos a aquellos sujetos con valores mayores de 11 mmol/L y con disminución de tolerancia a la glucosa, los que tienen valores entre 7.8 y 11,1mmol/L

2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE LA HEXOQUINASA

La Hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por ATP a glucosa-6-fosfato (G6F). La glucosa-6-fosfato originada es reducida a 6-fosfogluconato en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH) con reducción paralela de NAD a NADH:



El aumento en la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

REACTIVOS

R 1 Tampón	Tris pH 7,5	4 mmol/L
	ATP	2,1 mmol/L
	Mg ²⁺	0,8 mmol/L
R 2 Enzimas	NAD ⁺	2 mmol/L
	Hexoquinasa (HK)	1000 U/L
	Glucosa-6-fosfato (G6F-DH)	1000 U/L

PREPARACIÓN DE REACTIVO ENZIMÁTICO

Se disuelve el contenido de un vial de R 2 en un frasco de R 1. Se tapa el vial y se mezcla suavemente hasta disolver su contenido.

PROTOCOLO

A partir de la disolución estándar de glucosa (100 mg/dl), se preparan las siguientes disoluciones para la curva patrón de glucosa:

Solución estándar **A** (100 mg/dl)

Solución **B** (40 mg/dl)..... 500 µl de solución **A** + 750 µl de H₂O

Solución **C** (20 mg/dl)..... 500 µl de solución **B** + 500 µl de H₂O

Solución **D** (10 mg/dl)..... 500 µl de solución **C** + 500 µl de H₂O

Tubo	Glucosa (100 μl)	H₂O	Reactivo Enzimático	Absorbancia (340 nm)
Blanco	-----	100 μ l	1 ml	
1	Sol. D (100 μ l)	-----	1 ml	
2	Sol. C (100 μ l)	-----	1 ml	
3	Sol B (100 μ l)	-----	1 ml	
4	Muestra 1 0 min (10 μ l)	90 μ l	1 ml	
5	Muestra 2 30 min (10 μ l)	90 μ l	1 ml	
6	Muestra 3 60 min (10 μ l)	90 μ l	1 ml	
7	Muestra 4 120 min (10 μ l)	90 μ l	1 ml	

PROCEDIMIENTO

- Pipetear en cada uno de los tubos las cantidades indicadas y agitar en vortex
- Incubar a 37°C en baño termostático durante 5 minutos.
- Parar la reacción añadiendo a todos los tubos 1 ml de NaCl 0.9 %
- Ajustar el espectrofotómetro a cero con el blanco y leer las absorbancias a 340 nm

CUESTIONES

- Representar la curva de calibrado poniendo en ordenadas absorbancias y en abcisas concentración de las soluciones de glucosa.
- Interpolar los valores de absorbancia de las muestras problema para determinar su concentración.
- Expresar los resultados en mg de glucosa/dl y en mmoles de glucosa /L
- Representar los valores de glucosa frente al tiempo e interpretar los resultados de la curva obtenida.

PRACTICA #2 PRIMERA PARTE. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

1.1. FUNDAMENTO

La electroforesis es una técnica muy empleada para la separación de proteínas en función, entre otros factores, de su carga eléctrica. Las proteínas, moléculas anfóteras, adquieren en medio básico una carga global negativa que hace que migren del cátodo hacia el ánodo. En particular, la electroforesis sobre membranas de acetato de celulosa es la más empleada en los análisis rutinarios de proteínas en líquidos biológicos, como las realizadas con fines diagnósticos en sangre y orina. Sus ventajas principales son la reproducibilidad y la sencillez. Su resolución, sin embargo es menor que la obtenida con otras técnicas electroforéticas.

A partir del plasma sanguíneo se obtienen habitualmente 5 fracciones :

- Albúmina
- α_1 globulinas
- α_2 globulinas
- β globulinas
- γ globulinas

Una vez obtenida la separación de distintos tipos de fracciones proteicas, se mide la cantidad de colorante que se combina con cada una de ellas, una vez que se ha eliminado la coloración de fondo. En el aparato de medida (**densitómetro**) se hace pasar a través de la tira una radiación luminosa, cuya intensidad se mide en una fotocélula, después de atravesar la tira. La absorción de radiación es proporcional al grosor o densidad de las bandas y, por tanto, a la concentración de proteínas en plasma.

1.2. MATERIALES

Soporte

Tiras de Acetato de celulosa (2,5 x 17 cm), que se conservan en disolución de metanol al 30% en agua desionizada.

Reactivos

- Tampón de electroforesis (Tris- hipurato, pH 8,8)
- Colorante Rojo Ponceau
- Decolorante (ácido acético 10%- metanol 45%)
- Transparentador (ac. acético 18%- metanol 82%). Preparar en el momento.

Otros materiales

- Fuente de alimentación
- Cubetas de electroforesis
- Aplicador semimicro
- Cubetas para baños
- Estufa
- Tijeras, placas de vidrio y papel de filtro

1.3. MÉTODO

1.
 - a) Diluir el tampón de electroforesis (250 mL + 750 mL H₂O)
 - b) Rellenar una cubeta con 100 mL del tampón anterior.
 - c) Rellenar la cubeta de electroforesis (se puede utilizar el mismo tampón para 4 migraciones)
2.
 - a) Diluir la disolución colorante (250 mL + 750 mL H₂O).
 - b) Preparar un baño con 100 mL de la disolución colorante (sirve para 10 tiras)
3. Preparar 3 baños con la disolución decolorante
4. Sacar la tira de acetato de celulosa de la disolución de metanol y absorber el exceso de metanol con un papel de filtro.
5. Sumergir la tira en el baño con tampón de electroforesis durante 10 min.
6. Absorber el exceso de tampón con papel de filtro y montar la tira en la cámara con la cara absorbente hacia arriba (esquina perforada hacia la derecha y hacia abajo) y situarla en la cubeta de electroforesis.
7. Aplicar la muestra con el semimicro aplicador. Para ello:
 - a) Tomar la muestra de suero
 - b) Aplicarla con cuidado sobre el borde catódico (negro)
 - c) Lavar el aplicador varias veces.
8. Cerrar la cubeta de electroforesis y conectarla al alimentador (negativo con negativo, positivo con positivo).
Encender la fuente de alimentación y aplicar 210 voltios durante 50 min.

(DURANTE ESTOS 50 MIN, HACER LA REACCION DEL BIURET).

9. Desconectar las cubetas de la fuente de alimentación y desenchufar ésta.
10. Introducir la tira de acetato de celulosa en la disolución colorante por la cara absorbente y dejarla durante 3 min.
11. Decolorar la tira utilizando los 3 baños decolorantes.
Sumergir la tira durante 3- 4 min en cada baño, agitando manualmente.
12. Introducir la tira en un baño con disolución transparentadora 90 segundos (nunca más de 2 min).
13. Colocar la tira sobre una placa de vidrio quitando las burbujas que queden entre ambas.
14. Introducir en una estufa a 60- 90 °C. Cuando la tira esté transparente, se esperan 5 min antes de sacarla.
15. Sacar de la estufa, dejar enfriar a temperatura ambiente y quitar el papel con una lanceta.
16. Leer las tiras en un densitómetro utilizando un filtro verde (530 nm).

PRACTICA #2 SEGUNDA PARTE. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS POR EL MÉTODO DE BIURET

1. INTRODUCCIÓN

Proteínas plasmáticas.

El plasma sanguíneo contiene en solución coloidal una gran cantidad de proteína, cuya concentración normal varía en función de la edad:

- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| a) Recién nacidos..... | 5,2 - 9,1 g/100 mL |
| b) Niños mayores de 6 años... | 5, 6 - 8,5 g/100 mL |
| c) Adultos..... | 6, 2 - 8,2 g/100 mL |

Dichas proteínas tienen diferente composición, presentándose en distintos estados de estabilidad e hidratación.

Las funciones generales de las proteínas del plasma se podrían resumir en cuatro puntos fundamentales;

- 1) Mantenimiento de la presión osmótica sanguínea.
- 2) Intervención en el equilibrio electrolítico.
- 3) Mantenimiento del pH.
- 4) Transporte de macromoléculas biológicas (ej. lípidos).
- 5) Función nutritiva o de recambio con proteínas tisulares.

Además de las funciones generales, citadas anteriormente, los diferentes tipos de proteínas plasmáticas, presentan funciones específicas, p. ej.:

- La albúmina actúa como reserva de aminoácidos.
- Las lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) transportan lípidos.
- Las gammaglobulinas intervienen en procesos inmunitarios.
- Fibrinógeno, fibrina y trombina intervienen en el proceso de coagulación sanguínea, etc...

Alteraciones de los valores normales de albúmina sérica.

La albúmina constituye aproximadamente el 70% del total de proteínas plasmáticas, oscilando sus valores normales entre 4-5,2 g/100 mL de plasma. No se conocen casos de “hiperalbunemia” siendo frecuente sin embargo las “hipoalbuminemias” (presentes en todos los tipos de disproteinemias) que aparecen en tres circunstancias patogénicas fundamentales:

1. Pérdidas cuantiosas por hemorragias, albuminuria y catabolismo elevado.
2. Síntesis defectuosa debido a hepatopatías.
3. Por carencia de materiales plásticos: deficiencias alimentarias, trastornos de absorción intestinal. Las “analbuminemias” (ausencia casi total de albúmina) aparecen en los siguientes casos.
 - Síndrome nefróticos.
 - Insuficiencia hepática avanzada: Cirrosis, Necrosis, Hepatitis, Colelitiasis obstructiva...etc.
 - Enteropatía exudativa: pérdida gastrointestinal de albúmina = enteritis, colitis, linfogranuloma. etc.

Métodos de valoración de proteínas.

Existen diferentes métodos de valoración cuantitativa de proteínas: Análisis de nitrógeno por el método de Kjendahl; precipitación controlada, absorción de ultravioletas, métodos colorimétricos.. etc. Los más frecuentemente utilizados en la clínica son estos últimos, entre los que se encuentran el método del Biuret (GORNALL y cols. 1949) y el método de Lowry (LOWRY y cols, 1951), cuya sensibilidad en la valoración cuantitativa oscila entre 1 - 200 microgramos para el método de Lowry y 0,25-200 miligramos para el método del Biuret.

2. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. METODO DEL BIURET

Fundamento.

La reacción del biuret, es una reacción coloreada producida por compuestos químicos como el biuret ($\text{NH}_2\text{-CONH-NH}_2$), etc, cuando son tratados con sales de cobre en medio alcalino (Rising y col, 1928).

La reacción fué primeramente observada por WIEDEMANN en 1848, sin embargo, fué SCHIFF a finales de siglo pasado, el pionero en el estudio del mecanismo químico de dichas reacciones.

El descubrimiento por RITTHAUSEN en 1873, de que las proteínas y péptidos adoptaban un comportamiento similar al del Biuret, al ser tratadas con los mismos reactivos, tuvo su aplicación práctica con el desarrollo posterior de un método sensible para la determinación cuantitativa de proteínas.

Este método, se fundamenta en la capacidad que presentan los “enlaces peptídicos” (...-CO-NH-...) de las proteínas y de los péptidos, para formar complejos con el ión Cu^{++} , en medio alcalino, de color rosa-violeta. La intensidad de la coloración es proporcional al número de enlaces peptídicos, y por tanto a la cantidad de proteína presente en la muestra analizada.

Reactivos y Materiales.

A) Reactivos

- * Sulfato de cobre: $\text{SO}_4 \text{Cu}_5 \text{H}_2\text{O}$.
- * Hidróxido sódico al 10%. NaOH (0.2 N).
- * Tartrato Sódico-Potásico: $\text{Na K C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{H}_2\text{O}$

El tartrato sódico-potásico, se emplea como agente estabilizador, ya que disminuye la cantidad de álcali necesaria para evitar la formación de precipitado de hidróxido cúprico. (SHAFFER y col 1933).

- * Albúmina sérica (1%).

B) Preparación del reactivo del Biuret

- 1) 1,5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato sódico-potásico, se llevan a un matraz aforado de vidrio de 1000 mL de volumen.
- 2) Se añaden 500 mL de agua destilada y se agita hasta su disolución total.
- 3) A continuación se añaden 300 mL de la solución de hidróxido sódico al 10%, previamente enfriada. Después de agitar se enrasa a 1000 mL con agua destilada.

C) Material necesario por alumno

- 11 tubos de ensayo.
- 3 pipetas de 1 mL.
- 1 pipeta de 5 mL.
- 1 frasco con solución estándar de albúmina al 1%
- 1 frasco con reactivo de Biuret.

Método (Recta de calibrado).

Consiste en medir la Densidad óptica (Absorbancia) de una serie de patrones de albúmina de concentración conocida.

Posteriormente representamos gráficamente los valores experimentales de absorbancias en ordenadas frente a las concentraciones conocidas de albúmina, con lo que obtenemos una línea recta.

Mediremos además, la absorbancia de la muestra problema, y al aplicarla sobre la curva estándar conoceremos, mediante el cálculo apropiado, su concentración proteica.

Tanto los puntos de la curva, como la muestra problema (suero bovino) se pipetearán por duplicado según el siguiente protocolo.

TUBO	CANTIDAD DE ALBÚMINA	ALB. 1%	SUERO	H ₂ O	BIURET	D.O. (550 mm)
B	-	-	-	1,0 mL	4 mL	
1	2 mg	0,2 mL	-	0,8 mL	4 mL	
2	2 mg	0,2 mL	-	0,8 mL	4 mL	
3	4 mg	0,4 mL	-	0,6 mL	4 mL	
4	4 mg	0,4 mL	-	0,6 mL	4 mL	
5	8 mg	0,8 mL	-	0,2 mL	4 mL	
6	8 mg	0,8 mL	-	0,2 mL	4 mL	
7	10 mg	1,0 mL	-	-	4 mL	
8	10 mg	1,0 mL	-	-	4 mL	
9	?	-	0,1 mL	0,9 mL	4 mL	
10	?	-	0,1 mL	0,9 mL	4 mL	

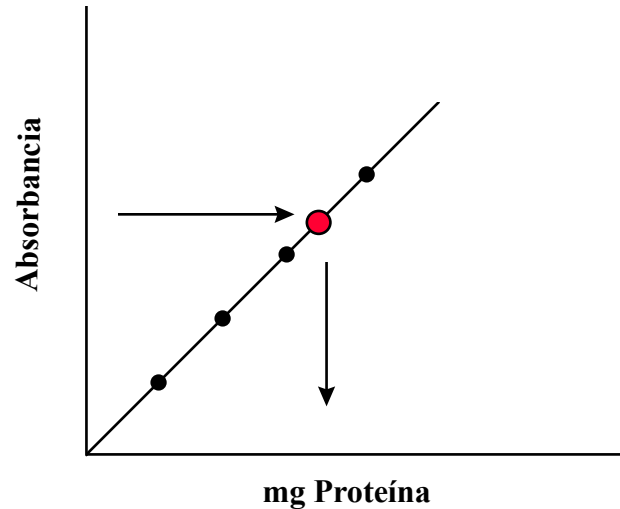
En primer lugar se pipetea la albúmina y el suero en los tubos correspondientes. A continuación se añade el agua destilada a cada tubo. Y por último se pipetea el reactivo de Biuret.

Se agitan los tubos y se lee la absorbancia en fotocolorímetro a una longitud de onda de 550 nm.

Los valores obtenidos los apuntará cada alumno en la columna correspondiente.

Resultados y cálculos.

Sobre papel milimetrado representamos la curva estándar. En ordenadas los valores obtenidos de densidad óptica (Absorbancia) y en abscisas los valores de concentración de proteína en mg. Determinaremos la concentración total de proteínas en el suero problema interpolando en la recta el valor de absorbancia del problema.



Cada alumno hará la transformación en gramos de proteína por 100 mL de suero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balcells, A. y cols. "Patología General" Ed. Marín. 1974
2. Balcells, A. "La clínica y el laboratorio". Ed. Marín. 1974
3. Gornall, A.G. y cols. J. Biol. Chemistry. 177 : 751. 1949
4. Lowry, O.H. y cols. J. Biological Chemistry. 193: 265. 1951
5. Plummer, D.T. "Introducción a la bioquímica práctica". pg. : 136. Ed: Mc Graw-Hill Latinoamericana. 1981
6. Rendina, G. "Técnicas de bioquímica aplicada". Pg. : 60. Ed. Interamericana. 1974
7. Rising, M.M., Johnson, C.A. J. Biological Chemistry 80 : 709. 1928
8. Ríthausen, H. J. Prakt. Chem. VII, 351, 1873
9. Shaffer y Somogyi. J. Biological Chemistry. 100 : 695. 1933
10. Tamarit, J. y Delso, J.L. "Prácticas de Bioquímica y Fisiología", pag. 51. Ed. Marban. 1977
11. Wiedemann, G. Ann. Chem. LVIII, 323, 1848.

CUESTIONES

1. ¿Qué sucedería si la electroforesis se hiciera exactamente igual pero a pH 4?
2. ¿Por qué unas proteínas se desplazan más que otras en una electroforesis?
3. En el método de Biuret. ¿Por qué hay más color en los tubos en los que es mayor la concentración de proteínas?
4. En el método de Biuret. ¿Por qué se lee la absorbancia a una longitud de onda concreta (550 nm)?

