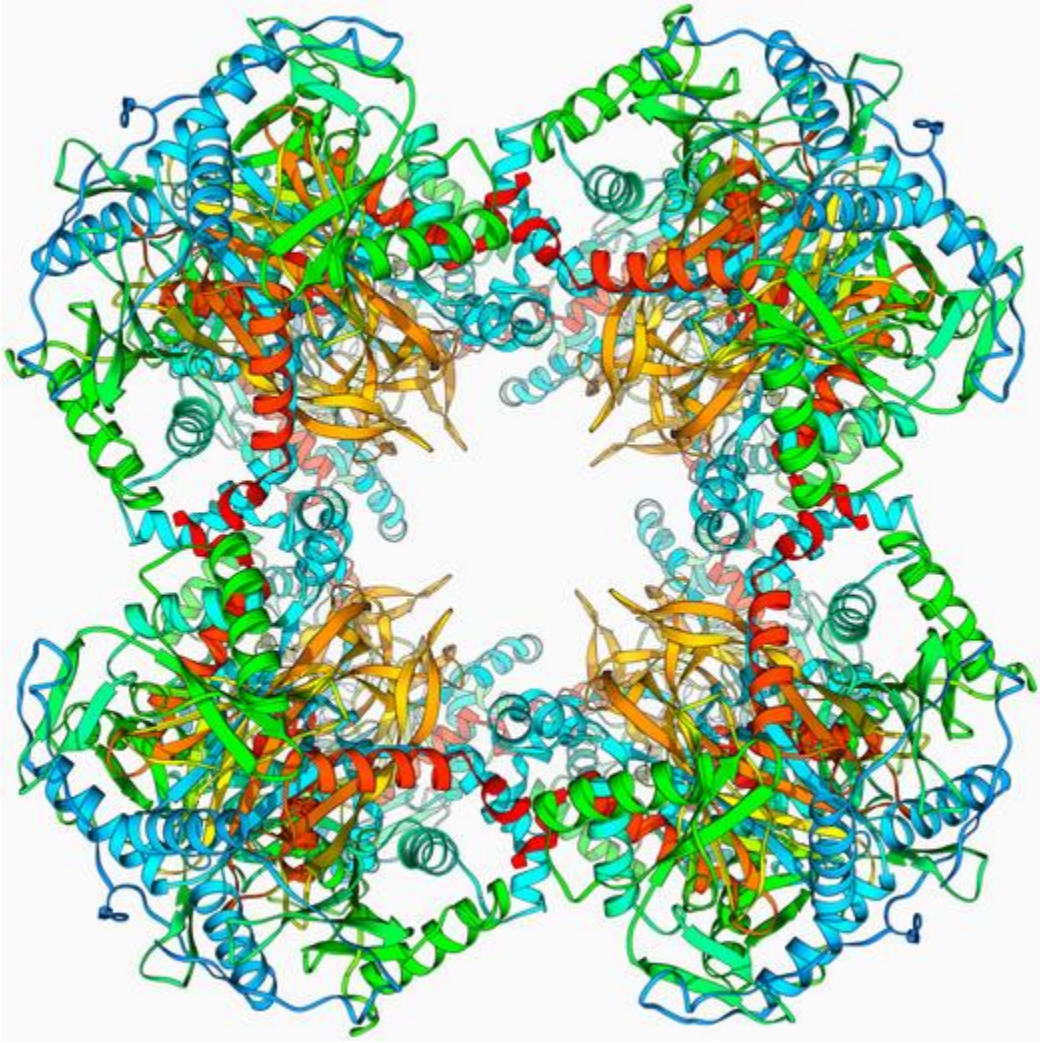


Imagen: Complejo Piruvato Deshidrogenasa (Alamy Foto de stock).

PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA
GRADO EN MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

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.	27

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

Las prácticas de Bioquímica son una parte esencial en la formación de un alumno 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 guion, al final de cada protocolo se reserva un espacio para que el alumno anote sus observaciones, cálculos, haga las representaciones gráficas, etc. Asimismo, deberá contestar a las preguntas que se efectúen a lo largo del guion.

Normas de seguridad que deben seguirse en el laboratorio

- No se puede fumar, comer ni beber en el laboratorio.
- No se puede hacer uso del teléfono móvil 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, 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. El profesor responsable de la práctica os indicará lo que tenéis que hacer con los materiales y productos al terminar la práctica.

Es muy importante que el alumno 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. Todos esos objetos deben dejarse en la taquilla.
- 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.

- **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 ESPECTROFOTOMETRÍA

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 (λ_{max}), que es característica de cada sustancia. Las sustancias coloreadas tienen una λ_{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:

$$\log I_o/I = \varepsilon c l$$

I_o: intensidad de la luz incidente.
I: intensidad de la luz transmitida.
ε: 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 $\log I_o/I$ 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 de la cantidad de luz que atraviesa la solución ($\%T = I/I_o \times 100$).

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.

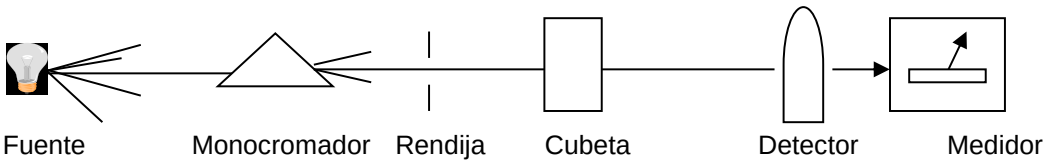


Fig. 1. Esquema de un espectrofotómetro

PRÁCTICA 1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES ÁCIDO-BASE DE LOS AMINOÁCIDOS.

Los objetivos de esta práctica son:

- Aprender a medir el pH de una disolución.
- Preparación de tampones. Cálculo teórico y preparación práctica.
- Experimental de las propiedades ácido-base de los aminoácidos.
- 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.

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. pH metro

Calibración del pH metro

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

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_a del ácido y las concentraciones de ácido y base:

$$pH = pK_a + \log [base] / [ácido]$$

Problema. Partiendo de soluciones 0,1 M de ácido y base, calcular los volúmenes que tienen que mezclarse para preparar 50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,68 (pK_a = 6,86) y 50 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,45 (pK_a=4,75)

50 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,68 (pK_a = 6,86, Lehninger Principles of Biochemistry)

	Ácido	Base
Indicar cuál es el ácido y la base de las soluciones proporcionadas:		
Indicar la reacción de disociación del ácido:		
Volúmenes que se deben añadir para preparar el tampón:		

50 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,45 (pK_a=4,75, Lehninger Principles of Biochemistry)

	Ácido	Base
Indicar cuál es el ácido y la base de las soluciones proporcionadas:		
Indicar la reacción de disociación del ácido:		
Volúmenes que se deben añadir para preparar el tampón:		

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.

Comparar los valores de pH teóricos con los obtenidos experimentalmente.

	pH teórico	pH experimental
Tampón fosfato sódico 0,1 M	pH 7,68	pH
Tampón acetato sódico 0,1 M	pH 5,45	pH

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_as 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 pKas de los grupos ionizables y el punto isoeléctrico del aminoácido.

Procedimiento

- Añadir a un vaso de precipitados pequeño, 30 ml de la solución de aminoácido. Medir el pH inicial de la solución.

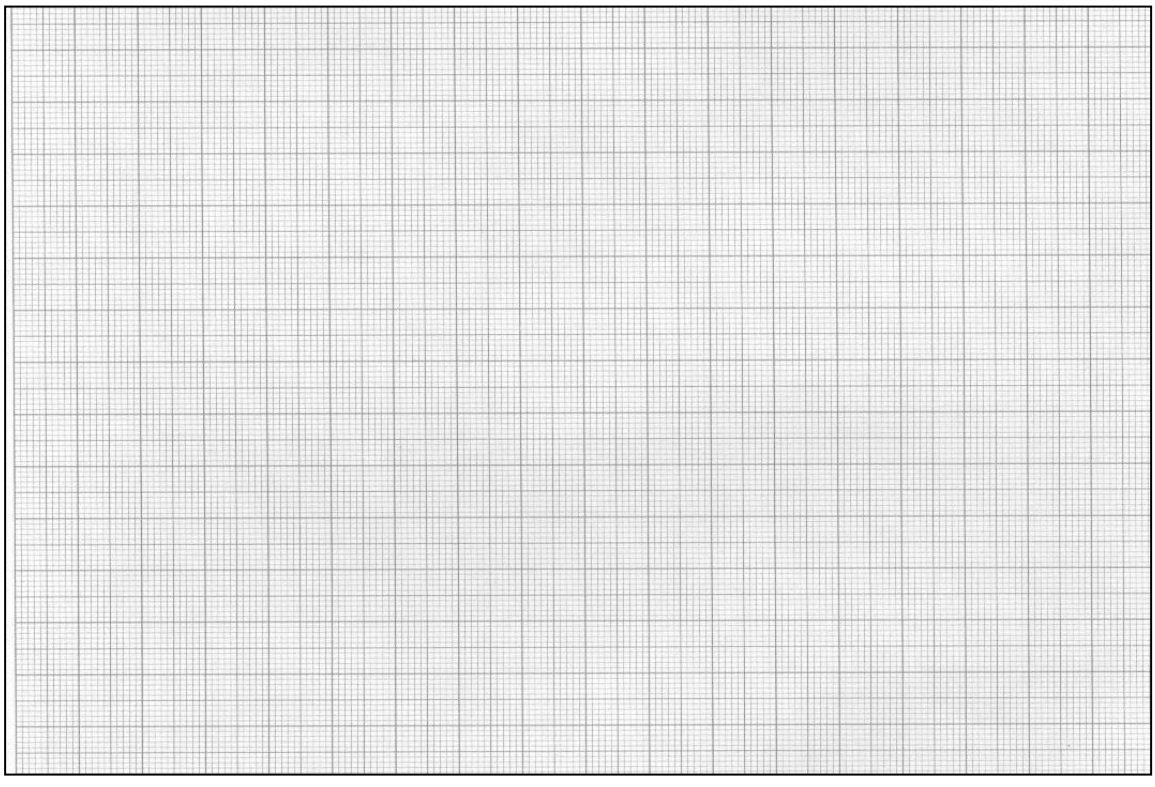
- Llevar a cabo la titulación añadiendo HCl con la pipeta en fracciones de 0.5 ml. Agitar con una varilla de vidrio después de cada adición de HCl.

- Anotar en una tabla el pH y el volumen de ácido correspondiente. Añadir ácido hasta llegar a pH 1,5 aproximadamente.

ml HCl	pH	ml HCl	pH	ml HCl	pH
0 ml		5,5 ml		11 ml	
0,5 ml		6 ml		11,5 ml	
1 ml		6,5 ml		12 ml	
1,5 ml		7 ml		12,5 ml	
2 ml		7,5 ml		13 ml	
2,5 ml		8 ml		13,5 ml	
3 ml		8,5 ml		14 ml	
3,5 ml		9 ml		14,5 ml	
4 ml		9,5 ml		15 ml	
4,5 ml		10 ml		15,5 ml	
5 ml		10,5 ml		16 ml	

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).

Elementos		Color
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 picometros 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

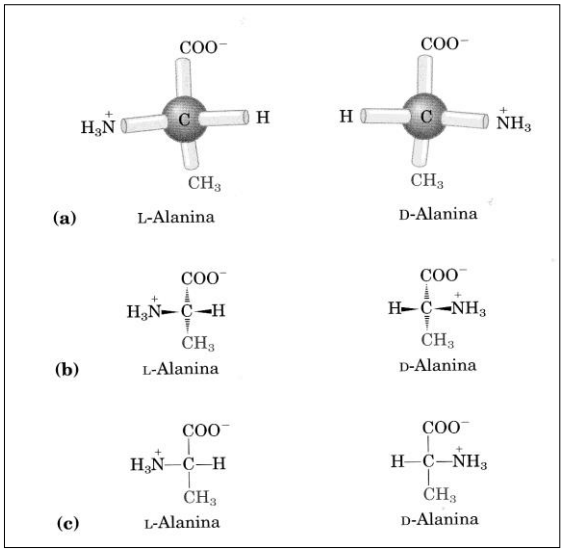
Busca el Cα asimétrico, con el H orientado hacia ti.

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

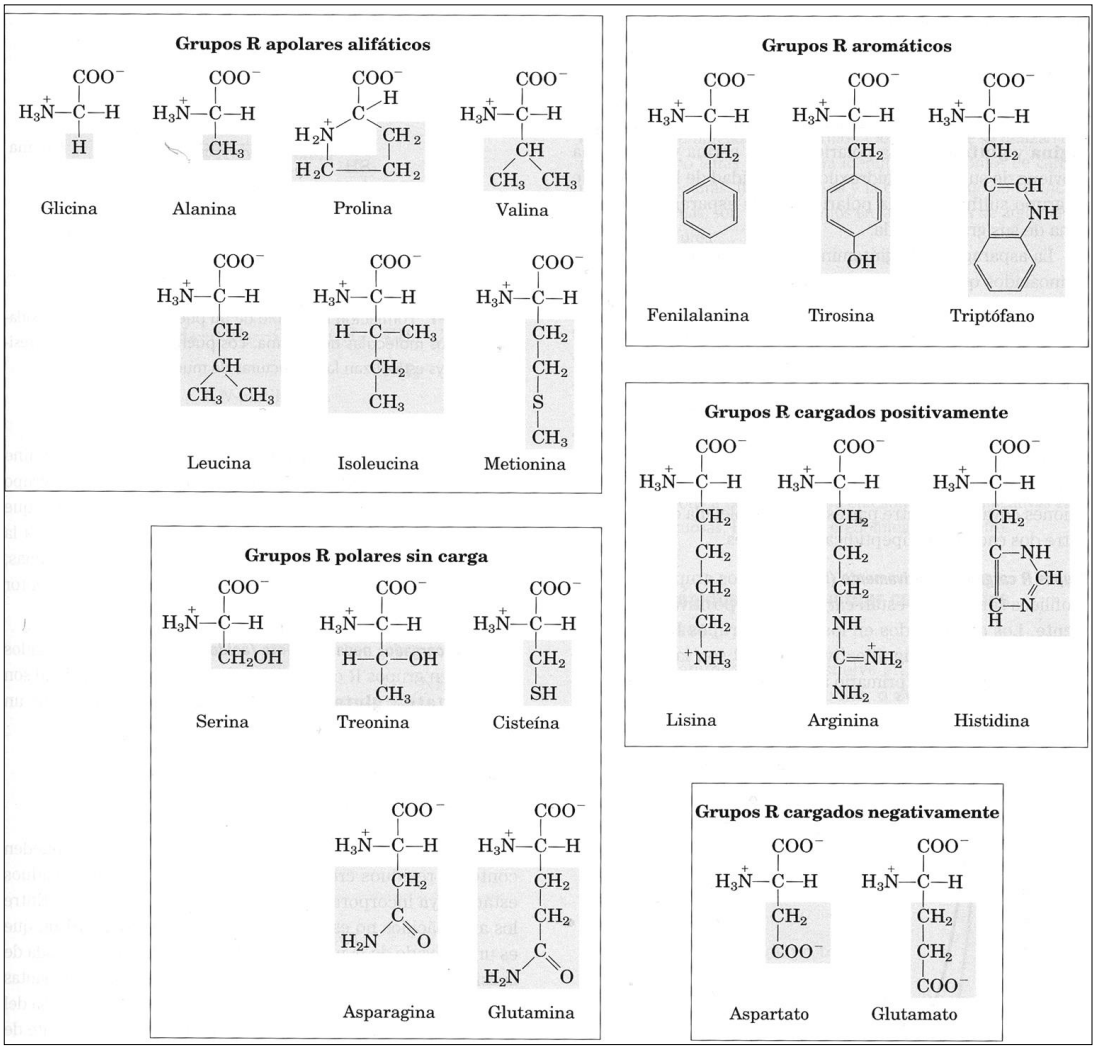
COO^--R-NH_3^+.....forma L

COO^--NH_3^+-R.....forma D

Estereoisomería de los aminoácidos

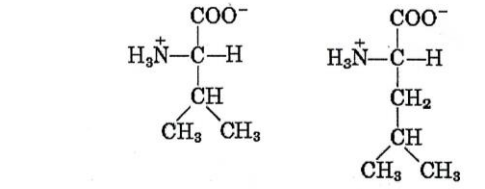


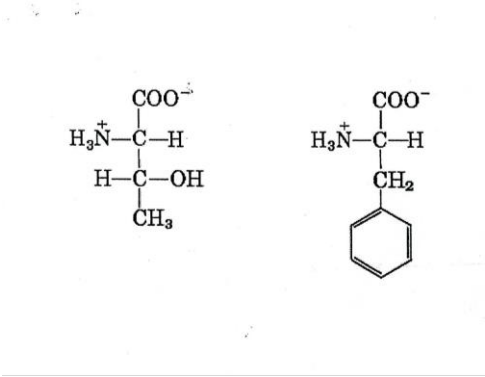
Aminoácidos estándar

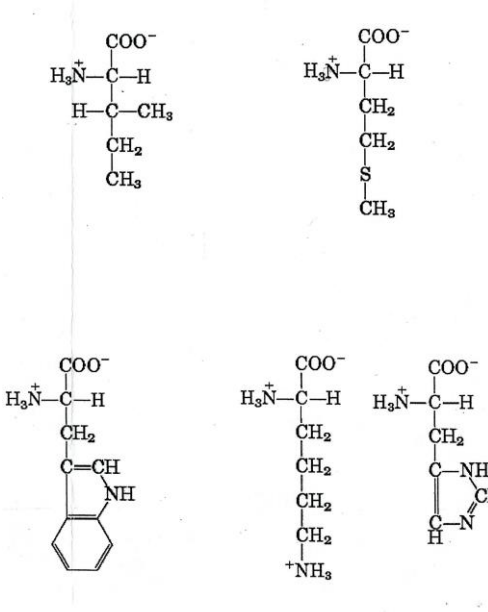


Resultados

1. Identificar los aminoácidos esenciales:
a) nombrar
b) decir si presentan forma D o L,

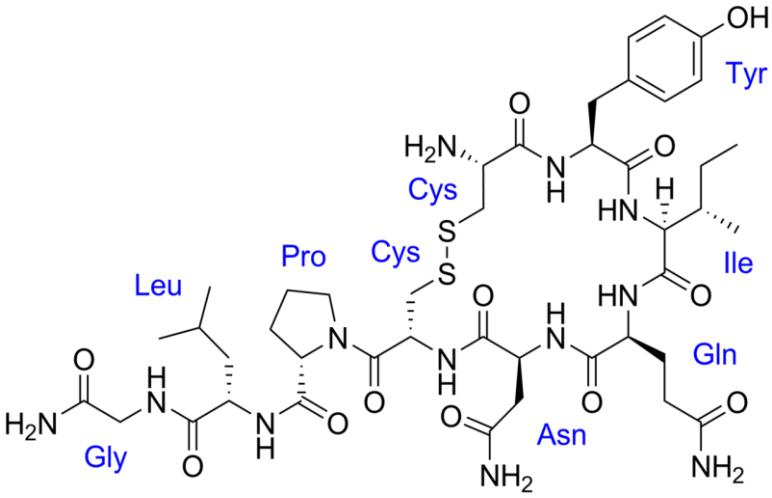




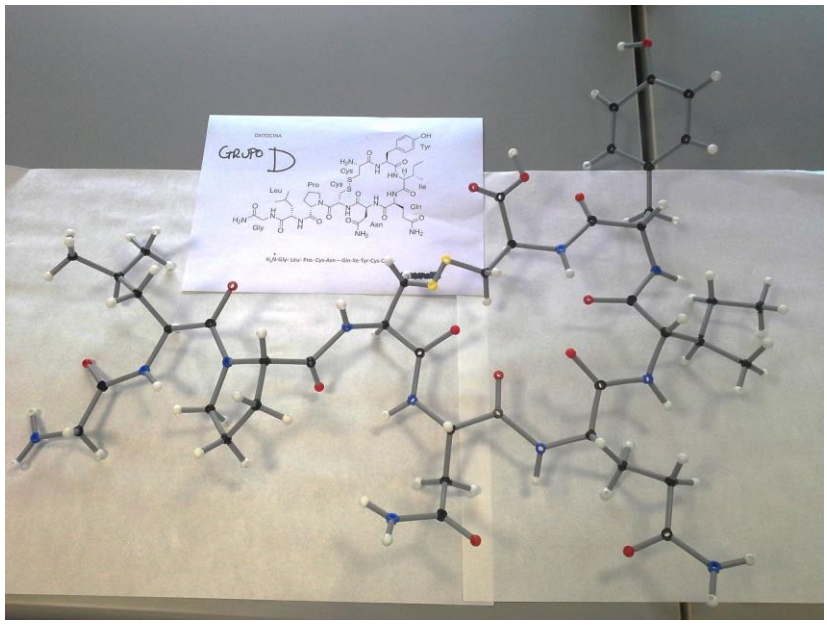


2. Construir el aminoácido de la oxitocina indicado por el profesor. Cada pareja hará el mismo aminoácido, uno el D y otro el L, y comparará los enantiómeros.

3. Entre todos los grupos construir la molécula de la oxitocina. Observar las propiedades del enlace peptídico, los extremos N y C terminales y cadenas laterales.



$^{+}H_3N$-Gly-Leu-Pro-Cys-Asn-Gln-Ile-Tyr-Cys-COO^{-}



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. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. MÉTODO DE BIURET.

INTRODUCCIÓN

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 un líquido llamado **plasma** que contiene agua, sales y proteínas 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 actúa como proteína de reserva, además de como transportador (ácidos grasos, bilirrubina y fármacos) y regulador osmótico. Su concentración aumenta en casos de deshidratación y disminuye en casos de ascitis/edema y daño hepático severo. La mayoría de las determinaciones bioquímicas se hacen en **suero**, que se obtiene al dejar coagular la sangre y cuya composición es similar a la del plasma, con la excepción de las proteínas involucradas en la coagulación sanguínea.

La determinación de la concentración de proteínas en suero 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
- -Tubos
- -Agitadores
- -Espectrofotómetros (Colorímetros)
- -Pipetas automáticas: utilizar las puntas adecuadas según los volúmenes (indicadas en las tablas). Ajustar bien la punta. Las pipetas tienen dos topes: el primero para aspirar el líquido, el segundo (presionando hasta el fondo) para soltarlo. Esto es importante para que la medida sea precisa. Nunca “pasar de rosca” las pipetas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

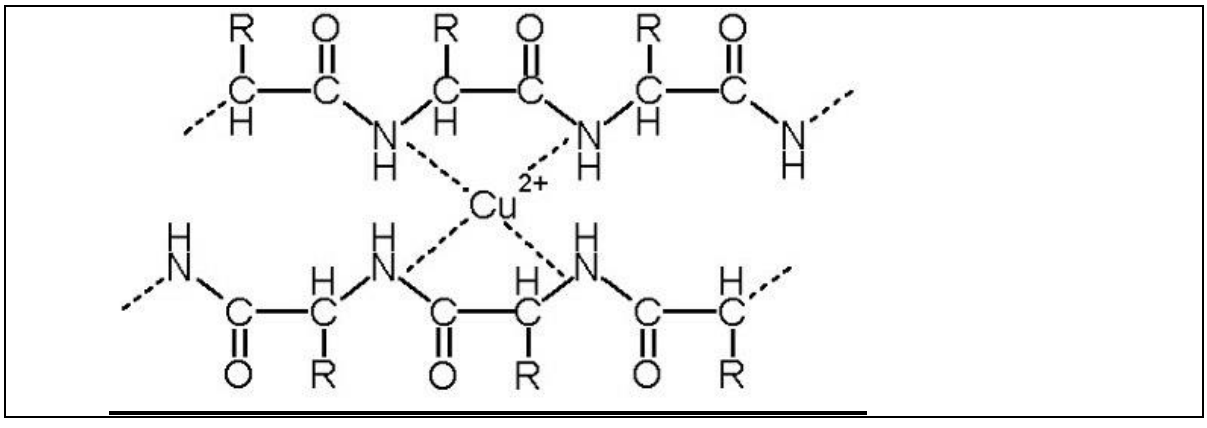
La concentración de proteínas se medirá utilizando el método del Biuret, que se basa en la formación de un complejo de coordinación coloreado, de color azul-púrpura, entre el ion cobre y los enlaces peptídicos a pH alcalino. Se requiere un mínimo de dos enlaces peptídicos para la formación del complejo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

1) Numerar 7 tubos (marcarlos en la parte superior del tubo).
2) Añadir los volúmenes indicados en la tabla. El volumen de albúmina depositarlo en el fondo del tubo, no por las paredes.

TUBO	1 (Blanco)	2	3	4	5	6	7
Agua destilada	100 µl	---	---	---	---	---	---
Albúmina	---	100 µl (20g/L)	100 µl (40g/L)	100 µl (60g/L)	100 µl (80g/L)	---	---
Suero problema	---	---	---	---	---	100 µl (suero A)	100 µl (suero B)
Reactivo de Biuret	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml

3) Mezclar el contenido de cada tubo (vortex).

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



Complejo de coordinación del ion cobre con grupos amino en enlaces peptídicos

RESULTADOS

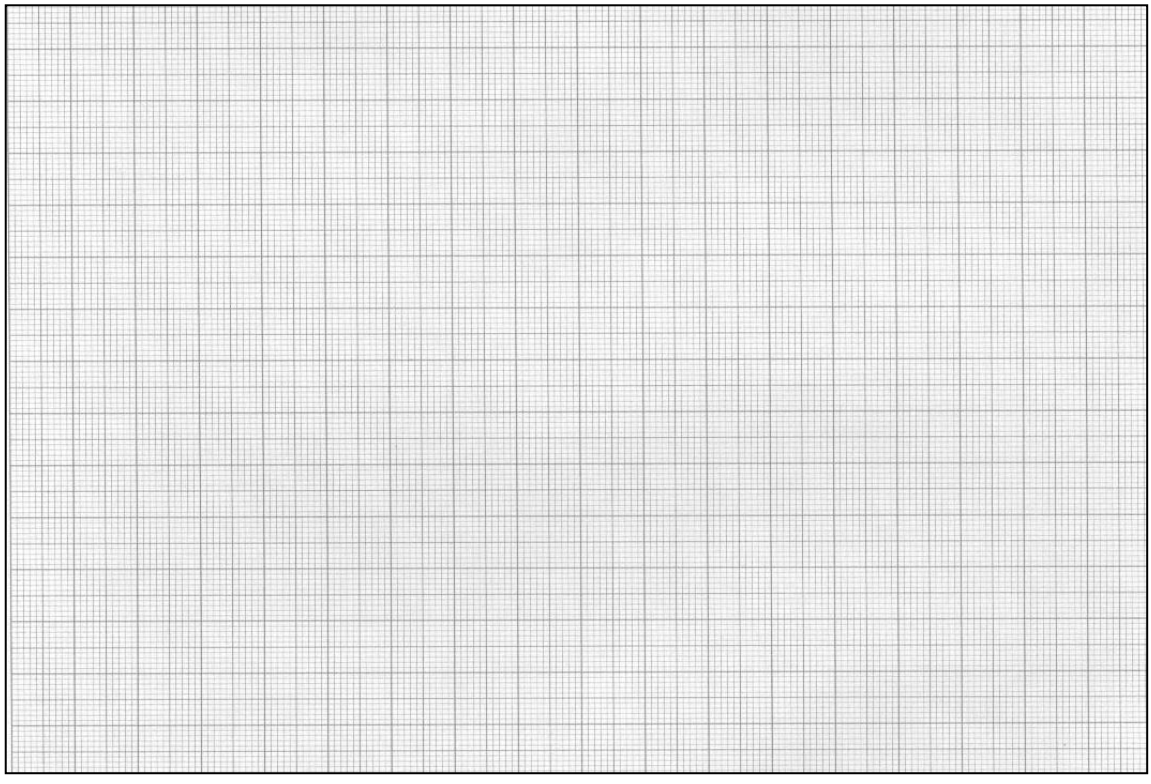
- En una hoja de papel milimetrado construir una gráfica de A550 (eje y) frente a concentración de proteína (eje x) de las soluciones patrón (tubos 2-5). Marcar el eje de las x en g/L de proteína (Albúmina). Se trata de una recta que pasa por el 0 y se traza ajustando los máximos puntos posibles.

- 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.

VALORES DE ABSORBANCIA A 550nm (ordenadas) RESPECTO A CONCENTRACIÓN DE ALBÚMINA (abscisas).

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
[Albúmina] g/L							
A550							

Representación: A_{550nm} (ordenadas) frente a [Albúmina] (abscisas).



Suero A =

Suero B =

PREGUNTAS

1. ¿Qué proteína se usa para realizar la recta patrón?

2. ¿En qué se basa el método del Biuret?

3. ¿A qué longitud de onda se mide la absorbancia? ¿Por qué se mide la absorbancia a esa longitud de onda?

4. ¿Qué se representa para hacer la gráfica de la recta patrón?

5. ¿Se cumple la ley de Lambert-Beer? ¿Por qué?

6. ¿Qué valores experimentales has obtenido para la concentración de proteínas totales de los sueros A y B? ¿Cuáles eran los valores reales?

2. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA. FOSFATASA ALCALINA.

INTRODUCCIÓN.

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 pueden ser esenciales para el diagnóstico diferencial de algunas enfermedades. 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.

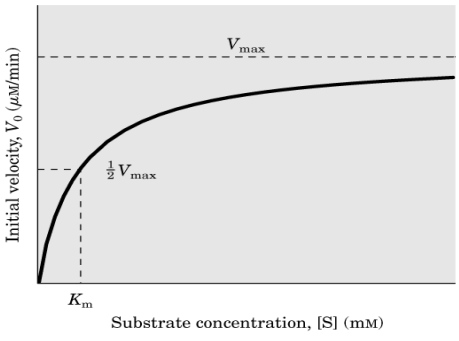
En esta práctica, emplearemos el enzima fosfatasa alcalina como modelo. Las fosfatasas alcalinas son un grupo de enzimas que presentan su máxima actividad a pH 9-10,5 y catalizan la hidrólisis de ésteres monofosfato. La reacción enzimática general de la fosfatasa alcalina es:

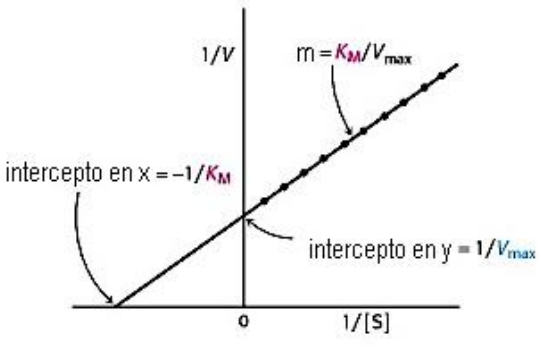
$$H_2O + R\text{-}PO_4H^{2-} \longrightarrow R\text{-}OH + PO_4H_2^-$$

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 las isoenzimas procedentes de los distintos órganos. Los valores normales de actividad fosfatasa alcalina en plasma son de 30 a 100U/L (µmoles/min/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.

Cinética de reacciones enzimáticas:





$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

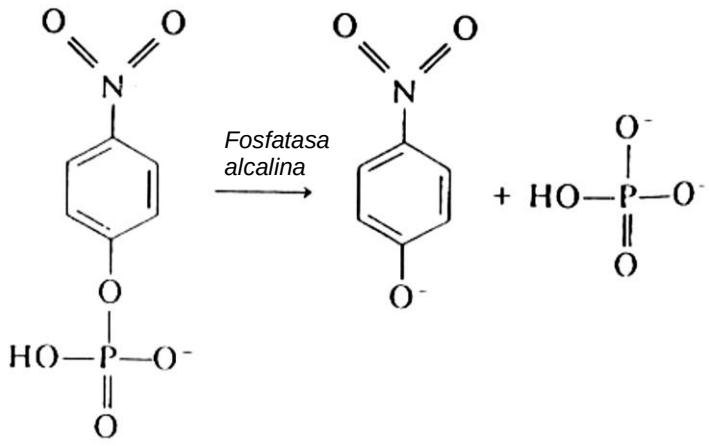
$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

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
- Espectrofotómetro
- Baño a 37º C

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:



p-nitrofenilfosfato (sustrato incoloro) | *p*-nitrofenol (producto coloreado) | lón fosfato

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 recta 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.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

1. Recta patrón de p-nitrofenol

Preparar los siguientes tubos patrón de p-nitrofenol (pNF, producto comercial) añadiendo los componentes en el orden indicado:

TUBO	1 (Blanco)	2	3	4	5
Tris pH 9,6	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Agua destilada	1 ml	---	---	---	---
Soluciones patrón pNF	---	1 ml (15µM)	1 ml (30µM)	1 ml (60µM)	1 ml (90µM)

- 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 (atención a la proporción de concentraciones en la escala del eje X). A_{400nm} (eje Y) [PNF] µM (eje X)

TUBO	1	2		3	4	5
[PNF] µM						
A400						

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 en el orden indicado:

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

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

- Al añadir el suero, introducir los tubos en hielo. Mezclar bien e incubar 5 min a 37ºC.

- Añadir 0,3 ml NaOH 0,2N para detener la reacción. Volumen final en el tubo: 3,5 ml.

-Mezclar. Secar bien los tubos por fuera.

- Ajustar el "cero" del espectrofotómetro con el tubo del blanco y medir la A400nm

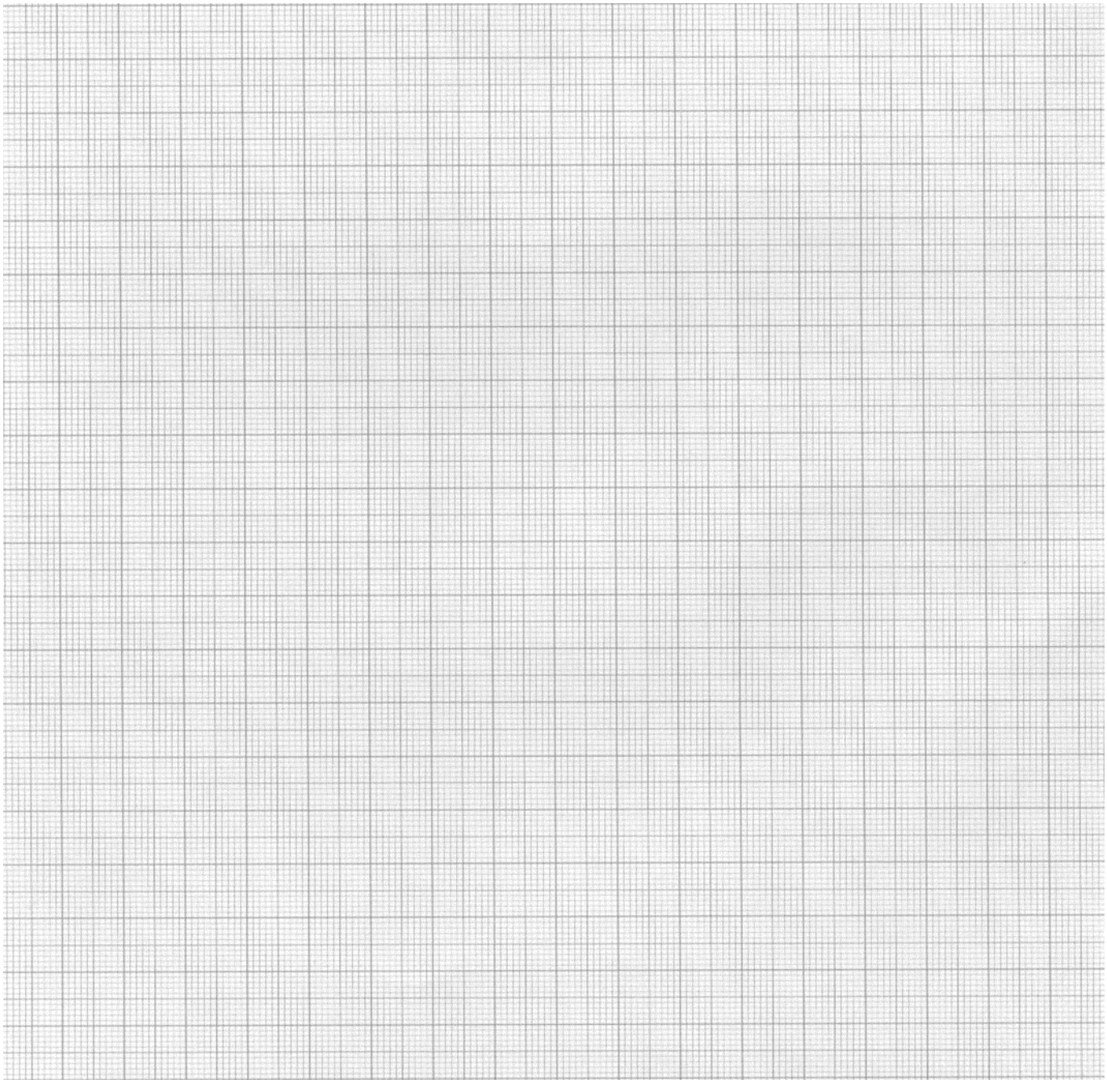
RESULTADOS

1.- Calcular la velocidad inicial (V_0) en cada tubo expresada en nmoles de p-N-fenol/min.
2.- Representar $1/V_0$ frente a 1/S (representación de Lineweaver-Burk) en la gráfica de la página siguiente.
3.- Calcular la K_M y V_{max}. ¿Cuáles son sus unidades?

TUBO	2	3	4	5	6
[S] mM	2,5	5	7	10	15
A400nm					
[pNF] μM (μmoles/L=nmoles/mL) calculada en la recta patrón					
V_0 (nmoles pNF/min) [pNF] x 3,5 mL / 5 min					
1/[S]					
$1/V_0$					

Representación de $1/V_0$ frente a $1/S$

(dibujar los ejes centrados en el papel milimetrado para poder extrapolar a valores negativos de absorbância).



PREGUNTAS

1. ¿Por qué hay que hacer una recta patrón?

2. ¿Qué se usa para realizar la recta patrón: el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNFF) o el producto p-nitrofenol (pNF)?

3. ¿A qué longitud de onda se mide la absorbancia? ¿Por qué se mide la absorbancia a esa longitud de onda?

4. ¿Qué se representa para hacer la gráfica de la recta patrón?

5. ¿Por qué se añade Tris pH 9,6 al realizar la cinética?

6. ¿Cuál es el sustrato de la reacción? ¿Qué concentraciones de sustrato se utilizan?

7. ¿Por qué se añade suero?

8. ¿Dónde está el enzima cuya velocidad queremos determinar?

9. ¿Por qué se ponen los tubos en hielo?

10. ¿Por qué se ponen luego a 37ºC?

11. ¿Por qué se añade NaOH?

12. ¿Cómo se sabe la concentración de producto formado?

13. Definición de velocidad enzimática. ¿Cómo se calcula la velocidad?

14. ¿Cómo se sabe la cantidad de producto formado?

15. K_M ¿Qué valor has obtenido? ¿Cuáles son sus unidades?

16. V_{max} ¿Qué valor has obtenido? ¿Cuáles son sus unidades?

PRÁCTICA 3. VALORACIÓN DE LA DIABETES: DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA Y HEMOGLOBINAS GLICADAS.

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 el 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 tras su administración por vía parenteral, la 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 en tejidos como el músculo y el tejido adiposo, un aumento de la internalización de la glucosa y su utilización por la célula, la activación de la glucogenogénesis y la disminución de la glucogenólisis. Además, en el tejido adiposo esta hormona inducirá la síntesis y almacenamiento de triglicéridos.

En la entrada de glucosa hacia el interior celular 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 puede 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". En la diabetes “tipo 2”, la producción de Insulina, de forma continuada da lugar a una des-sensibilización de los receptores de insulina, la insulina no puede ejercer su acción de forma correcta, la glucosa no se internaliza y por lo tanto los niveles de glucemia se mantienen muy elevados (diabetes).

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 64-106 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 las alteraciones de estos niveles en el tiempo. 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. Este es un proceso conocido como glicación. Esta glicación tiene lugar por una reacción no enzimática. La intensidad de la glicación 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 glicación proteica constituye un buen marcador bioquímico del grado de compensación del enfermo diabético.

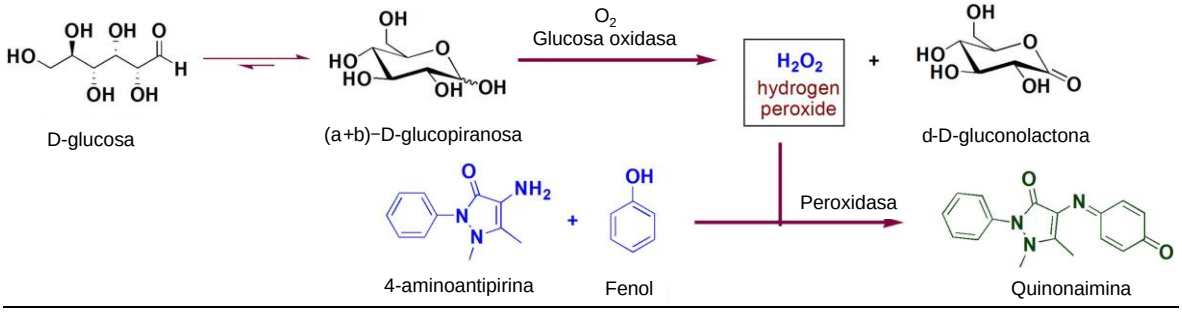
El objetivo de esta práctica es la valoración de la diabetes mediante la determinación de los niveles de glucosa en plasma y mediante la determinación de hemoglobinas glicadas. Como modelo se emplearán muestras de sangre de individuos diabéticos y de individuos control.

1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

INTRODUCCIÓN.

En esta práctica se utilizará el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD) para medir los niveles de glucosa sanguínea de un individuo diabéticos y un individuo control. 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:



MATERIALES

- 6 tubos de ensayo
- Pipetas automáticas
- Espectrofotómetro
- Disolución patrón de glucosa 0,2 mg/ml
- Disolución de coloración que contiene:
  - Glucosa oxidasa
  - Peroxidasa
  - 4-Aminofenazona
  - Fenol
  - Tampón Tris pH 7,4
- Plasma de individuos normales y/o diabéticos

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Antes de comenzar recordar marcar los tubos de ensayo de forma apropiada con un rotulador permanente. Los cinco tubos para hacer la recta patrón irán numerados del 1 al 5 y los dos tubos restantes, correspondientes a las muestras a analizar se denominarán Plasma A y Plasma B

1.- Preparar la recta patrón con la disolución patrón de glucosa (0,2 mg/ml), añadiendo los volúmenes indicados en los tubos 1 al 5.

2.- En los dos tubos marcados como Plasma A y Plasma B, añadir 10 µl del plasma correspondiente en el fondo del tubo (**importante**).

3.-Añadir a todos los tubos agua destilada hasta volumen un total de 200 µl, tal como se indica en la tabla.

4.- Finalmente, añadir 1.8 ml de disolución de coloración de glucosa oxidasa-peroxidasa (**reactivo GOD-POD**) a los 7 tubos de forma consecutiva.

TUBO	1 (Blanco)	2	3	4	5	Plasma A	Plasma B
Patrón de glucosa (0,2 mg/ml)	0 µl	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl		
Plasma						10 µl	10 µl
Agua destilada	200 µl	175 µl	150 µl	100 µl	50 µl	190 µl	190 µl
Solución GOD-POD	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml	1,8 ml

5.- Cuando se haya añadido el reactivo GOD-POD a todos los tubos, mezclar el contenido de los tubos con el vortex e incubarlos 10 minutos en el baño de agua a 37ºC.

6.- Transcurrido el tiempo de incubación, sacar los tubos del baño, secarlos bien y leer las absorbancias de los patrones y de las muestras a 505 nm utilizando como blanco el tubo nº 1, donde no se habrá añadido el patrón de glucosa.

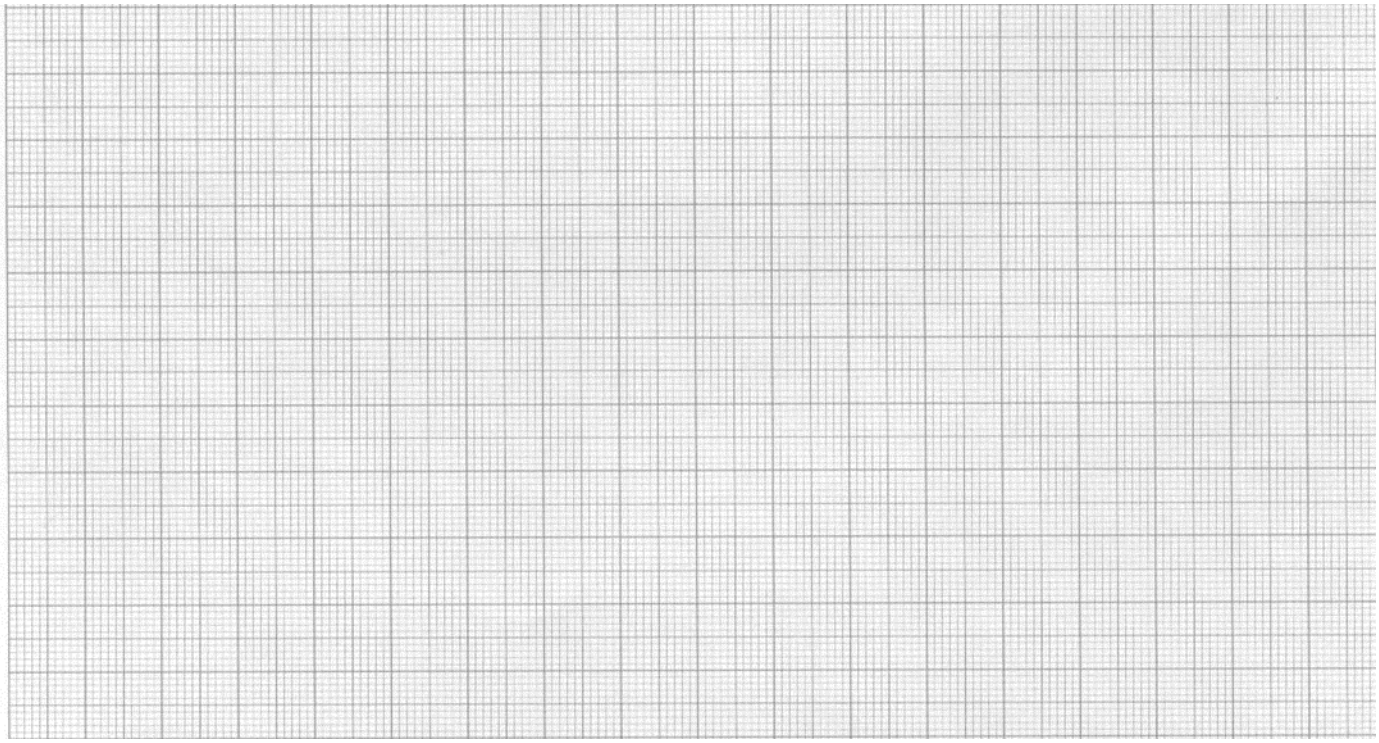
TUBO	1 (Blanco)	2	3	4	5	Plasma A	Plasma B
Absorbancia 505nm							
µg de Glucosa							

7.- Construir la recta de calibrado representando en el papel milimetrado las absorbancias a 505 nm (eje Y) frente a los µg de glucosa presentes en el tubo (eje X).

8.- Extrapolando en la recta de calibrado, calcular los µg de glucosa en el tubo problema. Calcular los µg de glucosa/ µl de plasma.

9.-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 individuos diabéticos.

Representación: A_{505nm} (ordenadas) frente a µg de glucosa (abcisas)



Plasma A
µg de glucosa =

µg de glucosa/ µL de plasma =

Concentración de glucosa en mg/dL =

Plasma B
µg de glucosa =

µg de glucosa/ µL de plasma =

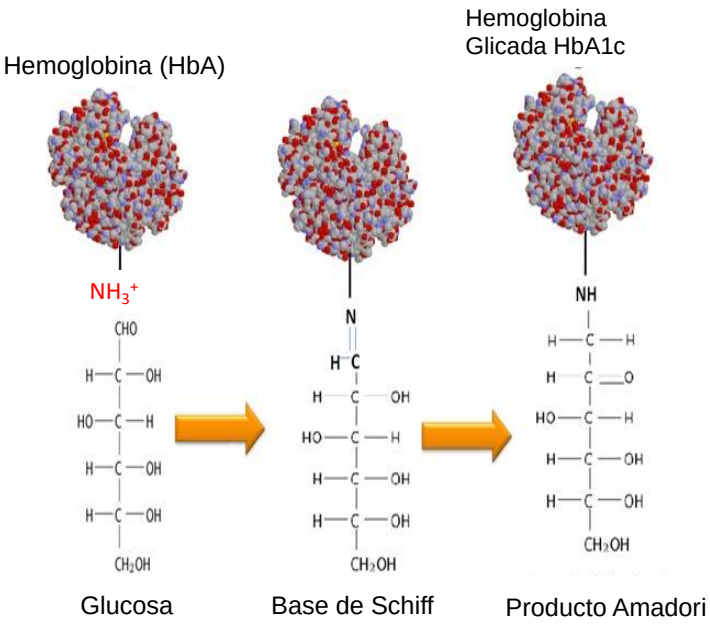
Concentración de glucosa en mg/dL =

2. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINAS GLICADAS

INTRODUCCIÓN

La diabetes no se valora solamente por el control glucémico, sino que hay otra serie de parámetros, como la Hemoglobina glicada (HbA1c), que indican el grado de control que ha mantenido el paciente diabético durante las últimas semanas.

La hemoglobina (Hb) de los seres humanos adultos está constituida principalmente por: HbA (97% del total), HbA_2 (2,5%) y HbF (0,5%). La HbA está constituida por 4 cadenas polipeptídicas: 2 globinas α y 2 globinas β. La hemoglobina glicada es una fracción de la HbA normal del adulto, que tiene la propiedad de unir, de forma irreversible, cantidades de glucosa proporcionales a la concentración de glucosa en sangre (glucemia). A esta hemoglobina glicada se le denomina HbA1. Dentro de la hemoglobina HbA1 se pueden separar varias fracciones, HbA1a, HbA1b y HbA1c, siendo la de mayor interés y la que se encuentra en un porcentaje más elevado la HbA1c, que es la que se encuentra unida a la glucosa de manera más específica.



La HbA1c es el resultado de la glicación de la hemoglobina normal (HbA), 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 HbA1c, que es la más abundante de las HbA1 (aproximadamente el 80%). ***Esta unión anula la carga eléctrica positiva del grupo amino terminal.***

La cantidad de hemoglobina glicada es proporcional a la concentración de glucosa en sangre, por lo que en la diabetes hay mayor proporción de HbA1c de lo normal.

La concentración de HbA1c en sangre es directamente proporcional a la concentración media de glucosa (MGS) durante un período de tiempo equivalente a la vida media de los eritrocitos (2-3 meses), según las siguientes **fórmulas:**

MGS (mg/dL) = (31,7 x %HbA1C) - 66,1

MGS (mmol/L) = (1,76 x %HbA1C) - 3,67

Un nivel de HbA1c normal es **menor al 6%**. En **diabéticos no controlados** los niveles se sitúan entre **por encima del 12%.** De forma general, en individuos diabéticos, la concentración de HbA1c se encuentra elevada entre 2 y 3 veces con respecto a los individuos no diabéticos.

Entre los factores que condicionan la intensidad de la glicación 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 glicada, 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 glicada no están influidos por las fluctuaciones diarias de glucosa sanguínea ni tampoco por el ejercicio ni por la ingesta reciente de alimentos.

- En esta práctica separaremos la fracción de hemoglobina glicada HbA1c mediante cromatografía en una microcolumna que contiene una resina de intercambio aniónico.

- Mediante la cromatografía de intercambio iónico, se logra la separación de las fracciones de hemoglobina en base a las diferencias en sus cargas eléctricas.

- Al tener su grupo amino sustituido con glucosa (-NH-R), la hemoglobina Hb A1c posee menos carga positiva que la Hb A no glicada, cuyo grupo $-NH_2$ intacto se puede protonar a $–NH_3^+$; como consecuencia, **la HbA1c es menos retenida que la HbA y eluye directamente al aplicar la disolución de lavado (tampón fosfato**).

- Empleando después un medio de mayor fuerza iónica (NaCl) se consigue liberar la interacción de la resina con la Hb A y así se recupera la hemoglobina no glicada.

MATERIALES

- 3 tubos de ensayo largos de vidrio (para soportar las columnas y recoger los eluatos)
- Pipetas automáticas
- Columna con resina de intercambio catiónico (polímero acrílico con grupos carboxilato)
- Espectrofotómetro
- Solución de lavado: Tampón fosfato 72 mmol/L pH 6.4
- Solución de elución: Cloruro sódico 1 M
- Sangre ya hemolizada de individuos normales o diabéticos (con heparina o EDTA)

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. <u>Preparación y empaquetamiento de las columnas de Cromatografía</u>: (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 gotear 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

2. <u>Fraccionamiento de las hemoglobinas</u>

- Aplicar cuidadosamente sobre la columna 50 μL del hemolizado y dejar que el líquido sea absorbido completamente (desaparece por la parte superior).
- Añadir a la columna 200 μl de la **solución de lavado (tampón fosfato)** para arrastrar los posibles restos del hemolizado y dejar que penetren en la columna (desaparece, por la parte superior).
- Desechar el eluído.
- Se necesitan 2 tubos de vidrio para recoger la hemoglobina glicada (HbA1c) y la normal (HbA). Rotular convenientemente los tubos para no confundirlos como tubo1 y tubo 2.

2.1. Separación de la hemoglobina glicada **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.

2.2. Elución de la hemoglobina no glicada **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 eluído de la columna, hasta que desaparezca por la parte superior.

3. <u>Determinación cuantitativa de las hemoglobinas</u> (<u>Absorbancia a 415 nm</u>, 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 <u>absorbancia a 415nm frente al agua destilada</u>
  (fracción de hemoglobinas glicadas, 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 1:4).
  - Agitar
  - Medir la absorbancia frente a agua destilada (Tubo blanco) a 415nm.
  Ésta es la fracción de hemoglobinas no glicada, HbA)
  - Multiplicar el valor de absorbancia obtenida por 4 (Recuerda que hemos medido una solución diluida del tubo 2).

4. Resultados

Cálculo del porcentaje de hemoglobina glicada frente a hemoglobina total:

A_{415} HbA1c = A_{415} HbA = A_{415} Hb total (HbA+ HbA1) =

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

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

5. Ejercicios:

1. Completar los espacios en blanco.

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 ……

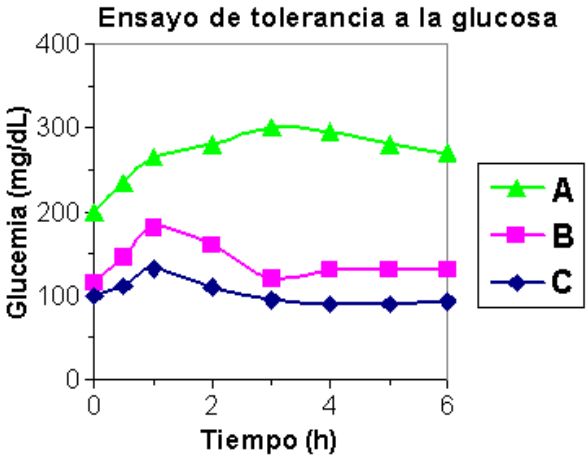
En el tubo 2 se ha recogido la hemoglobina ……..……(Hb…..), que al tener carga ……. quedó retenida en la columna.

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

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

2. 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 A, B y C a las siguientes situaciones: Paciente sano, diabetes leve y diabetes grave.



3. Determinar la concentración media de glucosa de las muestras analizadas (Pacientes A y B) tanto en mg/dL y en mmol/L. Utiliza las fórmulas que se proporcionan en la introducción de la práctica.

4. ¿Qué valor de HbA1C tendría una muestra con una concentración media de Glucosa de 120 mg/dL? Utiliza las fórmulas que se proporcionan en la introducción de la práctica.

5. ¿A que valores del Sistema Internacional de unidades (mmol/L) corresponde la concentración anterior? **Datos para la conversión de mg/dL a mmol/L: Peso molecular de la glucosa 180 g/mol**