

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

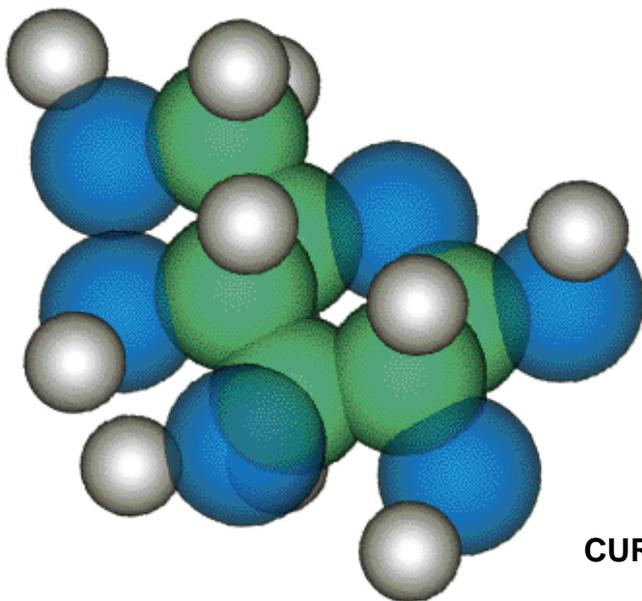
**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

## **CUADERNO DE PRÁCTICAS**

### **REGULACIÓN DEL METABOLISMO**

**Grado en Nutrición y Dietética**



**CURSO ACADÉMICO 2018/2019**

# **INDICE**

**PRÁCTICA #1: DETERMINACION DE COLESTEROL  
TOTAL, COL-HDL, COL-LDL y TRIGLICÉRIDOS**

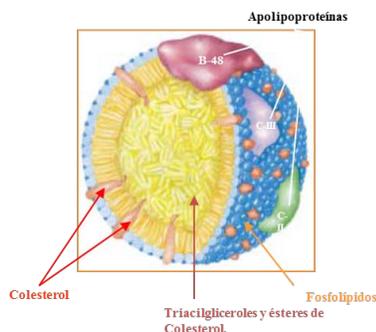
**PRÁCTICA #2: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA  
DE GLUCOSA Y VALORACIÓN CLINICA**

## PRACTICA:

### DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL, COL-HDL, COL-LDL y TRIGLICERIDOS

#### Introducción

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diverso que desempeñan funciones biológicas muy variadas. Los lípidos en el organismo provienen tanto de la síntesis “de novo” como de la dieta. Al ser compuestos apolares (insolubles en agua) necesitan un sistema de transporte para su distribución por el organismo. Para poder circular en el plasma, se unen a proteínas específicas (Apolipoproteínas) formando estructuras complejas, que se denominan lipoproteínas (Lps). Las Lps son estructuras esféricas cuyo núcleo central, hidrofóbico, contiene el colesterol esterificado y los triacilgliceroles (triglicéridos; TG) y está rodeado por una capa hidrofílica externa compuesta de fosfoacilgliceroles, proteínas y colesterol libre.



Existen diversos tipos de Lps. Las principales Lps del plasma son: Quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).

CLASE	COMPOSICIÓN		DIAMETRO (nm)	ORIGEN Y FUNCIÓN
	% LÍPIDOS	% PROTEÍNAS		
QM	85 % TG 7% PL 2% COL 2% EST. COL.	0.5-2%	Hasta 500	Transporte de TG de la dieta.
VLDL	55% TG 18% PL 7% COL 12% EST. COL.	8%	28-70	Transporte de TG sintetizados en el hígado.
IDL	23% TG 19% PL 9% COL 29% EST. COL.	19%	25-27	Formados por la digestión parcial de VLDL. Precusores de LDL.
LDL	6% TG 8% PL 22% COL 42% EST. COL.	22%	20-25	Formados por digestión de IDL. Transporte de colesterol a los tejidos periféricos.
HDL	3-5% TG 5-25% PL 3-33% COL 13-17% EST. COL.	40-56%	8-11	Transporte reverso del colesterol. Intercambio de apolipoproteínas y ésteres de colesterol con QM y VLDL.

Una concentración elevada de QM y/o VLDL por encima de valores normales, se asocia a una elevación en la concentración de triacilgliceroles. Un aumento de LDL caracteriza a la hipercolesterolemia familiar.

Cualquier alteración en los niveles normales de lípidos plasmáticos (fundamentalmente colesterol y triglicéridos) se conocen como **DISLIPEMIAS**. Son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.

Se clasifican según su etiología en dos grandes grupos:

1. **HIPOLIPIDEMIAS**: Raras y de origen genético
2. **HIPERLIPIDEMIAS**: Muy comunes en la población general y consideradas como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. A su vez las hiperlipidemias se clasifican en:

a. **Hiperlipidemias primarias**: se deben a una alteración primaria del metabolismo de las Lps, es decir a una alteración relacionada intrínsecamente con las rutas del metabolismo lipoproteico. Son de origen genético. Muchas veces en las primarias no llegamos a conocer el defecto genético responsable pero estos pacientes presentan rasgos (entre ellos el tipo de herencia) que permiten efectuar una orientación diagnóstica.

Las principales dislipidemias de causa genética son la Hipercolesterolemia Familiar, la Dislipidemia Familiar Combinada, la Hipercolesterolemia Poligénica, la Disbetalipoproteinemia, las Hipertrigliceridemias Familiares y el déficit de HDL. Su prevalencia a nivel poblacional es alrededor del 4 %, lo que sube a 30-40% en población portadora de cardiopatía coronaria.

b. **Hiperlipidemias secundarias**: consecuencia de otras patologías y/o factores ambientales. Las principales patologías causantes de hiperlipidemias secundarias son la obesidad, la Diabetes Mellitus, el hipotiroidismo, la colestasia, la insuficiencia renal y el síndrome nefrótico. En cuanto a los factores ambientales, los principales son cambios cuali y cuantitativos de la dieta y algunas drogas.

Sin embargo, puede ser que un mismo paciente tenga una causa primaria y secundaria de dislipemia. Esto sucede cuando la dislipemia persiste después de haber corregido la causa secundaria.

## **DIAGNOSTICO CLINICO**

Se basa en las alteraciones de los niveles séricos, de las lipoproteínas y de sus lípidos y/o de la presencia de depósitos de ellos en la piel y tendones. La determinación cuantitativa de las lipoproteínas es compleja, de tal manera que el diagnóstico se hace con la evaluación de sus lípidos componentes.

Lípidos Séricos:

- 1) **Test de quilomicrones**: El suero obtenido en condiciones de ayuno de 12 horas, se deja reposar durante 24 horas a 4º C. Cuando existen quilomicrones aparece un sobrenadante cremoso en su superficie. En condiciones normales este test es negativo.
- 2) **Colesterol total**: Su determinación refleja el contenido de colesterol de todas las fracciones lipoproteicas.
- 3) **Triacilgliceroles**: Refleja el contenido de triacilgliceroles de todas las fracciones lipoproteicas.

4) Colesterol de HDL: La precipitación química de las VLDL, IDL y LDL y la ulterior determinación del colesterol en el sobrenadante, permite cuantificar el colesterol de esta fracción.

5) Relación Colesterol total/Colesterol HDL (C-total/C-HDL): Utilizando la medición del colesterol total y la del colesterol de HDL, se puede estimar esta relación cuyo valor deseable como índice de riesgo cardiovascular debe ser menor de 4,5.

6) Determinación semicuantitativa de Colesterol de LDL y de VLDL: Se estima el colesterol de LDL, utilizando la fórmula de Friedewald.

$$C\text{-LDL} = C\text{Total} - (C\text{-HDL} + \text{Triacilglicerol}/5)$$

Todo ello expresado en mg/dl y siempre que los niveles de triglicéridos sean menores de 400 mg/dl. El C-LDL es considerado el mejor indicador clínico de riesgo cardiovascular.

Los valores de referencia son:

Magnitud	Referencia (mg/dl)
CT	< 200
Co-HDL	≥ 40 hombres ≥ 60 mujeres
Co-LDL	< 100 (100 – 129)
TG	< 150

### **SUPUESTO EXPERIMENTAL:**

Un trabajador de una empresa multinacional sin ningún síntoma patológico destacable acude a hacerse un chequeo rutinario. Durante la entrevista refiere al facultativo que debido a su tipo de trabajo hace una vida muy sedentaria y ha aumentado de peso en los últimos años. Por otro lado, su alimentación es rica en hidratos de carbono y lípidos. En cuanto a sus antecedentes familiares, su padre y su abuelo sufrieron enfermedades cardiovasculares.

1. Determinar en el suero del paciente los niveles de TG, colesterol total, colesterol HDL, LDL.
2. ¿Qué conclusiones se pueden sacar a la vista de los resultados?

### **PARTE EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO**

Un perfil lipídico, también denominado lipidograma y perfil de riesgo coronario, es un grupo de pruebas o exámenes diagnósticos de laboratorio clínico, solicitadas generalmente de manera conjunta, para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales, comúnmente en suero sanguíneo.

Entre otros parámetros que se pueden determinar están: colesterol total, colesterol transportado por las HDL (lipoproteínas de alta densidad), colesterol transportado por las LDL (lipoproteínas de baja densidad), triglicéridos y otras apoproteínas particulares.

Altos niveles de colesterol se asocian al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, sobre todo si está unido a LDL (también conocido como “colesterol malo”). En contraposición, la fracción de colesterol unido a las HDL se le conoce como “colesterol bueno”, porque estas lipoproteínas

son las encargadas de transportarlo al hígado donde es metabolizado y, posteriormente, es excretado por vía biliar y no está asociado con riesgo de enfermedad.

## 1. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL-HDL Y COLESTEROL-LDL

### 1.1. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES HDL Y LDL

Para determinar el colesterol presente en las fracciones HDL y LDL, primero es necesaria una separación selectiva de las lipoproteínas correspondientes con agentes de precipitación (ácido fosfotúngstico y magnesio) que precipitan las LDL y VLDL, mientras que las HDL permanecen en solución (figura 1).

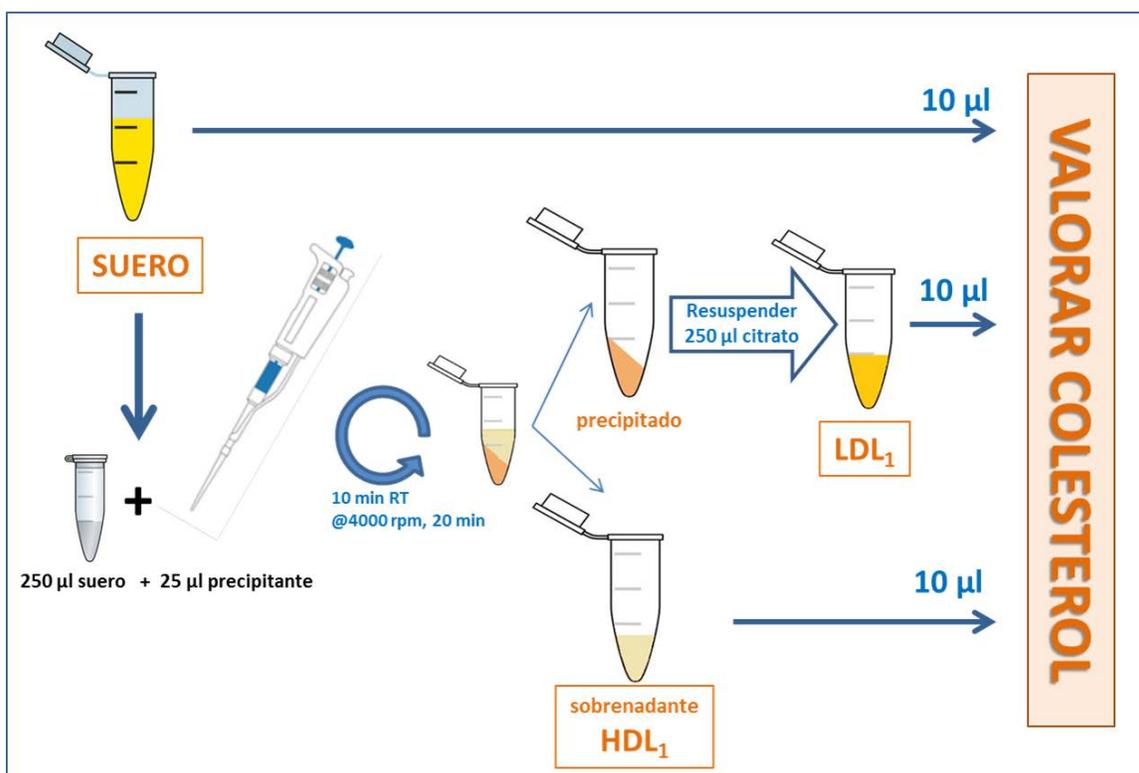


Figura 1: Esquema de precipitación y separación de fracciones

#### Procedimiento:

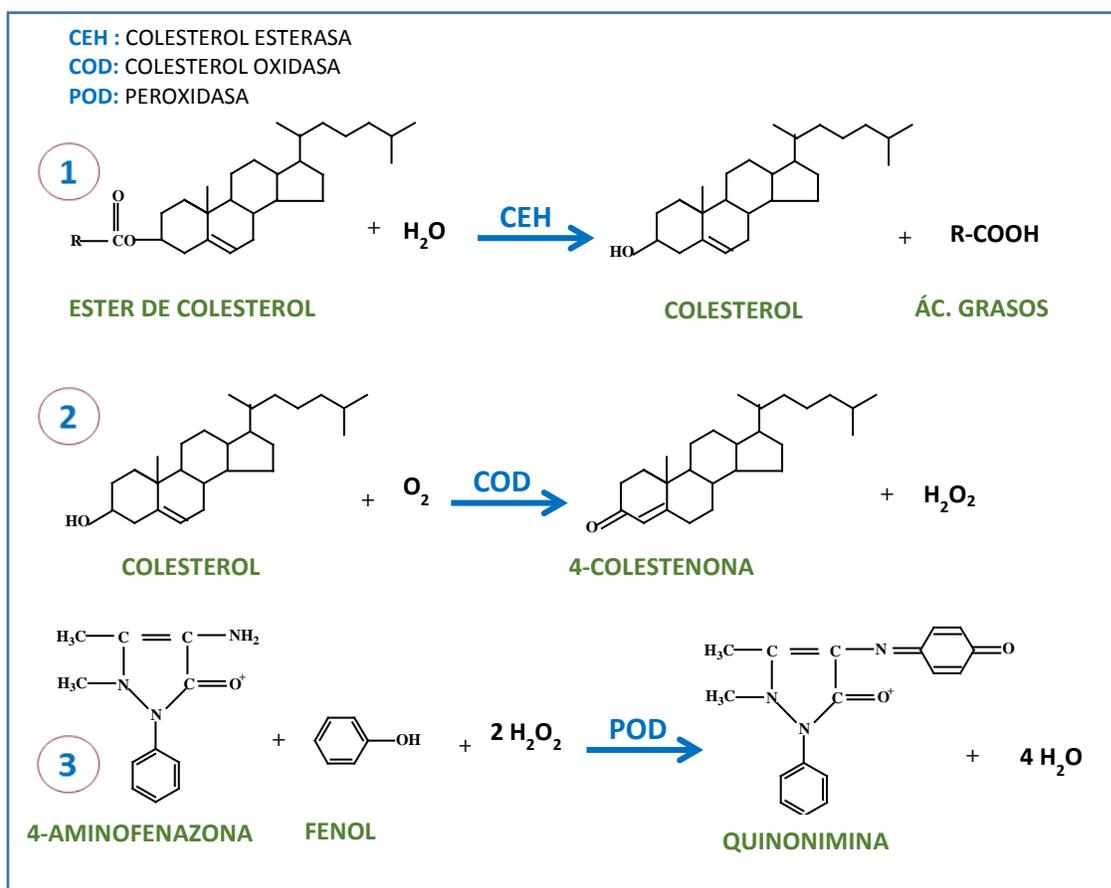
- 1) Pipetear en un eppendorf limpio y marcado como **LDL<sub>1</sub>**:
  - 250 µl de suero humano
  - 25 µl de agente precipitante
- 2) Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente
- 3) Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos
- 4) Separar el sobrenadante resultante en otro tubo marcado como **HDL<sub>1</sub>**
- 5) El precipitado que queda en el tubo LDL<sub>1</sub>, se resuspende con la pipeta, en 250 µl de tampón citrato.

## 1.2. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y SUS FRACCIONES

Para la cuantificación del colesterol se utiliza un kit comercial que incluye las enzimas y los sustratos necesarios para las reacciones que permite la valoración colorimétrica del contenido de colesterol (*Spinreact*).

El fundamento del ensayo es la acción combinada de tres enzimas para dar un producto final coloreado, con absorbancia máxima a 505 nm. La relación absorbancia/concentración es lineal hasta concentraciones de colesterol de 750 mg/100 mL.

Las reacciones que se producen son las siguientes:



- 1) Una colesterol ester hidrolasa (CEH) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres.
- 2) Una colesterol oxidasa (COD) oxida todo el colesterol a colestenoa y peróxido de hidrógeno
- 3) El peróxido de hidrógeno es sustrato de una peroxidasa (POD) que junto con 4-aminofenazona da lugar a la formación de una quinona roja. La cantidad de esta quinona (505 nm) es proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

**Procedimiento:**

En este punto se valorarán 3 muestras distintas:

- Colesterol total (muestra de suero original)
- Colesterol-HDL (sobrenadante del paso previo) (HDL<sub>1</sub>)
- Colesterol-LDL (precipitado resuspendido del paso previo) (LDL<sub>1</sub>)

Proceder como sigue:

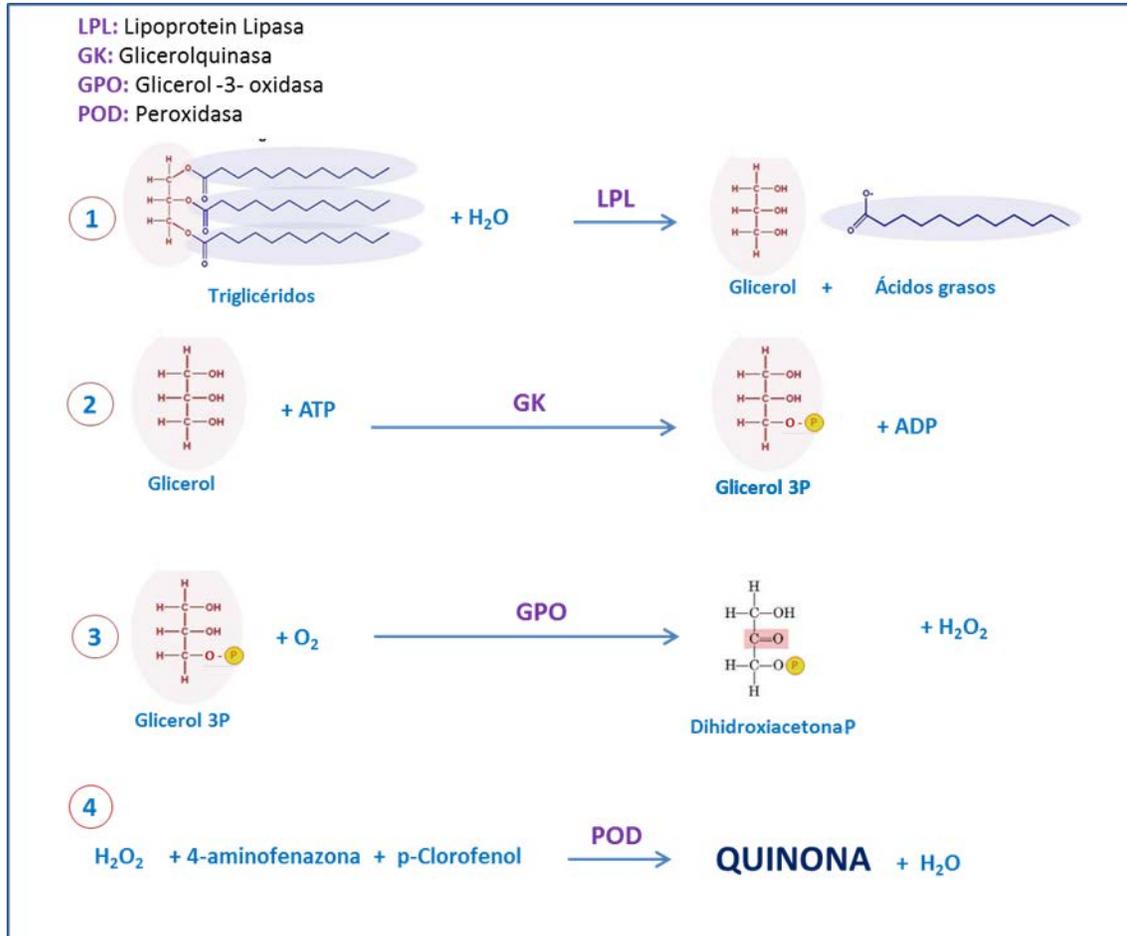
- 1) Preparar una serie de 5 tubos (rotular según el tipo de muestra) según el esquema:

TIPO DE MUESTRA	H <sub>2</sub> O Milli Ro	Estándar de colesterol	Suero total	HDL <sub>1</sub> (Sobrenadante)	LDL <sub>1</sub> (Precipitado disuelto)	Reactivo de trabajo-COL
Blanco	10 µl	--	--	--	--	1 ml
Estándar	--	10 µl	--	--	--	1 ml
Suero total	--	--	10 µl	--	--	1 ml
Sobrenadante (HDL)	--	--	--	10 µl	--	1ml
Precipitado disuelto (LDL)	--	--	--	--	10 µl	1ml

- 2) Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C
- 3) Leer la absorbancia a 505 nm frente al blanco (el color es estable durante 30 minutos) en cubetas de espectrofotómetro.
- 4) Calcular la concentración de colesterol en mmol/l (PM = 384.6 g/mol), sabiendo que la concentración del estándar de colesterol es 200 mg/dl)

## 2. DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROLES

Al igual que en el caso del colesterol, también se usa un kit comercial (*Spinreact*) que contiene los enzimas y sustratos necesarios para cuantificar colorimétricamente la cantidad de triacilgliceroles en la muestra:



- 1) Una lipasa hidroliza los TG generando glicerol y ácidos grasos libres.
- 2) El glicerol formado es sustrato de una glicerol quinasa que en presencia de ATP lo fosforila a glicerol-3-fosfato
- 3) El glicerol-3-P es oxidado a dihidroxiacetona-3-P por una glicerol 3-fosfato oxidasa, generándose también peróxido de hidrógeno
- 4) El peróxido de hidrógeno es el sustrato de una peroxidasa, que en presencia de p-clorofenol y 4-aminofenazona forman una QUINONA roja cuantificable a 505 nm. Esta quinona formada es proporcional a la concentración de TG presente en la muestra.

**Procedimiento:**

1. Preparar 3 tubos (rotular según el tipo de muestra) según el esquema:

TIPO DE MUESTRA	H <sub>2</sub> O Milli Ro	Estándar de TG	Suero	Reactivo de trabajo-TG
Blanco	10 µl	--	--	1 ml
Patrón	--	10 µl	--	1 ml
Muestra	--	--	10 µl	1 ml

2. Mezclar e incubar a 37°C durante 5 minutos
3. Leer la absorbancia a 505 nm frente al blanco en cubetas de espectrofotómetro.
4. Calcular la concentración de TG en mmol/l (PM medio = 885 g/mol), sabiendo que la concentración del estándar de triglicéridos es 200 mg/dl)



# PRÁCTICA: 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 túmulos 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 y 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 categorías 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  $\beta$  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 oxidada a 6P-gluconolactona 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**

<b>R 1</b> Tampón	Tris pH 7,5	4 mmol/L
	ATP	2,1 mmol/L
	Mg <sup>2+</sup>	0,8 mmol/L
<b>R 2</b> Enzimas	NADP <sup>+</sup>	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 H<sub>2</sub>O

Solución **C** (20 mg/dl).....500 µl de solución **B** + 500 µl de H<sub>2</sub>O

Solución **D** (10 mg/dl).....500 µl de solución **C** + 500 µl de H<sub>2</sub>O

<b>Tubo</b>	<b>Glucosa (100 <math>\mu</math>l)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Reactivo Enzimático</b>	<b>Absorbancia (340 nm)</b>
Blanco	-----	100 $\mu$ l	1 ml	
1	<b>Sol. D</b> (100 $\mu$ l)	-----	1 ml	
2	<b>Sol. C</b> (100 $\mu$ l)	-----	1 ml	
3	<b>Sol B</b> (100 $\mu$ l)	-----	1 ml	
4	<b>Muestra 1</b> <b>0 min</b> (10 $\mu$ l)	90 $\mu$ l	1 ml	
5	<b>Muestra 2</b> <b>30 min</b> (10 $\mu$ l)	90 $\mu$ l	1 ml	
6	<b>Muestra 3</b> <b>60 min</b> (10 $\mu$ l)	90 $\mu$ l	1 ml	
7	<b>Muestra 4</b> <b>120 min</b> (10 $\mu$ l)	90 $\mu$ 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.

