

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Medicina  
Universidad de Cantabria  
Curso 2010-2011

Alumno/a: \_\_\_\_\_

## ÍNDICE

	Página
Las prácticas de Bioquímica. El trabajo en el laboratorio .....	3
Notas sobre espectrofotometría .....	5
P.1 Estructura y propiedades ácido-base de los aminoácidos .....	7
P.2 Actividad enzimática y determinación de proteínas totales .....	15
P.3 Valoración de la diabetes: determinación de la glucemia y hemoglobinas glucosiladas .....	23

## LAS PRACTICAS DE BIOQUIMICA. EL TRABAJO EN EL LABORATORIO

Las prácticas de Bioquímica son una parte esencial en la formación de un alumno/a en esta materia. Para el buen aprovechamiento de las mismas es necesario leer con atención estas notas y, en particular, cada práctica **antes de entrar en el laboratorio**. En este guión, al final de cada protocolo se reserva un espacio para que el alumno/a anote sus observaciones, cálculos, haga las representaciones gráficas, etc. Asimismo, deberá contestar a las preguntas que se efectúen a lo largo del guión.

### Normas de seguridad que deben seguirse en el laboratorio

- No se puede fumar, comer ni beber en el laboratorio.
- La bata de laboratorio es, ante todo, un elemento de protección. Su utilización es obligatoria. La bata y, en general, cualquier prenda, deberá mantenerse abrochada. En ningún caso se utilizará la ropa del laboratorio fuera de éste (en la cafetería, biblioteca, etc.).
- Cuando lo indique el profesor/a, se utilizarán guantes, mascarillas y/o gafas de seguridad.
- Los cabellos deben llevarse recogidos, y no deben llevarse pulseras, colgantes ni mangas anchas durante la realización de las prácticas.
- No oler ni aspirar las sustancias en ningún caso.
- Nunca pipetear con la boca.
- Asegurarse de enfriar los materiales antes de aplicar directamente las manos para cogerlos.
- No manejar aparatos eléctricos con las manos mojadas o cuando se está sobre superficies húmedas.
- Tener especial cuidado en no eliminar por el desagüe, ni siquiera en pequeñas cantidades, productos que reaccionan violentamente con el agua, muy tóxicos, inflamables, pestilentes, lacrimógenos, no biodegradables y cancerígenos.

Es muy importante que el alumno/a aprenda a trabajar en el laboratorio con orden y limpieza. Para ello deben seguirse las siguientes recomendaciones:

- Evitar acumular objetos como prendas de ropa, carteras, mochilas, etc., en las áreas de trabajo.
- Si se cae algún reactivo sobre uno mismo, especialmente en los ojos, lavarse inmediatamente. En el laboratorio hay lavaojos y una ducha para estas emergencias. Si se cae accidentalmente cualquier líquido o reactivo sólido en la mesa y, especialmente sobre cualquier instrumento, debe limpiarse inmediatamente.
- Al finalizar la práctica, recoger los materiales y reactivos y apagar los equipos. Dejar las mesas limpias y las botellas de reactivos ordenadas en los estantes de las mesas.
- Deben lavarse las manos después de terminar las prácticas o en los descansos si implican la salida del laboratorio.

## Material o productos peligrosos

- **Manejo de material de vidrio:** examinar siempre el material de vidrio antes de usarlo. Ocasionalmente, podemos encontrarnos con material roto que puede causar cortes en las manos. Una vez usado el material de vidrio debe ser aclarado con agua y colocado en las bandejas de material sucio.
- **Sustancias tóxicas y corrosivas.** El manejo de productos químicos tóxicos o corrosivos, tales como sosa, ácidos fuertes, etc.; debe de llevarse a cabo con gran cuidado.  
¡ESTÁ PROHIBIDO PIPETEAR PRODUCTOS CON LA BOCA!
- **Solventes inflamables.** El riesgo de producir fuego en el laboratorio debe ser tenido en cuenta siempre que se utilicen solventes inflamables como alcohol, éter, acetona, etc. Cuando se trabaja con ellos hay que hacerlo lejos de los aparatos eléctricos o de la llama.
- **Centrífugas.** Cuando se utilicen centrífugas, hay que asegurarse de que los tubos están equilibrados.
- **Uso de material biológico.** Para la medida de volúmenes de sangre o suero hay que utilizar siempre pipetas automáticas. Todos los tejidos animales empleados deben ser, asimismo, manejados con cuidado. Pueden presentar riesgo inmunológico.

## NOTAS SOBRE ESPECTROFOTOMETRIA

La medida de la absorción de la luz por una sustancia en solución es un método importante en el análisis bioquímico. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia en solución. La absorción varía con la longitud de onda de la luz, debiendo efectuarse la medida usando luz de longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ), que es característica de cada sustancia. Las sustancias coloreadas tienen una  $\lambda_{\max}$  en la región visible del espectro. Otras sustancias absorben luz de otras regiones del espectro (por ejemplo los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta) y no son detectadas por el ojo humano.

Para conocer la concentración de una sustancia coloreada en solución se podría comparar visualmente la intensidad de color de dicha solución con una o varias soluciones de concentración conocida. Sin embargo resulta más preciso utilizar un aparato, el espectrofotómetro, que mide la cantidad de luz que atraviesa una solución.

### Ley de Lambert-Beer

La fracción de luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada es proporcional al espesor de la capa absorbente (paso óptico) y a la concentración de sustancia absorbente. Estos dos parámetros están combinados en la ley de Lambert-Beer:

$$\log I_0/I = \epsilon cl$$

$I_0$ : intensidad de la luz incidente.

$I$ : intensidad de la luz transmitida.

$\epsilon$ : coeficiente de absorción molar (en unidades de litros/mol x cm).

$c$ : concentración de la sustancia absorbente (en moles/l).

$l$ : paso óptico de la muestra que absorbe luz (en cm).

La expresión  $\log I_0/I$  se denomina absorbancia y se designa por  $A$ . Es una medida de la cantidad de luz absorbida por la solución. La transmitancia, que se expresa en porcentaje, es una medida la cantidad de luz que atraviesa la solución ( $\%T = I/I_0 \times 100$ ).

La ley de Lambert-Beer se cumple si la luz incidente es paralela y monocromática y si las moléculas de soluto y disolvente están orientadas al azar. Con una capa absorbente de paso óptico fijo la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.

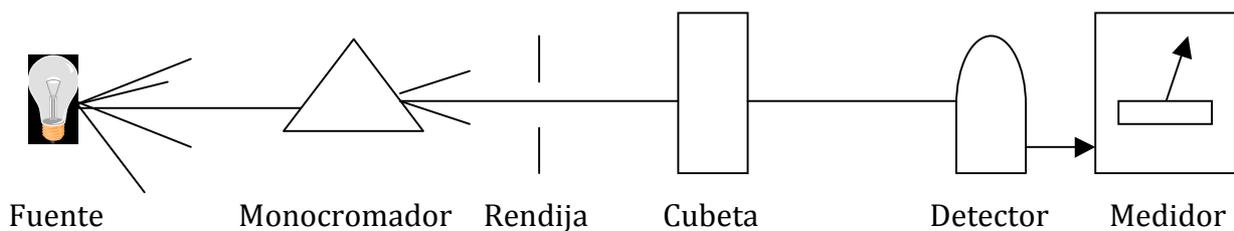
El coeficiente de absorción molar es una constante física que representa la absorbancia de una sustancia cuando el espesor de la capa absorbente es 1 cm y la concentración de la sustancia absorbente es 1 mol/l. El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente y la longitud de onda de la radiación.

## EL ESPECTROFOTÓMETRO

El espectrofotómetro es un aparato que mide la cantidad de luz que pasa a través de una solución. Está compuesto por las siguientes partes:

- **FUENTE DE ENERGIA:** lámpara que emite un haz luminoso que contiene un rango de longitudes de onda.
- **MONOCROMADOR:** se llama también selector de longitud de onda. Consiste en una red de difracción que separa las diferentes radiaciones procedentes de la fuente y selecciona la longitud de onda requerida.
- **RENDIJA:** es un dispositivo que sirve para seleccionar un haz fino de radiación que será el que incida sobre la muestra, evitando que la atraviese la luz difusa.
- **COMPARTIMENTO DE MUESTRA:** en él se coloca la solución problema, que va a absorber un haz fino de luz monocromática.
- **DETECTOR:** es un sistema que transforma la energía luminosa que atraviesa la muestra en energía eléctrica. Posee además un amplificador de la señal eléctrica recibida que posibilita su medición posterior.
- **MEDIDOR:** traslada la energía eléctrica producida en el paso anterior hasta un galvanómetro de aguja dónde figuran dos escalas graduadas; una mide la absorbancia y la otra el tanto por ciento de transmitancia. Cuando se mide la concentración de una solución se usa la escala de absorbancia. Los espectrofotómetros más modernos dan una lectura digital y algunos incluso pueden transformarla en concentración.

En la *Figura 1* se representa un esquema de un espectrofotómetro básico.



*Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro.*

## PRÁCTICA 1

### ESTRUCTURA Y PROPIEDADES ÁCIDO-BASE DE LOS AMINOÁCIDOS

#### Objetivos

- Aprender a medir el pH de una disolución.
- Preparación de tampones. Cálculo teórico y preparación práctica.
- Conocer la estructura de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. Diferenciar los isómeros L y D y los distintos estados de ionización, desarrollando sus estructuras en el plano y en tres dimensiones, utilizando modelos moleculares de bolas y varillas.
- Estudio experimental de las propiedades ácido-base de los aminoácidos.

Día 1. Explicación y propuesta de experimentos y ejercicios.

Día 2. Preparación de un tampón. Titulación de un aminoácido

Día 3. Estructura de los aminoácidos. Discusión de resultados.

#### 1. Medida del pH de una disolución

El pH metro es un sensor electroquímico que sirve para medir el pH de una disolución. Consta de dos electrodos, uno de vidrio y otro de calomelanos (cloruro de mercurio). Al medir el pH se mide la diferencia de potencial entre dos soluciones separadas por una fina membrana de vidrio. El electrodo de vidrio tiene un bulbo sensible, que se llena con HCl saturado con cloruro de plata. El potencial dentro de este electrodo es constante (pH 7), de manera que la medida va a depender solamente de la concentración de protones de la solución exterior. El alambre que se sumerge al interior permite conducir el potencial hasta un amplificador.



Figura 1. pHmetro de laboratorio.

## Calibración del pHmetro

El electrodo de vidrio debe calibrarse para asegurar su precisión. Se utilizan buffers de calibrado, de pH conocido.

Calibrar el pHmetro con los tampones pH 7,02 y pH 4, siguiendo las instrucciones del profesor/a.

## Precauciones

- El electrodo del pHmetro se conserva siempre sumergido en la solución de conservación (KCl 3M).
- Lavar y secar el electrodo cada vez que se cambia la solución en la que se sumerge.
- No debe dejarse el electrodo en seco más de 5 minutos.
- El bulbo del electrodo debe quedar sumergido completamente y no tocar las paredes o el fondo del vaso.

## 2. Preparación de soluciones tampón

Un tampón está compuesto por un ácido débil y su base conjugada. El pH del tampón depende de las proporciones de ácido y base. La ecuación de Henderson-Hasselbalch relaciona el pH con el pK<sub>a</sub> del ácido y las concentraciones de ácido y base:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log [\text{base}] / [\text{ácido}]$$

**Problema.** Partiendo de soluciones 0,1 M de ácido y base, calcular los volúmenes que tienen que mezclarse para preparar los siguientes tampones:

50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,68 (pK<sub>a</sub> = 7,2).

50 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,45 (pK<sub>a</sub>=4,75).

3.2.- Preparar los tampones según los cálculos anteriores: para cada tampón, medir con la probeta los volúmenes calculados de ácido y base, mezclarlos en un vaso de precipitados, agitar y medir el pH en el pHmetro.

3.3.- Comparar los valores de pH teóricos con los obtenidos experimentalmente.

### 3. Titulación de una solución de un aminoácido

Los aminoácidos son compuestos anfóteros, es decir, que en solución acuosa se comportan como ácidos o como bases, dependiendo del pH de la solución. Los aminoácidos poseen dos grupos ionizables (amino y carboxilo). El punto isoeléctrico es el valor medio de los pK<sub>a</sub>s de estos dos grupos. Los aminoácidos de carácter ácido (aspártico, glutámico) o básico (histidina, arginina, lisina, triptófano) poseen un tercer grupo ionizable, en la cadena lateral. Esto influye en su punto isoeléctrico.

Partiendo de un aminoácido en solución a pH extremo (básico), vamos añadiendo HCl 1M y midiendo el pH a intervalos hasta llegar a pH 1,5. Representando los valores de pH obtenidos frente al volumen de ácido añadido obtenemos la curva de titulación, que nos permite conocer los pK<sub>a</sub>s de los grupos ionizables y el punto isoeléctrico del aminoácido.

#### Procedimiento

- Lavar la bureta con agua destilada. Llenarla con HCl 1 M hasta el cero de la bureta.
- Añadir a un vaso de precipitados pequeño, 30 ml de la solución de aminoácido. Medir el pH inicial de la solución.
- Llevar a cabo la titulación añadiendo HCl desde la bureta en fracciones de 0,5 ml. Agitar con una varilla de vidrio después de cada adición de HCl.
- Anotar en una tabla el pH y el volumen de ácido correspondiente. Añadir ácido hasta llegar a pH 1,5 aproximadamente.

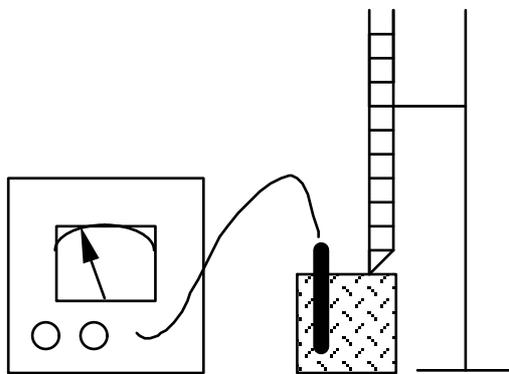
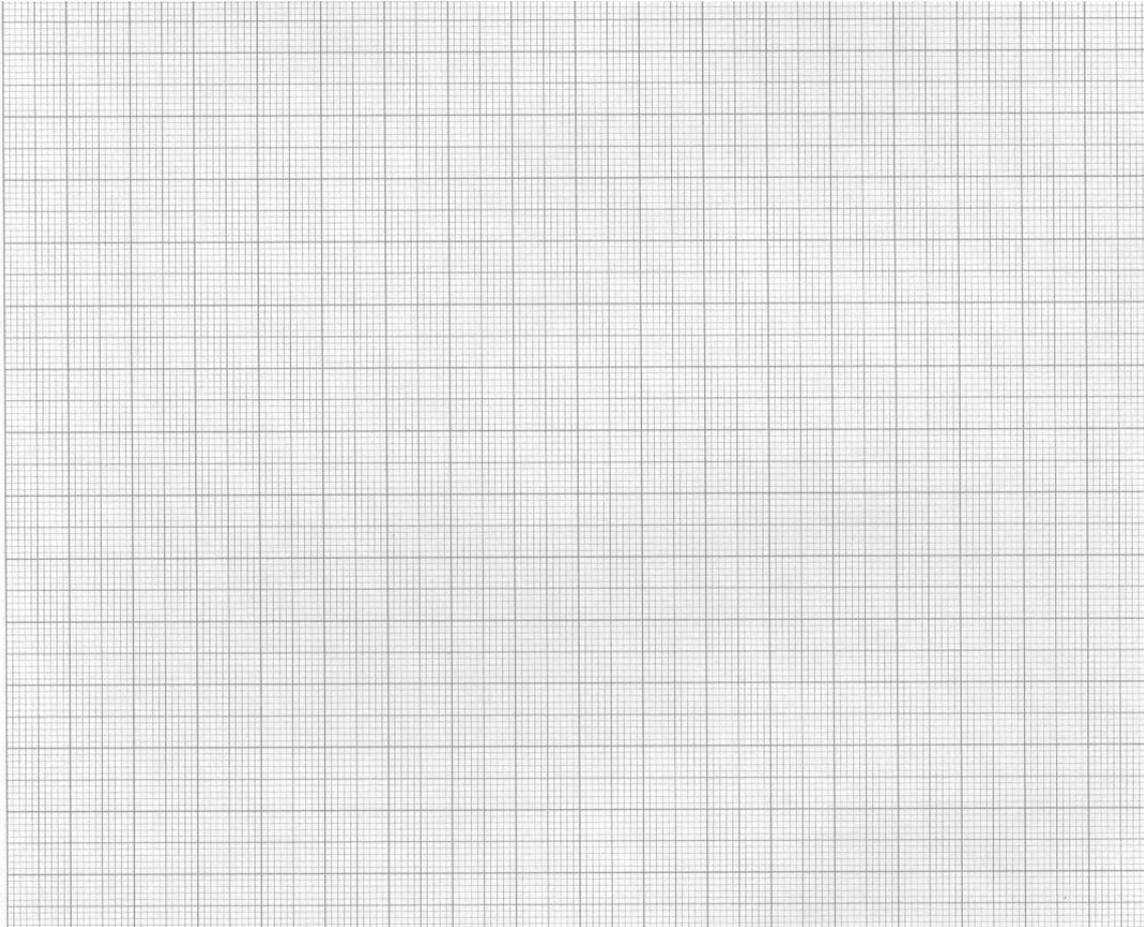


Figura 2. Esquema de la titulación de una solución.

Curva de titulación de la glicina:

**pH** \_\_\_\_\_ **ml HCl**



## Resultados

1. Representar los valores de pH (en el eje de ordenadas) frente al volumen de ácido añadido (en el eje de abscisas) en la titulación del aminoácido.
2. A partir de la representación gráfica, obtener los valores aproximados de los pKa de los grupos ionizables del aminoácido y su punto isoeléctrico (pI).
3. Indicar qué pKa corresponde al grupo amino y cual al carboxílico.
4. Escribir las formas de disociación de la glicina (las estructuras) e indicar qué carga presentará el aminoácido al pH inicial de la titulación, al pH igual al pI y al pH final.

## 4. Estructura de biomoléculas (aminoácidos y péptidos).

### Objetivos

- Conocer la estructura tridimensional de aminoácidos y péptidos.

Se utilizarán los modelos moleculares de bolas (elementos) y varillas (enlaces).

<u>Elementos</u>		<u>Color</u>
Hidrógeno	H	BLANCO
Carbono	C	NEGRO
Nitrógeno	N	AZUL
Oxígeno	O	ROJO
Azufre	S	AMARILLO
Fósforo	P	PÚRPURA

### Longitudes de enlace

En la escala que se utiliza 100 picómetros equivalen a 3 cm.

C - H, O - H, N - H, S - H	2.0 cm	_____
C = O	2.5 cm	_____
C = C, S - C, P - O	3.0 cm	_____
C - C, C - N, C - O	3.5 cm	_____

### **Estructura de aminoácidos y péptidos**

#### Formas D o L

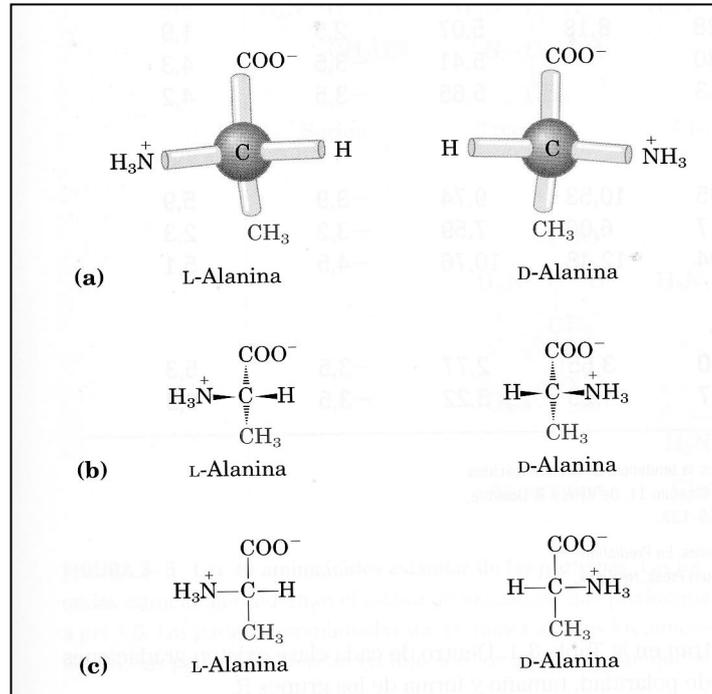
Busca el C $\alpha$  asimétrico, con el H orientado hacia ti.

Mira el orden de los sustituyentes en el sentido de las agujas del reloj:

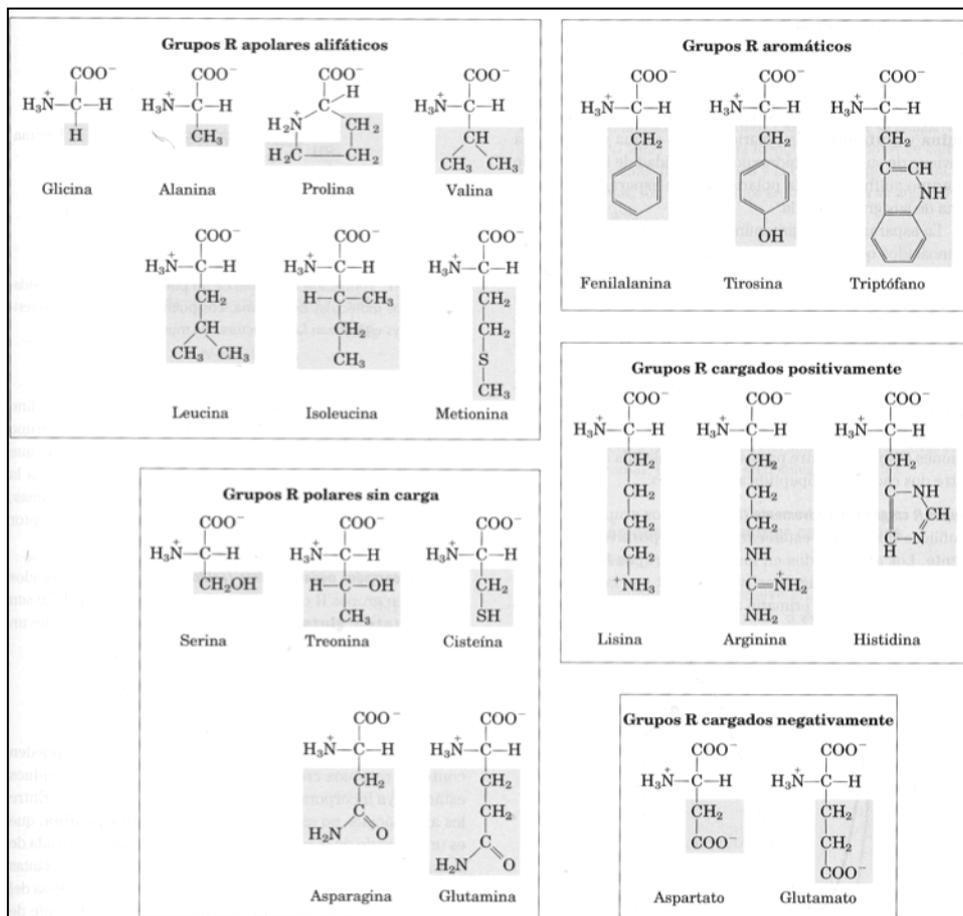
COO<sup>-</sup>-R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ..... forma L.

COO<sup>-</sup>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-R ..... forma D.

Estereoisomería de los aminoácidos



Aminoácidos estándar



## Resultados

1. Identificar los aminoácidos que se suministran:
  - a) Nombrar.
  - b) Decir si presentan forma D o L.
  - c) Dibujar la estructura (con el estado de ionización).
2. Construir un aminoácido. Cada pareja hará el mismo aminoácido, uno el D y otro el L, y comparará los enantiómeros.
3. Construir un tripéptido. Observar las propiedades del enlace peptídico. Dibujar la estructura, señalar los extremos N y C terminales, enlaces peptídicos y cadenas laterales.

## PRÁCTICA 2

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

#### Objetivos

- Introducir en la determinación de la concentración de proteínas en plasma sanguíneo.
- Entender y practicar los principios de la espectrofotometría.
- Aprender a manejar pipetas automáticas.
- Familiarizarse con el concepto de actividad enzimática y su utilización en clínica.
- Calcular velocidades de reacción.
- Utilizar métodos gráficos para el cálculo de  $K_M$  y velocidad máxima de los enzimas.

#### 1. Introducción a la determinación de proteínas totales

La **sangre** está formada por una solución acuosa que contiene moléculas de tamaño variable y diversos tipos de elementos celulares. Los elementos formes de la sangre se encuentran formando una suspensión en agua denominada **plasma**. Aunque el plasma es el medio natural de las células sanguíneas, la mayoría de las determinaciones químicas se hacen en **suero**. Las proteínas del plasma pueden clasificarse en dos grupos: las que son sintetizadas por el hígado (albúmina) y las inmunoglobulinas (producidas por las células plasmáticas de la médula ósea). El plasma humano tiene una concentración en proteínas de 60-80 g/L (frecuentemente se expresa en g/dL; 6-8 g/dl). Casi la mitad de esta proteína plasmática es **albúmina**, cuyo rango de concentración es 35-45 g/L. La albúmina es una proteína de 62.000 D que actúa como proteína de reserva, además de importante transportador (ácidos grasos, bilirrubina y fármacos) y regulador osmótico. Es producida por el hígado. Su concentración aumenta en casos de deshidratación y disminuye en casos de ascitis/edema y daño hepático severo.

La determinación de la concentración de proteínas en sangre puede ser llevada a cabo por diferentes métodos. En esta práctica vamos a utilizar uno de los métodos que se utilizan con más frecuencia: el método de Biuret. En él la disolución de proteína se mezcla con un reactivo que determina que aparezca o se intensifique un color (azul) que se cuantifica midiendo la absorbancia a una determinada longitud de onda frente a un blanco de reactivo. El color generado es poco estable y depende de las condiciones de reacción, por lo que hay que realizar una curva patrón con soluciones de una proteína de concentración conocida (albúmina bovina).

La base teórica de la aplicación de la espectrofotometría para medir la concentración de una sustancia en solución se explica en la Introducción de este Manual de Practicas.

#### Materiales

- Soluciones de suero sanguíneo A y B de concentración desconocida.
- Soluciones de proteína patrón (albúmina de suero bovina) de concentraciones conocidas.
- Reactivo de Biuret.
- Pipetas.
- Tubos.
- Agitadores.
- Rotulador.
- Espectrofotómetros (Colorímetros).

## Determinación por el método de Biuret

La concentración de proteínas se medirá utilizando el método del Biuret, que se basa en la formación de un complejo coloreado o cromóforo, de color azul-púrpura, entre el ión cobre y los enlaces peptídicos a pH alcalino. Se requiere un mínimo de dos enlaces peptídicos para la formación del complejo coloreado, que se mide a 550 nm. Es un método poco sensible pero muy preciso, ya que la abundancia de grupos peptídicos (por unidad de masa de proteína) es prácticamente la misma en cualquier proteína.

### Método

1) Numerar 7 tubos.

2) Añadir al tubo	1	100 µl de agua destilada (tubo "blanco").	
" "	2	100 µl de solución de proteína	20 g/L.
" "	3	" µl " " "	40 g/L.
" "	4	" µl " " "	60 g/L.
" "	5	" µl " " "	80 g/L.
" "	6	" µl " " "	problema A.
" "	7	" µl " " "	problema B.

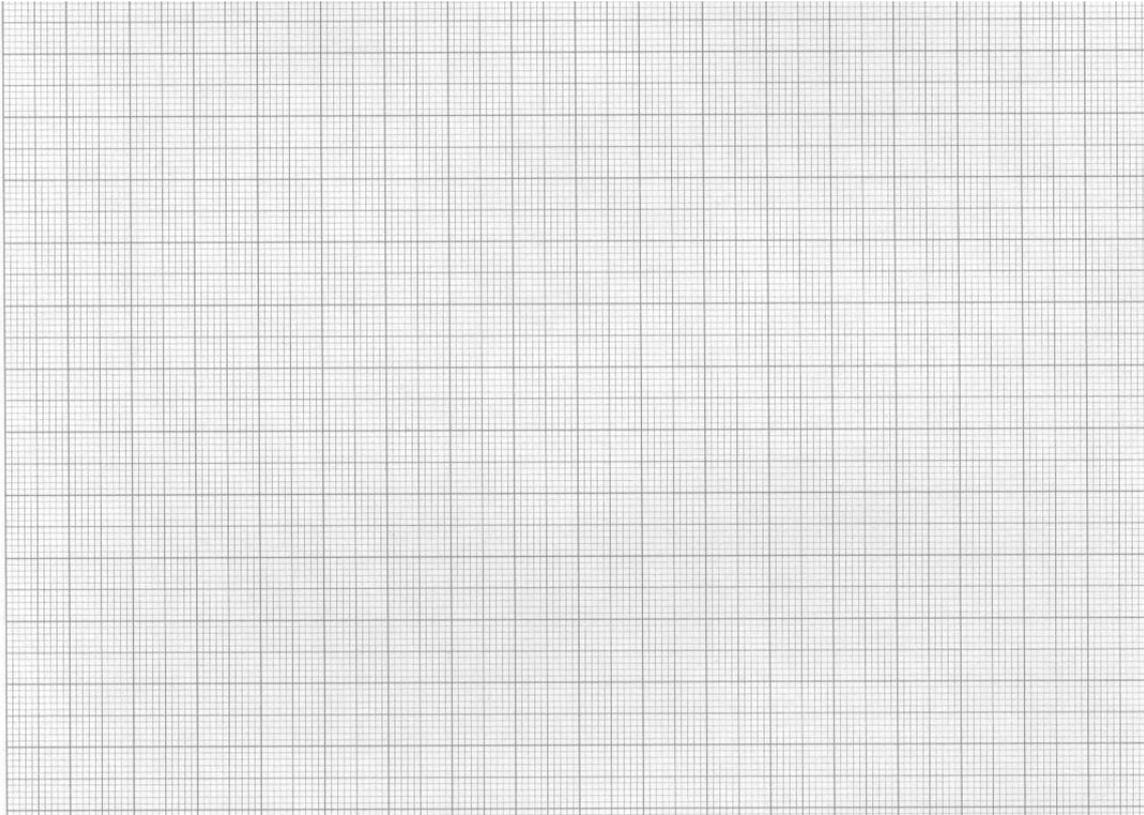
3) Añadir 4 ml de reactivo de Biuret a todos los tubos.

4) Mezclar el contenido de cada tubo.

5) Esperar 5 min. para que se desarrolle el color. Medir la absorbancia a 550 nm ajustando a cero con el tubo 1 ( blanco).

## Resultados

- En una hoja de papel milimetrado construir una gráfica de A550 (eje y) frente a concentración de proteína (eje x) de las soluciones patrón (tubos 2-5). Marcar el eje de las x en g/l de proteína.
- Determinar la concentración de las soluciones problema A y B interpolando en la gráfica patrón los valores de las soluciones problema A y B. Expresarlo en g/L.



## 2. Introducción al estudio de la cinética enzimática. Fosfatasa Alcalina

Los enzimas son los catalizadores de las reacciones bioquímicas. La medida de la actividad de un enzima y la comprensión de las variables que la afectan es importante no sólo para entender la biología de la célula sino también para el diagnóstico clínico. Cuando se producen lesiones celulares como inflamación o necrosis de los tejidos, ciertas enzimas pasan al plasma y sus niveles en él aumentan. Estos niveles enzimáticos en plasma se analizan para detectar la enfermedad y llegar al diagnóstico diferencial. Una concentración anormalmente alta de una enzima en sangre (reflejada en una alta actividad enzimática) puede ser debida a la destrucción de células de un tejido rico en dicho enzima o al aumento del número de células, como ocurre en los tumores. Por el contrario una baja actividad enzimática puede indicar un trastorno del tejido en cuestión. Los niveles enzimáticos también son útiles para vigilar el curso del tratamiento. Por tanto, la enzimología clínica es un aspecto fundamental del laboratorio clínico.

En esta práctica, emplearemos el enzima fosfatasa alcalina como modelo. Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas que presentan su máxima actividad a pH 9-10,5 y catalizan la hidrólisis de ésteres monofosfato. La reacción enzimática general de la fosfatasa alcalina es:

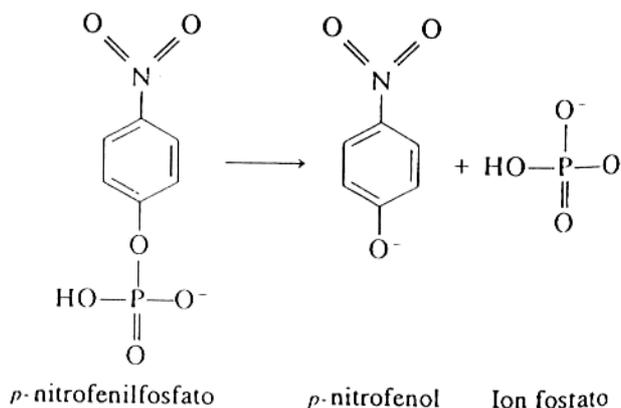


Las distintas fosfatasas alcalinas son isoenzimas, catalizan la misma reacción aunque poseen propiedades diferentes. Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos humanos tales como hueso, placenta, intestino, bazo y riñón y se desconoce su función biológica precisa. Los niveles de fosfatasa alcalina en plasma son la suma de los isoenzimas procedentes de los distintos órganos. Los valores normales de actividad fosfatasa alcalina en plasma son de 30 a 100U/L ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}$  de suero). El aumento de actividad fosfatasa alcalina en plasma se observa en diversas afecciones y su significado clínico se relaciona principalmente con la detección de enfermedades óseas (tumores óseos, osteomalacias) y hepáticas (obstrucción biliar, cáncer).

Además en esta práctica aprenderemos a calcular los dos principales parámetros cinéticos de los enzimas (constante de Michaelis y velocidad máxima) para lo cual se utilizará la representación de dobles recíprocos desarrollada por Lineweaver y Burk.

## Descripción de la práctica

En la presente práctica se usará suero como fuente de fosfatasa alcalina. La actividad enzimática se medirá utilizando el p-nitrofenil-fosfato (p-NFF) como sustrato. Por acción del enzima éste se hidroliza a fosfato y p-nitrofenol (pNF) según la siguiente reacción:



El p-nitrofenol (pNF) en solución alcalina es amarillo y su concentración puede ser determinada espectrofotométricamente. La absorbancia de la solución (intensidad del color amarillo) es una medida de la concentración del producto.

La práctica tiene dos partes:

1. *Construcción de la curva patrón del p-nitrofenol.* Se determinará la relación entre absorbancia y concentración del p-nitrofenol.
2. *Efecto de la concentración de sustrato.* Se calculará la  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fosfatasa alcalina.

## Materiales

- Tubos y pipetas.
- Agua destilada.
- Tampón Tris 10 mM pH 9,6.
- Soluciones de p-nitrofenol (pNF).
- Soluciones de p-nitrofenil-fosfato (p-NFF).
- NaOH 0,2N.
- Suero humano.
- Espectrofotómetro.
- Baño a 37°C.
- Calculadora.

## 1. Recta patrón de p-nitrofenol

Preparar los siguientes tubos patrón de p-nitrofenol (pNF, producto):

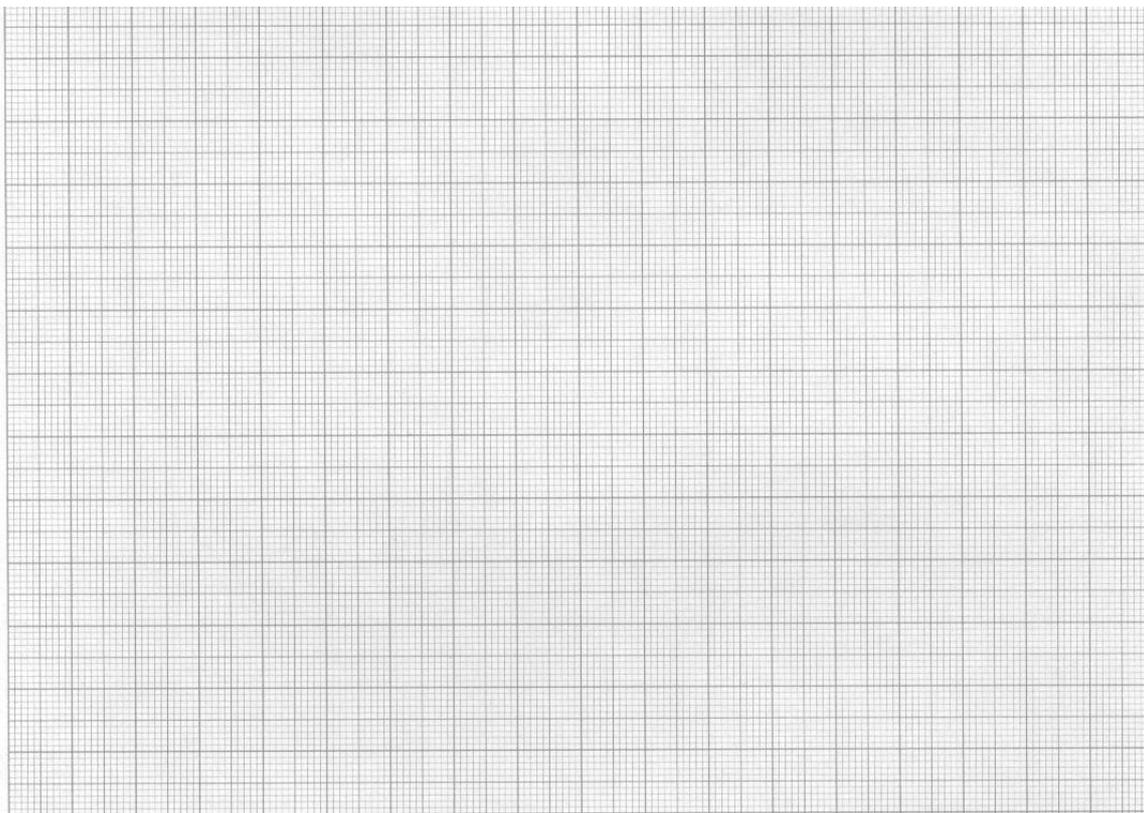
TUBO	Blanco	1	2	3	4
Tris pH 9,6	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml
Agua destilada	1 ml				
Soluciones patrón pNF		1ml (15 $\mu$ M)	1ml (30 $\mu$ M)	1ml (60 $\mu$ M)	1ml (90 $\mu$ M)

- Mezclar bien.
- Seleccionar en el espectrofotómetro la longitud de onda de 400 nm (máximo de absorción del pNF).
- Ajustar el "cero" de absorbancia con el tubo del blanco.
- Medir la absorbancia de todos los tubos y anotar los valores obtenidos.

## Resultados

Representar gráficamente la recta patrón: absorbancias (en ordenadas) frente a concentraciones de p-nitrofenol (en abscisas).

### Recta patrón



## 2. Efecto de la concentración de sustrato y cálculo de la $K_m$ y $V_{max}$

Preparar 6 tubos marcados convenientemente y añadir lo siguiente:

TUBO	1	2	3	4	5	6	
T Tris pH 9,6	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	(ml)
Agua destilada	1	---	---	---	---	---	"
PNFF *	---	1(2,5)	1(5)	1(7)	1(10)	1(15)	"
Suero	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	"

\* Volúmenes en ml. 1(2,5) significa 1 ml de una solución 2,5 mM de p-nitrofenol fosfato

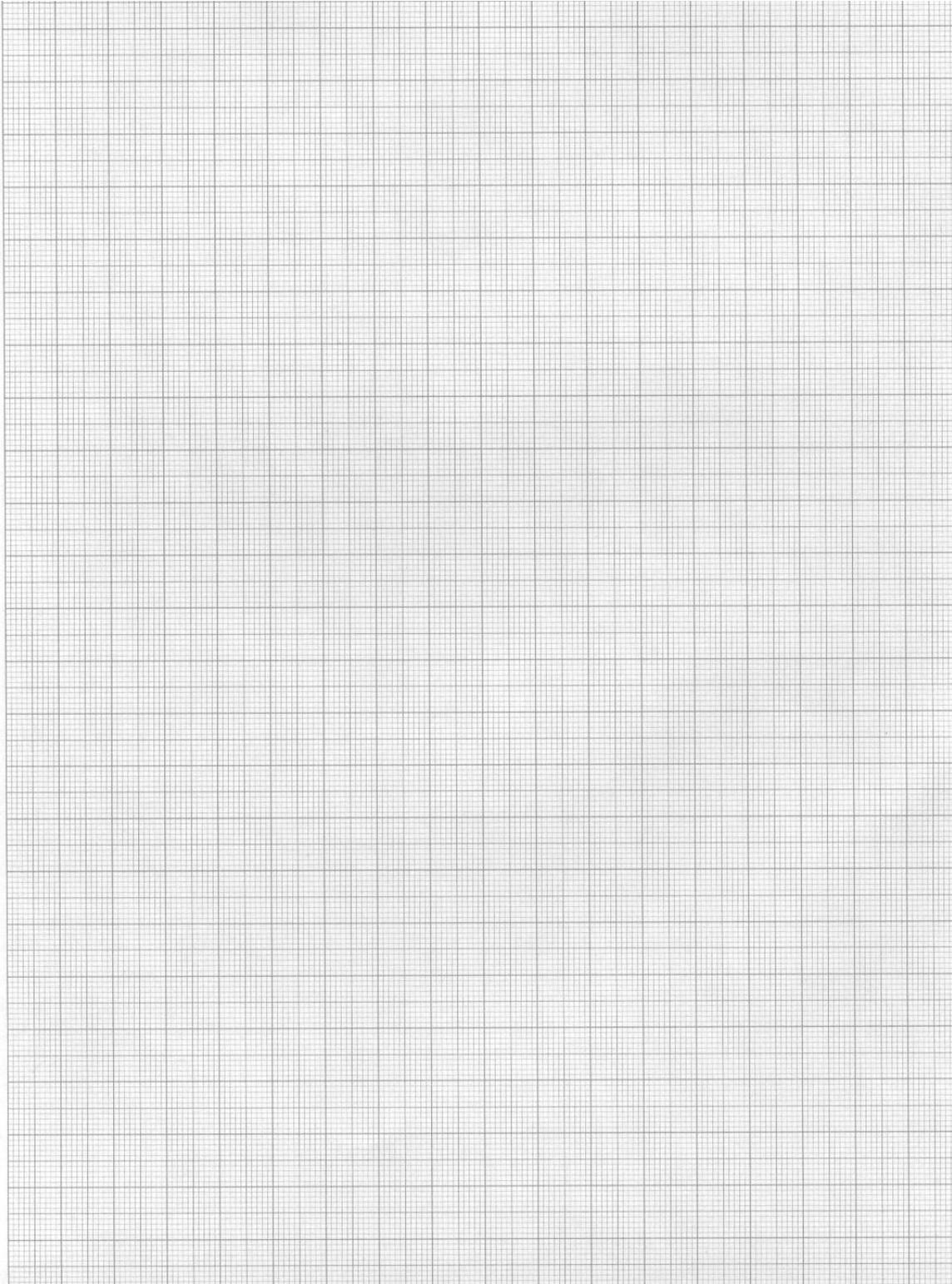
- Mantener los tubos en hielo. Mezclar bien e incubar 5 min a 37°C.
- Añadir 0,3 ml NaOH 0,2N para detener la reacción. Mezclar.
- Ajustar el "cero" del spectronic con el tubo del blanco y medir la  $A_{400}$  nm.

### Resultados

- Calcular la velocidad inicial ( $V$ ) en cada tubo expresada en nmoles p-N-fenol/min.
- Representar  $1/V$  frente a  $1/S$  (representación de Lineweaver-Burk) en la gráfica de la página siguiente.
- Calcular la  $K_m$  y  $V_{max}$ . ¿Cuáles son sus unidades?

	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
[S]					
$A_{400nm}$					
[pNF] calculada en la recta patrón					
$V_0$ (nmoles pNF/min)					
$1/[S]$					
$1/V_0$					

Representación de  $1/V$  frente a  $1/S$



## PRÁCTICA 3

### VALORACIÓN DE LA DIABETES: DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA Y HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

#### 1. Introducción general

El mantenimiento de la glucemia, (concentración de glucosa en suero o plasma) dentro de niveles fisiológicos en los organismos superiores es fundamental para el funcionamiento de todos los órganos, al ser la glucosa un metabolito energético principal para la mayoría de las células, prioritario para las neuronas e imprescindible para los hematíes.

La coordinación de los procesos metabólicos implicados en este cometido está regulada mediante la relación entre las hormonas insulina y glucagón.

En personas sanas, tras ingerir glucosa por vía oral o parenteral esta glucosa pasa a la sangre aumentando su concentración basal. Este aumento activa el mecanismo regulador hormonal que por acción, fundamentalmente, de la insulina, hormona pancreática de tipo polipeptídico, inducirá un aumento de la utilización de glucosa, aceleración de la glucogenogénesis y disminución de la glucogenólisis, o inducirá la síntesis y almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo.

En la entrada inducida por insulina de la **glucosa** en el interior de las células participa el transportador GLUT4 inducible por insulina.

En el caso de que la producción de insulina esté disminuida, la glucosa no puede ser utilizada por las células, ya que no entra fácilmente en la célula, lo cual ocasiona niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia); así ocurre en las personas que sufren diabetes del tipo denominado "dependiente de insulina" o "tipo 1".

El diagnóstico de la diabetes dependiente de insulina se basa en antecedentes, síntomas clínicos y comprobación de una hiperglucemia significativa. Los valores de referencia en humanos son de 60-110 mg/dl de glucosa en plasma en individuos sanos. Las determinaciones de glucemia basal permiten el diagnóstico de la diabetes, pero constituyen valores puntuales y aislados en el tiempo que no reflejan los niveles medios de glucemia ni la duración de la misma. Por lo tanto, es necesario disponer de pruebas que indiquen el grado del control metabólico de la enfermedad a corto y medio plazo. Estas pruebas están basadas en el fenómeno de unión de la glucosa a diversas proteínas como albúmina, colágeno, hemoglobina, etc. Esta glucosilación tiene lugar por una reacción no enzimática. La intensidad de la glucosilación depende de varios factores, siendo los más importantes los niveles medios de glucemia, la duración de la hiperglucemia, la vida media de las proteínas y la concentración de éstas. Como consecuencia, la medida de la glucosilación proteica constituye un buen marcador bioquímico del grado de compensación del enfermo diabético.

El objetivo de esta práctica es la valoración de la diabetes mediante la determinación de los niveles de glucosa en plasma y de hemoglobinas glucosiladas. Como modelo se emplearán ratas diabéticas, en comparación con ratas control. La diabetes en la rata se provoca mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (45 mg/Kg de peso). La estreptozotocina actúa provocando la destrucción de los islotes  $\beta$  del páncreas, por lo que ocasiona una diabetes de tipo 1 o dependiente de insulina.

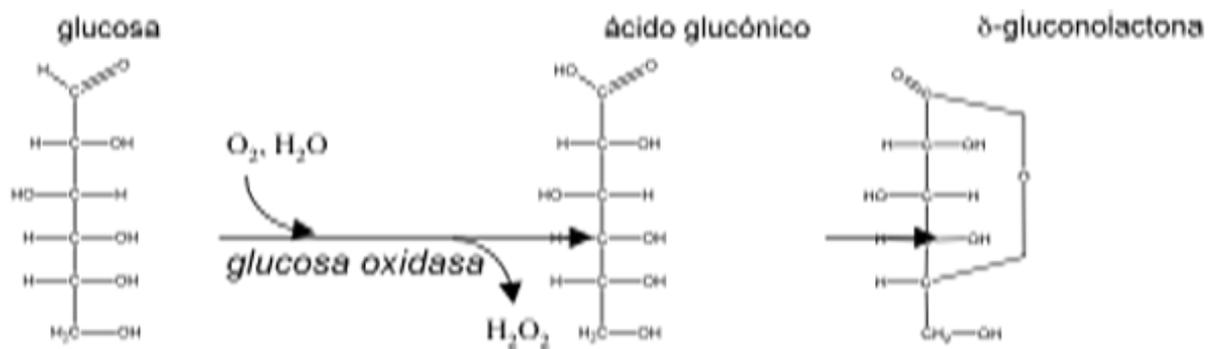
**Con el fin de no prolongar con tiempos muertos la jornada de prácticas se recomienda comenzar con la preparación y empaquetamiento de la columna cromatográfica para la separación de Hemoglobinas, ver Parte B, 2.**

## Parte A DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

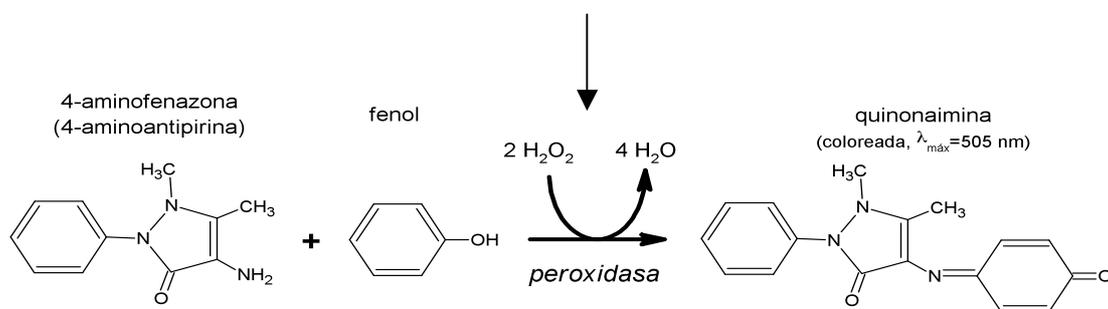
### Descripción de la práctica

En esta práctica se utilizará el método de la glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD) para medir los niveles de glucosa sanguínea de ratas diabéticas y controles. En el método GOD-POD, en un primer paso la *glucosa oxidasa* cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la *peroxidasa* para oxidar a la 4-aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente.

El esquema de la reacción es el siguiente:



2 X



### Materiales

- 6 tubos de ensayo.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.
- Disolución patrón de glucosa 0,4 mg/ml.
- Disolución de coloración que contiene:
  - Glucosa oxidasa.
  - Peroxidasa.
  - 4-Aminofenazona.
  - Fenol.
  - Tampón Tris pH 7,4.
- Plasma de ratas normales y/o diabéticas.

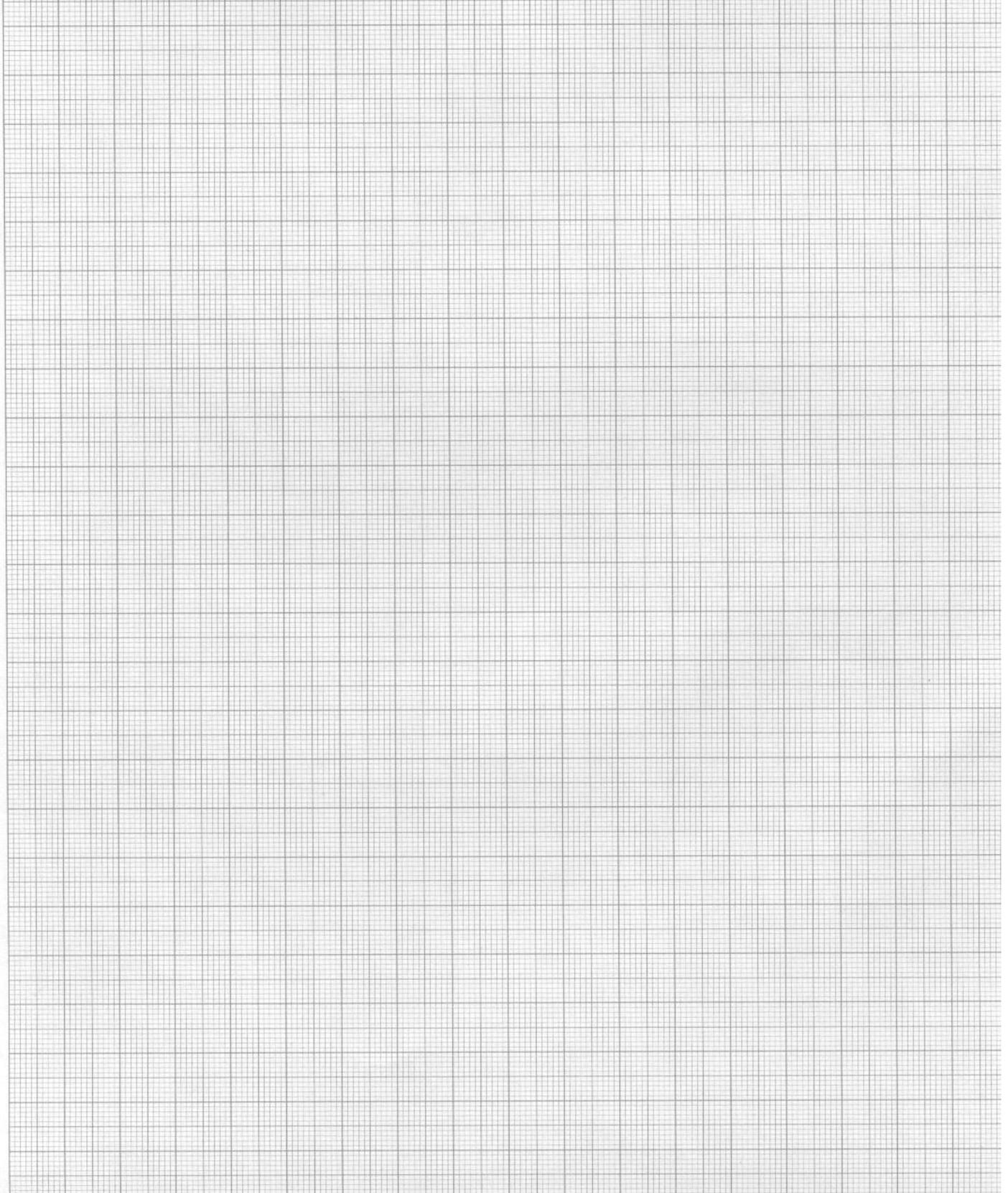
## Procedimiento experimental

1. Preparar la recta patrón con la disolución patrón de glucosa y el correspondiente volumen de agua hasta un total de 200  $\mu$ l, como se indica en la tabla.
2. En otro tubo mezclar 10  $\mu$ l de plasma + 190  $\mu$ l de agua ( ver tubo n<sup>o</sup> 6 en la tabla inferior).

Tubo n <sup>o</sup>	Patrón Glucosa (0,4 mg/ml)	Agua destilada	Solución GOD-POD	Absorbancia 505 nm	$\mu$ g de Glucosa
1	0 $\mu$ l (Blanco)	200 $\mu$ l	1,8 ml		
2	25 $\mu$ l	175 $\mu$ l	1,8 ml		
3	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l	1,8 ml		
4	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1,8 ml		
5	150 $\mu$ l	50 $\mu$ l	1,8 ml		

Tubo n <sup>o</sup>	Plasma	Agua	Solución GOD-POD	Absorb. 505 nm	$\mu$ g de Glucosa	Conc.Glucosa $\mu$ g/ $\mu$ l plasma	Conc.Glucosa mg/dl plasma
6	10 $\mu$ l	190 $\mu$ l	1,8 ml				

3. Añadir **1,8 ml** de disolución de coloración de glucosa oxidasa-peroxidasa (**reactivo GOD-POD**) a los 6 tubos.
4. Mezclar el contenido de los tubos e incubarlos **10 minutos** en el baño a **37°C**.
5. Secar bien los tubos. Leer las **absorbancias** de los patrones y de la muestra a **505 nm** utilizando como blanco el tubo n<sup>o</sup> 1.
6. Construir la **recta de calibrado** representando en el papel milimetrado las **absorbancias a 505 nm** (eje Y) frente a los  $\mu$ g de glucosa (eje X).
7. Extrapolando en la recta de calibrado, calcular los  $\mu$ g de glucosa en el tubo problema. Calcular los  $\mu$ g de glucosa/  $\mu$ l de plasma.
8. Calcular la concentración de glucosa del plasma problema. Expresarla en **mg/dl**. Comparar los resultados de glucemia obtenidos con los de los otros compañeros. Identificar los valores de glucemia normales y los de diabéticos.



Representación: A<sub>505nm</sub> (ordenadas) frente a mg de glucosa (abcisas).

## Parte B

### DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

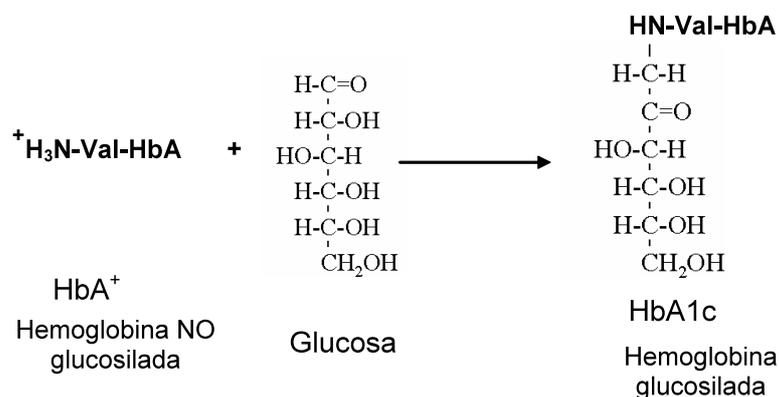
#### Descripción de la práctica

El control de la diabetes no se valora solamente por el control glucémico, sino que hay otra serie de parámetros, como la Hemoglobina Glucosilada (Hb A1c), que indican el grado de control que, a largo plazo, ha mantenido el paciente diabético.

La hemoglobina (Hb) de los seres humanos adultos está constituida principalmente por: Hb A (97% del total), Hb A<sub>2</sub> (2,5%) y Hb F (0,5%). La Hb A está constituida por 4 cadenas polipeptídicas: 2 globinas α y 2 globinas β. La hemoglobina glucosilada es una fracción de la hemoglobina A normal del adulto, que tiene la propiedad de unir, de forma irreversible, cantidades de glucosa proporcionales a la concentración glucémica. Al conjunto de todas ellas se les denomina hemoglobina A1 o “hemoglobina glucosilada”. Dentro de la hemoglobina A1 se pueden separar varias fracciones, HbA1a, HbA1b y Hb A1c, siendo la de mayor interés y la que se encuentra en un porcentaje más elevado la Hb A1c, que es la que se encuentra unida a la glucosa de manera más específica.

La Hb A1c es el resultado de la glucosilación de la hemoglobina normal (Hb A), como consecuencia de la reacción no enzimática entre la glucosa presente en el plasma y los grupos amino de la hemoglobina, como se muestra en la figura. La unión de glucosa a la valina N-terminal de las cadenas β de la HbA da lugar a la Hb A1c, que es la más abundante de las HbA1 (aproximadamente el 80%).

La cantidad de hemoglobina glucosilada es proporcional a la concentración de glucosa en sangre, por lo que en la diabetes hay mayor proporción de Hb A1c de lo normal. Los valores de referencia en humanos oscilan de 5,5-8,5 % en individuos sanos y del 12-20 % en diabéticos no controlados. Entre los factores que condicionan la intensidad de la glucosilación podemos destacar: la concentración de glucosa sanguínea, el tiempo que se mantiene esa cantidad de glucosa y la vida media de la proteína. En el caso de la hemoglobina, y teniendo en cuenta que la vida media del glóbulo rojo es aproximadamente de 120 días, su determinación nos servirá para evaluar el control de las cifras medias de glucosa en sangre que ha mantenido un diabético durante los 2 a 3 meses precedentes. Cuanto menor sea el nivel de hemoglobina glucosilada, mejor es el control del diabético, y mejor se podrán prevenir las posibles complicaciones a largo plazo de la diabetes. Además los valores de hemoglobina glucosilada no están influidos por las fluctuaciones diarias de glucosa sanguínea ni tampoco por el ejercicio ni por la ingesta reciente de alimentos.





## 2. Preparación y empaquetamiento de las columnas de Cromatografía (esta parte es lo primero que se realiza en el laboratorio, para aprovechar el tiempo)

- Dar vuelta a las columnas y mantenerlas con el tapón hacia abajo durante 10 minutos.
- Colocar la columna sobre un tubo largo de vidrio.
- Retirar los tapones superior e inferior de la columna. Bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla, con ayuda del extremo plano de una pipeta. Dejar go-tear justo hasta que se vea desaparecer el líquido en la parte superior de la columna (alcanza la superficie de la resina) desechando el eluido.
- No dejar que se seque la columna.

## 3. Fraccionamiento de las hemoglobinas

- Aplicar cuidadosamente sobre la columna 50  $\mu$ L del hemolizado y dejar que el líquido sea absorbido completamente (desaparece por la parte superior).
- Añadir a la columna 200 ml de la **solución de lavado** para arrastrar los posibles restos del hemolizado y dejar que penetren en la columna (desaparece, por la parte superior).
- Desechar el eluido.
- Se necesitan 2 tubos de vidrio para recoger la hemoglobina glucosilada (HbA1c) y la normal (HbA). Rotular convenientemente los tubos para no confundirlos como tubo 1 y tubo 2.

### 3.1. Separación de la hemoglobina glucosilada **HbA1c**.

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 1 para recoger la fracción de HbA1c.
- Añadir a la columna 2 ml de **solución de lavado (tampón fosfato)** y dejar que todo el líquido salga de la columna. Una vez que desaparezca el líquido por la parte superior, retirar el tubo 1.

### 3.2. Elución de la hemoglobina no glucosilada **HbA**

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 2 para recoger la fracción de HbA.
- Añadir a la columna 2 mL de la **solución de elución (NaCl)** y recoger todo el líquido eluido de la columna, hasta que desaparezca por la parte superior.

## 4. Determinación cuantitativa de las hemoglobinas (absorbancia a 415 nm, pico de absorción de la hemoglobina)

- Preparar tres tubos de ensayo limpios.
- En un **tubo** de ensayo añadir 3 ml de agua destilada (**blanco**).
- Pasar el contenido del **TUBO 1** a un tubo de ensayo.
  - Medir su absorbancia a 415 nm frente al agua destilada. (fracción de hemoglobinas glucosiladas, HbA1c).
- La absorbancia del **TUBO 2** es muy alta, por lo que hay que diluir,
  - Dilución de la muestra:
    - Pasar 1 ml del eluido a un tubo de ensayo; añadir 2 ml de agua destilada (dilución 1:3).
    - Agitar.
    - Medir la absorbancia frente a agua destilada (Tubo blanco) a 415 nm. Ésta es la fracción de hemoglobinas no glucosiladas, HbA)
      - multiplicar el valor de absorbancia obtenida por tres.

## 5. Resultados

Cálculo del porcentaje de hemoglobina glucosilada frente a hemoglobina total:

$$\frac{A_{415} \text{ HbA1c}}{A_{415} \text{ Hb total}} \times 100 = \% \text{ HbA1c}$$

Comparar los resultados de hemoglobinas glucosiladas con los de los otros compañeros. Identificar los valores de hemoglobinas glucosiladas de muestras normales y de diabéticos.

## 6. Completar

Se ha realizado un cromatografía de ..... utilizando una resina con grupos con carga .....

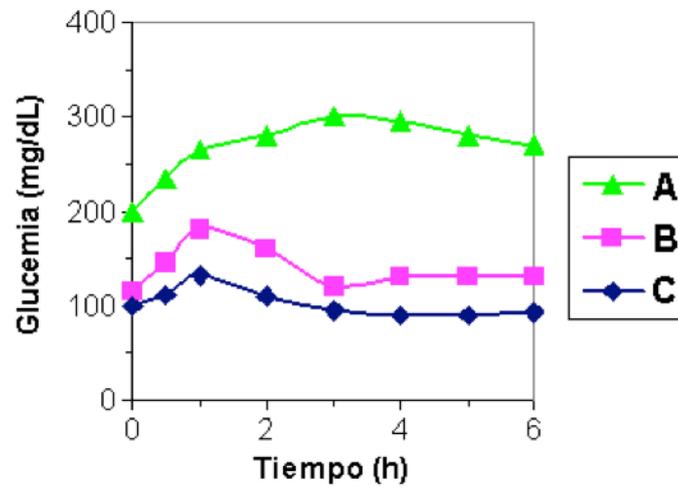
En el tubo 1 se ha recogido la hemoglobina ..... (Hb.....), que al tener carga ..... no ha quedado retenida en la columna. Esta carga ..... se debe a la unión de la ..... al grupo N-terminal de la .....

En el tubo 2 se ha recogido la hemoglobina ..... (Hb .....), que al tener carga ..... quedó retenida en la columna.

Con la solución de elución (.....) hemos desplazado a la hemoglobina ..... de la resina.

La absorbancia a 415 nm es debida a .....

**Ensayo de tolerancia a la glucosa**



Se realiza un ensayo de tolerancia a la glucosa (o curva de glucemia) a 3 personas diferentes, midiendo la glucemia en diferentes momentos tras la toma oral de 100 g de glucosa disuelta en agua.

Asigna las curvas obtenidas (A, B y C) a las siguientes situaciones:

- Paciente sano.
- Diabetes leve.
- Diabetes grave.