
Bioquímica II

Programa del curso



OBJETIVOS	3
PROGRAMA DEL CURSO.....	3
SEMINARIOS.....	4
PROGRAMA DEL CURSO PRÁCTICO.....	4
Cuestionarios Guía	6
1. Generalidades de nutrición. Macronutrientes y obesidad	7
Micronutrientes.....	7
2. Metabolismo de aminoácidos	9
3. Modificaciones proteicas postraduccionales.	12
4. Generalidades sobre lípidos	13
Lipoproteínas plasmáticas y alteraciones del metabolismo lipídico.....	14
Oxidaciones biológicas y antioxidantes	15
5. pH, buffers y tampones fisiológicos	16
Protocolos Prácticos	17
Buenas prácticas en el laboratorio	18
Módulo I. Nutrición.....	19
Determinación de capacidad antioxidante en alimentos.....	19
Módulo II: Aminoácidos y Proteínas.....	22
Medida de Actividad Transaminasa	22
Identificación de mecanismos catalíticos de enzimas proteolíticas.	28
Módulo III: Lípidos y Lipoproteínas plasmáticas.	31
Práctico 1. Determinación de la concentración plasmática de colesterol.....	31
Práctico 2. Aislamiento y oxidación de LDL por Cu(II)	35
Medida de oxidación de carotenoides.....	39
Electroforesis en agarosa.	40
Medidas de consumo de oxígeno.	41
Módulo IV. Oxígeno y metabolismo de xenobióticos.....	44
Módulo V: Proteínas y pH plasmáticos	47
Cuantificación de albúmina y tioles en plasma	47

OBJETIVOS

1. Complementar el conocimiento bioquímico básico adquirido por los estudiantes en el curso de Bioquímica I con temas de la bioquímica que son motivo de investigación y desarrollo biotecnológico en la actualidad.
2. Introducir a los estudiantes en el manejo de bibliografía científica y de herramientas audio-visuales, imprescindibles para su desenvolvimiento en el área científico-tecnológica, durante el desarrollo de los seminarios semanales.
3. A nivel de los trabajos prácticos se desarrollan ensayos relacionados con la temática teórica, atendiendo a la actualidad y pertinencia de las técnicas y con énfasis al aporte de conceptos y herramientas de diseño y estadísticas imprescindibles para la formación de los educandos como investigadores.

PROGRAMA DEL CURSO

Módulo I: Nutrición

1. Macronutrientes.
 - a. Necesidades energéticas
 - b. Aporte calórico de los diferentes componentes de la dieta
 - c. Componentes esenciales
 - d. Obesidad
2. Micronutrientes.
 - a. Vitaminas, fuentes y funciones
 - b. Minerales

Módulo II: Aminoácidos y Proteínas

1. Metabolismo de los aminoácidos.
 - a. Síntesis de aminoácidos no esenciales
 - b. Degradación de los esqueletos carbonados.
 - c. Destino del nitrógeno proteico.
 - d. Moléculas derivadas de aminoácidos: aminas biógenas (histamina, serotonina, etc), glutatión, óxido nítrico, el grupo hemo, purinas y pirimidinas
 - e. Funciones del folato, la vitamina B12 y SAM
2. Proteínas.
 - a. Modificaciones proteicas postraduccionales.
 - i. Adición de grupos prostéticos (hemo, fosfato de piridoxal, etc.)
 - ii. Fosforilación
 - iii. Glicosilación
 - iv. Carboxilación de glutamato dependiente de vitamina K
 - v. Citrulinización
 - vi. Selenocisteína (traduccional)
 - b. Destino y recambio de proteínas
 - i. Enzimas proteolíticas.
 - ii. Peptidasas intra y extra celulares
 - iii. Cascadas proteolíticas
 1. Coagulación
 2. Digestión

Módulo III: Lípidos y Lipoproteínas Plasmáticas

1. Ácidos grasos y nutrición,
 - a. Ácidos Grasos omega-3 y omega-6

- b. Eicosanoides, síntesis y función
- 2. Colesterol
 - c. Biosíntesis y regulación
 - d. Moléculas derivadas del colesterol: hormonas esteroideas, vitamina D y sales biliares.
- 3. Lipoproteínas plasmáticas
 - a. Composición, origen, destino y función
 - b. Enzimas y cofactores que participan en su metabolismo

Módulo IV: Oxidaciones biológicas y Metabolismo de Xenobióticos

- 1. El oxígeno en el metabolismo
 - a. Rol del oxígeno en la obtención de energía
 - b. Oxidaciones biológicas, oxidasas y oxigenasas
 - c. Generación de especies reactivas del oxígeno durante la inflamación
 - d. Estrés oxidativo
- 2. Sistema microsomal hepático y metabolismo de xenobióticos
 - a. Fase I
 - b. Fase II
 - c. Inducción e interferencias.
 - d. Química Medicinal

Módulo V: Proteínas y pH plasmáticos

- 1. pH, amortiguación y regulación de pH fisiológico
 - a. Conceptos básicos de pH y amortiguación
 - b. Principales amortiguadores a nivel celular y extracelular
 - c. Rol de los pulmones y los riñones en la regulación del pH
- 2. Proteínas Plasmáticas
 - a. Generalidades y lugar de síntesis de las proteínas plasmáticas.
 - b. Proteínas de transporte de iones y hormonas
 - c. Albúmina, proteína de transporte y reguladora de la presión oncótica del plasma

SEMINARIOS

- S1. Nutrición (artículo y cuestionario 1).
- S2. Metabolismo de aminoácidos (cuestionario 2).
- S3. Metabolismo de aminoácidos (cuestionario 2).
- S4. Moléculas derivadas de aminoácidos. Catecolaminas y tiroxina (presentaciones 1 y 2).
- S5. Modificaciones postraduccionales (cuestionario 3).
- S6. Cascadas proteolíticas. Digestión y coagulación (presentaciones 3 y 4).
- S7. Generalidades sobre lípidos (cuestionario guía 4).
- S8. Lipoproteínas plasmáticas y alteraciones del metabolismo lipídico (presentaciones 5 y 6).
- S9. Sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (presentaciones 7 y 8).
- S10. Citocromo P-450 y COX (presentaciones 9 y 10).
- S11. pH (cuestionario guía 5)..

PROGRAMA DEL CURSO PRÁCTICO

Módulo I: Nutrición.

Evaluación de antioxidantes en diferentes infusiones

Módulo II: Aminoácidos y Proteínas

- 1. Transaminasas
 - a. Medida de actividad de transaminasas hepáticas mediante cromatografía.
 - b. Medida de actividad transaminasa por espectrofotometría.

2. Medida de concentración de fibrinógeno en plasma por diferentes técnicas. Comparación de la precisión y reproducibilidad de las técnicas.
3. Formación y lisis del coágulo de fibrina.
4. Identificación de mecanismos catalíticos de enzimas proteolíticas

Módulo III: Lípidos y lipoproteínas plasmáticas.

1. Determinación de la concentración plasmática de colesterol
2. Aislamiento de LDL y oxidación por cobre, y evaluación de la oxidación.
 - a. TBARS
 - b. Oximetría
 - c. Cambio de movilidad electroforética en geles de agarosa.

Módulo IV: Oxígeno y metabolismo de xenobióticos.

Aislamiento de microsomas hepáticos y medida de actividad citocromo P450.

Módulo V: Proteínas Plasmáticas y pH.

Cuantificación de albúmina y tioles en plasma.

Aclaraciones 2012:

Los **teóricos**, 20 en total, tienen una duración de 2 horas y se dictan lunes y miércoles de 10 a 12 hs, desde el 13 de agosto al 26 de octubre.

Los **seminarios**, 11 en total, son de asistencia obligatoria y se extenderán desde el 15 de agosto al 24 de octubre y se dictarán en dos turnos: 10:30-12:30 y 14:30-16:30 hs. Por razones debidamente justificadas estos podrán ser realizados a distancia (consultar).

Los **prácticos** son de asistencia obligatoria y tendrán una frecuencia diaria y una carga horaria de 4 horas por día. Se extenderán desde el 29 de octubre al 16 de noviembre. La inscripción para los turnos se hará con los docentes del curso.

La **evaluación del curso** constará de: evaluación continua del desempeño en seminarios y prácticos, además de dos parciales a realizarse los días 26 de setiembre y 24 de octubre sobre contenidos tratados en seminarios y teóricos.

Los contenidos del programa, así como el material suplementario estarán disponibles a través del **EVA** (solicitar clave a los docentes).

Las **consultas** se evacuarán a través del EVA o en persona sólo los días viernes de 14 a 16 hs.

Bioquímica II

Cuestionarios Guía



1. Generalidades de nutrición. Macronutrientes y obesidad

Se solicita a los estudiantes recopilar información acerca de la pirámide alimentaria y leer el artículo por O'Keefe, J. H. y Cordain, L. 2004. Cardiovascular disease resulting from a diet and lifestyle at odds with our paleoithic genome: how to become a 21st-century hunter-gatherer. Mayo Clin. Proc. 79: 101-108.

Con respecto a la pirámide alimentaria:

1. ¿Qué es la pirámide alimentaria?
2. ¿Quién la ha diseñado?
3. ¿Cuándo fue hecha?
4. ¿Cuál es el objetivo de la pirámide alimentaria?
5. ¿Qué recomienda?

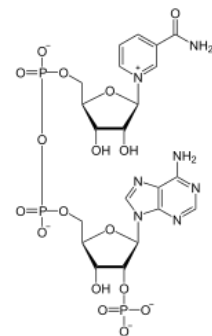
Con respecto al artículo de O'Keefe y Cordain:

6. ¿Cuál es la idea central del artículo?
7. ¿Qué ha ocurrido con nuestro patrimonio genético en los últimos 10000 años?
8. ¿Y con nuestra dieta y estilo de vida?
9. ¿Cuál es la principal causa de muerte en los Estados Unidos?
10. ¿Y en el Uruguay?
11. ¿Cuál piensa usted que era la principal causa de muerte en el paleolítico?
12. ¿En qué se basan los autores para afirmar que las personas del paleolítico “eran delgadas, estaban en forma y no tenían signos y síntomas de enfermedades crónicas”?
13. Según los autores, ¿qué ocurrió al pasar de un estilo de vida basado en la caza y la recolección a un estilo de vida donde la dieta está basada en los cereales?
14. Los estudios que relacionan la dieta con la salud cardiovascular, ¿qué tres factores rescatan?
15. Según los autores, ¿cómo era la dieta del cazador-recolector?
16. ¿Se parece a lo que usted come?
17. ¿Quiénes hoy en día tienen esa dieta?
18. ¿Qué similitudes y diferencias presenta la dieta del cazador-recolector con la dieta recomendada en la pirámide dietaria?
19. ¿Qué dicen los autores acerca de la adquisición de calorías?
20. ¿Qué dicen acerca del consumo de carbohidratos?
21. ¿Cómo dicen los autores que deben ser los lípidos de la dieta?
22. ¿Qué dicen acerca del consumo de carne?
23. Mencione algún aspecto del artículo que le parezca criticable, sin fundamento o con el cual no esté de acuerdo.
24. Mencione algún aspecto con el cual sí esté de acuerdo.

Micronutrientes

1. Vitaminas y ciclo del ácido cítrico
 - a. Enumere cuatro vitaminas hidrosolubles que participan en reacciones del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs) como coenzimas.
 - b. De qué coenzimas forman parte?

- c. En qué reacciones del ciclo de Krebs participan?
 - d. Una de ellas también es necesaria para la actividad de la piruvato deshidrogenada, cuál?
2. Bases de Schiff
 - a. Qué vitamina , actuando como co-enzima, se encuentra formando una base de Schiff con la enzima.
 - b. Esquematice la formación de la base de Schiff.
 - c. De qué tipo de enlace se trata?
 - d. Enumere las enzimas que catalizan este tipo de reacciones.
 3. Respecto al metabolismo de unidades monocarbonadas
 - a. Cuáles son las vitaminas que participan en el metabolismo de unidades monocarbonadas ?
 - b. Qué tejidos se verán más afectados ante la deficiencia de estas vitaminas y por qué?
 4. Respecto al colágeno
 - a.Cuál es la vitamina que participa en la modificación postraduccional más importante que sufre el colágeno?
 - b. Cuando se administró 4-hidroxiprolina marcada con ^{14}C a ratas, en el colágeno recién sintetizado no apareció 4-hidroxiprolina marcada. Explique.
 - 5.Cuál es la función más relevante de la vitamina A.
 6. En la figura se representa al NADP, marque la porción que los organismos superiores no pueden sintetizar, de qué vitamina se trata, qué función cumple esta co-enzima en el metabolismo. Cómo se obtienen los otros componentes de la molécula?
 7. ¿Cuál es el rol metabólico de los siguientes elementos, cuáles sus requerimiento nutricionales y en qué alimentos están contenidos?.
 - a. Calcio
 - b. Fósforo
 - c. Yodo
 - d. Flúor



2. Metabolismo de aminoácidos

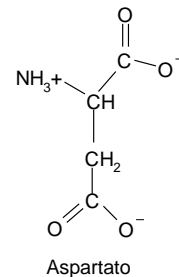
- Las enzimas transaminasas o aminotransferasas ocupan un rol importante en el metabolismo.
 - Describe la reacción que catalizan y su función.
 - ¿Cuál coenzima participa y de qué manera?

- ¿Por qué algunos aminoácidos son esenciales?
 - En la especie humana, ¿cuáles son los aminoácidos esenciales?
 - Explique si la siguiente afirmación es verdadera o falsa:

Dado que el nitrógeno del glutamato puede ser redistribuido por transaminación, el glutamato es un buen suplemento para proteínas pobres desde el punto de vista nutricional.

- ¿Existe una fuente de reserva de carbohidratos en los mamíferos? ¿Cuál?
 - ¿Y de lípidos?
 - ¿Y de proteínas?

- ¿Qué es un aminoácido esencial desde el punto de vista nutricional?
 - ¿Es el aspartato un aminoácido esencial para la especie humana?
 - Describe los metabolitos a partir de los cuales podría sintetizarse y las reacciones.
 - Describe tres roles biológicos de este aminoácido.



- Una persona adulta debe ingerir alrededor de 50 gramos de proteína por día.
 - ¿Qué pasa si ingiere más?
 - Su respuesta al punto anterior ¿sería diferente si considera independientemente a los aminoácidos glucogénicos de los cetogénicos?
 - ¿Cuáles son los intermediarios y las vías de ingreso para la formación de estos en cada caso?

- ¿Qué se entiende por balance de nitrógeno?
 - Una persona que está consumiendo una dieta vegetariana estricta, desbalanceada y diseñada sin asesoramiento profesional, presenta balance de nitrógeno negativo. Explique.

7. En la tabla se muestra la concentración plasmática de aminoácidos determinada en una persona sana, en reposo y durante ejercicio físico intenso.

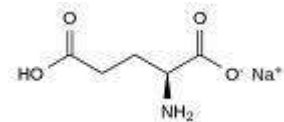
- Comente acerca de la abundancia relativa de los aminoácidos. ¿Cuál es el más abundante? ¿Se le ocurre el fundamento bioquímico?
- Cuando se determina la concentración de aminoácidos durante el ejercicio, se observa que la concentración de alanina aumenta. ¿Se le ocurre porqué?

Aminoácido	Reposo (µM)	Ejercicio (µM)
Alanina	313	378
Arginina	82	85
Aspartato	14	13
Cistina	57	ND
Fenilalanina	55	54
Glutamato	91	94
Glutamina	520	ND
Glicina	209	203
Histidina	88	90
Isoleucina	66	56
Leucina	128	105
Lisina	174	172
Metionina	27	26
Prolina	177	ND
Serina	113	112
Treonina	83	80
Tirosina	51	55
Valina	215	174

- d. En cambio, durante el ejercicio, se observa que disminuye la concentración de los aminoácidos de cadena ramificada, leucina, valina e isoleucina. Comente.

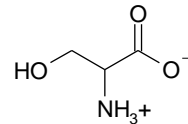
8. El glutamato es responsable del quinto sabor, umami, presente en alimentos como la salsa de soja y el caldo de carne. El umami es un sabor agradable, asimilable a la carne, que se suma a los sabores ácido (protones), dulce (sacarosa y otros compuestos), salado (iones sodio) y amargo (alcaloides y otros compuestos). En los últimos años, se han encontrado receptores especiales en la lengua para el glutamato. El glutamato monosódico se comercializa como aditivo para alimentos (Ajinomoto).

- e. ¿Se le ocurre el sentido evolutivo del desarrollo de un sistema para sentir glutamato?
 f. ¿Es un aditivo seguro para la salud humana? ¿Cómo haría para demostrarlo?
 g. ¿Cómo se cataboliza el glutamato?
 h. Describa por lo menos tres reacciones enzimáticas importantes para el organismo en las que participe el glutamato, analizando su relevancia.

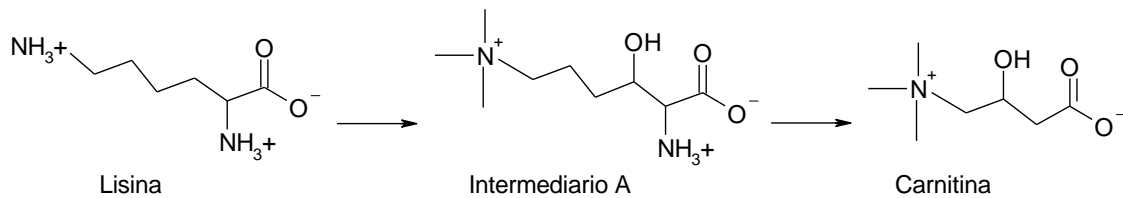


Glutamato monosódico

9. ¿Es la serina un aminoácido esencial para la especie humana desde el punto de vista nutricional? B. Proponga posibles vías de síntesis.

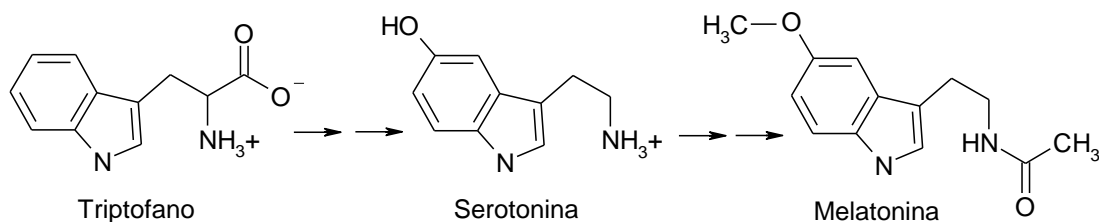


10. La carnitina, necesaria para el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria, se sintetiza a partir del aminoácido lisina, en una vía que tiene al compuesto A como intermediario. Con sus conocimientos de bioquímica, describa las reacciones de síntesis del intermediario A a partir de lisina, mencionando los cosustratos, cofactores y coproductos implicados.



11. El aminoácido triptofano sirve de precursor para la síntesis de serotonina, un importante neurotransmisor. A su vez, en la glándula pineal, la serotonina da origen a la melatonina, que actúa como reguladora del ritmo circadiano (ciclos sueño/vigilia).

Con sus conocimientos de bioquímica, describa qué tipo de reacción ocurre en cada paso del proceso. Proponga qué cosustratos y coenzimas o grupos prostéticos podrían participar en cada paso.



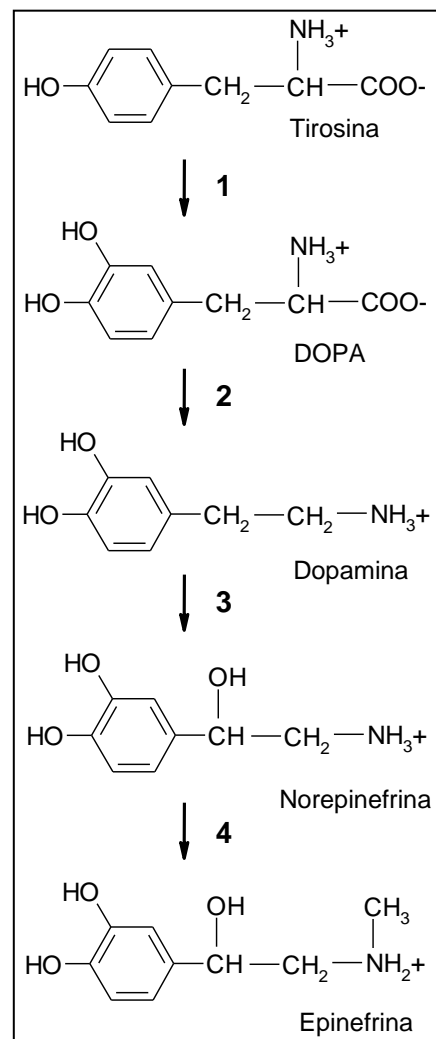
12.

- La fenilalanina es un aminoácido esencial pero la tirosina no. Discuta el fundamento bioquímico de esta afirmación.
- Algunos refrescos advierten del contenido de fenilalanina en la etiqueta. ¿Se le ocurre el fundamento bioquímico de esto?

13.

- La vitamina B6 ocupa un rol importante en el metabolismo de aminoácidos. ¿Qué coenzima se forma a partir de ella y qué rol(es) tiene?
- Si un individuo presenta una deficiencia de vitamina B6, indique cuál de los siguientes aminoácidos puede aún ser sintetizado a pesar de dicha deficiencia: serina, tirosina, alanina, cisteína, aspartato. Justifique.

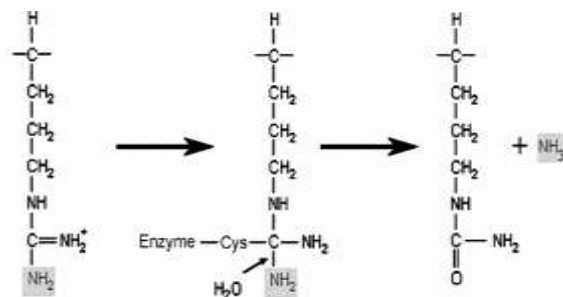
14. A la derecha se muestra la síntesis de epinefrina a partir de tirosina, que se da en la médula adrenal. Con sus conocimientos de bioquímica, describa qué tipo de reacción ocurre en cada paso del proceso. Proponga qué cosustratos y coenzimas o grupos prostéticos podrían participar en cada paso.



3. Modificaciones proteicas postraduccionales.

1. Nombre al menos 3 enzimas que se activan mediante una modificación postraducciona, especifique la modificación, el mecanismo por el cual esa modificación se lleva a cabo y todos los factores que participan en la misma, así como la probable repercusión sobre la estructura de la enzima modificada.
2. ¿Cómo afecta a los factores de la coagulación la carboxilación del glutamato?
3. ¿Qué particularidades tiene la incorporación de selenio a las proteínas que lo requieren?
4. Nombre al menos tres ejemplos de proteínas que sufren proteólisis limitada durante su activación.
5. Defina qué es y cómo se forma el enlace N-glucosídico.
6. Defina qué es y cómo se forma el enlace O-glucosídico
7. ¿Qué son los proteoglicanos y cómo se diferencian de las glucoproteínas?
8. ¿Cuál es el dador de grupos sulfatos para la sulfatación de proteínas, y el de metilos?
9. ¿Qué función se le ocurre que tenga la adición de cadenas hidrocarbonadas relativamente largas, como el miristoílo de 14 carbonos, a proteína?
10. ¿Qué tipo de modificación postraducciona sufren las proteínas modificadas por el receptor de insulina? A nivel de qué aminoácidos?, Esquematice al receptor, y su interacción con el ligando .

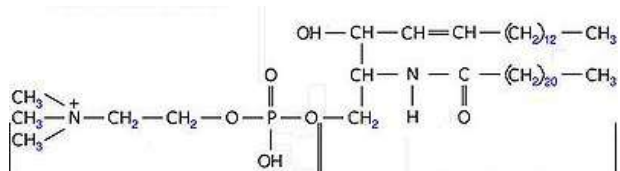
11. En la figura, ¿se esquematiza la transformación de qué aminoácido en qué producto? ¿Qué tipo de enzimas catalizan esta modificación y en qué tejido son abundantes estas enzimas? ¿Cuál es el cambio fundamental que sufre la proteína sustrato que le va a permitir a la producto asociarse con otras proteínas?



12. ¿Qué cofactor requiere la hidroxilación proteica y sobre qué aminoácidos y qué proteína es muy frecuente?

4. Generalidades sobre lípidos

1. ¿Cuál es el papel de los lípidos en la nutrición animal?
2. ¿Cómo se digieren y como se absorben los triacilglicéridos de la dieta?
3. ¿Cuáles son los tejidos que los emplean como fuente de energía y bajo qué condiciones?
4. ¿Existen lípidos esenciales, o dicho de otra manera es necesario consumir este tipo de moléculas? Si los hay, por qué son esenciales y cuáles son? Para qué los emplea el organismo? ¿Cuáles son sus fuentes dietéticas?
5. ¿Cuál es la función de las membranas biológicas, como se organizan sus componentes y qué función cumple cada uno de ellos?
6. ¿Cómo se generan los lípidos que forman los acúmulos de grasa en el interior de las células del tejido adiposo y qué relación guardan con cada uno los componentes de la dieta (lípidos, proteínas, glúcidos, etc)?
7. ¿Qué rol cumplen las hormonas en la acumulación de lípidos a nivel del tejido adiposo?
8. ¿Qué son, cómo están compuestos y qué función cumplen los glucolípidos de la membrana plasmática?
9. ¿Qué función cumple la flipasa en la membrana plasmática?
10. Respecto a la lecitina
 - a. Dibuje su estructura química, cuidando que los ácidos grasos sean los más frecuentemente encontrados formando parte de esta molécula.
 - b. ¿Qué tipo de moléculas son respecto a su solubilidad?
 - c. ¿Cuál es su carga, y la carga de los otros fosfolípidos, dibuje la porción polar de estos?.
11. ¿Cuál es la diferencias de los ácidos grasos omega 3 y omega 6 desde el punto de vista:
 - a. Estructural
 - b. Metabólico
12. ¿Qué tipo de molécula se representa en la figura, qué moléculas la forman y en qué tejido(s) es más abundante?



Lipoproteínas plasmáticas y alteraciones del metabolismo lipídico

1. ¿Qué características fundamentales se usan para clasificar / diferenciar a las lipoproteínas plasmáticas, y como se produce la transformación de unas lipoproteínas en otras?
2. ¿Qué rol tienen las apo-lipoproteínas, y los fosfolípidos en la constitución de las lipoproteínas plasmáticas?
3. Respecto a la lipoproteína lipasa (LPL),
 - a. Dónde se encuentra ubicada y qué importancia tiene?
 - b. ¿sobre qué lipoproteínas actúa?
 - c. ¿Cuáles son sus sustratos y productos?
4. ¿Cuál es el rol de la apoproteína CII en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas?
5. ¿Cuál es la proteína de membrana encargada de la salida de colesterol de las células periféricas hacia la HDL?
6. Por qué se considera como un riesgo para la salud el aumento de la relación LDL-colesterol/HDL-colesterol?
7. Respecto al colesterol
 - a. ¿Cómo se regula su síntesis?
 - b. ¿Cómo se elimina?
 - c. ¿Cuáles son las principales causas de hipercolesterolemia?
8. El receptor de LDL
 - a. ¿Qué es, y que fenómeno se desencadena luego de su unión con el ligando?
 - b. ¿Qué rol cumple en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas?
 - c. ¿Cómo se regula y qué tiene en común este mecanismo de regulación con la regulación de la síntesis de colesterol?
9. ¿Cómo demostraría que la apo-lipoproteína AI juega un rol importante en la prevención de la formación de placas de ateroma en diferentes arterias?
10. ¿Cómo demostraría si un fármaco sirve para prevenir y/o mejorar la formación de placas de ateroma?
11. Enumere las moléculas que se originan del colesterol y escoja una para describir el proceso y lugar de síntesis, enumerar las células blanco y los efectos ejercidos sobre estas.

Oxidaciones biológicas y antioxidantes

1. ¿Qué propiedades caracterizan a un “buen” antioxidante?
2. ¿Qué antioxidantes pueden ser incluidos dentro de los siguientes grupos de moléculas y cómo ejercen su actividad?
 - a. Las vitaminas
 - b. Las enzimas
 - c. Las co-enzimas
3. Respecto al glutatión:
 - a. Qué estructura tiene, dibújelo
 - b. Esquematice su síntesis
 - c. Luego de oxidado, ¿cómo se recicla?
4. ¿Cuáles son las fuentes principales de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno a nivel biológico?
5. ¿Cuál es la principal molécula antioxidante a nivel de las lipoproteínas plasmáticas y cuál sería su importancia?.
6. A nivel intracelular las enzimas antioxidantes se encuentran compartimentalizadas
 - a. En que compartimiento subcelular se encuentran las siguientes enzimas: Cu-Zn SOD, Mn SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y las diferentes iso-enzimas de peroxiredoxina.
 - b. ¿Cuál le parece que sería la importancia biológica de este hecho?
7. Si quisiéramos evaluar como varía el nivel de antioxidantes endógenos en relación a una patología, que otros factores de la población a estudiar (que podrían modificar los resultados) deberían considerarse.
8. Respecto a los polifenoles
 - a. ¿Qué tipo de moléculas son?
 - b. ¿Cuál es su importancia comercial?
9. El licopeno es un pigmento vegetal, soluble en grasas, con propiedades antioxidantes, que aporta el color rojo característico a los tomates y sandías. Pertenece a la familia de los carotenoides como el β -caroteno. Se ha visto que tanto el consumo de frutas y verduras que lo contienen como una concentración elevada en plasma se asocian con disminución en el índice de aparición de ciertas formas de cáncer y de accidentes vasculares arterioescleróticos. Esto no quiere decir que si lo ingerimos de forma aislada en pastillas o cápsulas vaya a mejorar nuestra salud. Comente.

5. pH, buffers y tampones fisiológicos

1. a) Calcule la masa de NaOH sólido del 80% de riqueza en peso, necesaria para preparar 250 mL de disolución 0,025 M y determine su pH. Masas atómicas: Na = 23; O = 16; H = 1.
b) ¿Qué volumen de la disolución anterior se necesita para neutralizar 20 mL de una disolución de ácido sulfúrico 0.005 M?
2. Calcule el pH de una disolución cuya concentración de iones hidroxilo es : (a) $4,5 \times 10^{-12}$ M; (b) 0,00316 M; (c) $2,3 \times 10^{-4}$ M.
3. Calcule el porcentaje de disociación y el pH de una disolución 0,0080 M de ácido acético. La constante de disociación K_a es $1,8 \times 10^{-5}$ a 25° C.
4. Calcule el grado de disociación de soluciones 0,10 M y 1,0 M de ácido acético ($K_a = 1,8 \times 10^{-5}$).
5. Un paciente enfisematoso de 63 años presentó la siguiente gasometría:
 - pO_2 : 63 mmHg (80-100)
 - pH: 7.33 (7.35-7.45)
 - pCO_2 : 81 mmHg (35-45)
 - HCO_3^- : 41 mM (23-43)

Qué tipo de trastorno del equilibrio ácido base presenta?

6. Un paciente alcohólico de 45 años de edad que fue admitido en el hospital presentó la siguiente gasometría:
 - pO_2 : 83 mmHg (80-100)
 - pH: 7.4 (7.35-7.45)
 - pCO_2 : 22 mmHg (35-45)
 - HCO_3^- : 13 mM (23-43)

En base a los datos de la gasometría, que conclusiones se pueden sacar?

7. Un sexagenario fue trasladado al hospital debido a sangrado digestivo, el paciente tenía antecedentes de cirrosis hepática complicada con varices esofágicas y se presentaba pálido, taquicárdico y con la presión arterial muy baja. Los estudios de laboratorio mostraron:

Ionograma:

- Na^+ : 139 mM (132-144 mM)
- K^+ : 4.8 mM (3.2-4.8 mM)
- Cl^- : 98 mM (98-108 mM)
- HCO_3^- : 6 mM (23-33 mM)
- Urea : 24 mM (3.0-8.0 mM)
- Creatinina: 0.24 (0.006-0.12 mM)

Gasometría

- pO_2 : 50 mmHg (80-100)
- pH: 7.13 (7.35-7.45)
- pCO_2 : 22 mmHg (35-45)

Sangre:

- Hemoglobina: 5.54 g/dL (13-18)

- a. Calcular el exceso de bases (EB). Sabiendo que el valor normal se encuentra entre 7-17 mEq/L y explicar el origen de su alteración
- b. Qué alteración del equilibrio ácido base presenta este paciente y cuál le parece que sería la causa?

Bioquímica II

Protocolos Prácticos



Buenas prácticas en el laboratorio

- No se puede fumar, comer o beber en el área de laboratorios, ni en los pasillos.
- En el laboratorio no está permitido usar celulares.
- El uso de túnica es obligatorio en todo momento dentro del laboratorio, y se recomienda el uso de pantalones y calzado cerrado.
- Usar guantes descartables siempre que se manipulen muestras y reactivos.
- Nunca pipetee reactivos o muestras con la boca.
- Use la campana de extracción siempre que use solventes orgánicos y ácidos concentrados.
- En caso de exposición accidental de piel, mucosa u ojos a algún reactivo avise al docente a cargo. Salvo algunas excepciones (ej. H_2SO_4) lo indicado es lavar la zona afectada con abundante agua.

Almacenamiento y manipulación de reactivos.

- Preste atención a los rótulos y etiquetas tanto respecto al contenido y su concentración como a los signos de advertencia: veneno, inflamable, corrosivo, etc., y proceda con las precauciones necesarias o pregunte al docente encargado como proceder.
- No deje nunca las botellas de reactivo abiertas. Reemplace la tapa inmediatamente después de remover el volumen necesario.
- Es buena práctica transferir el volumen de reactivo necesario para el experimento a un tubo limpio u otro recipiente para equilibrar a la temperatura de trabajo y volver a colocar la solución stock a 4°C.
- Evite contaminar las soluciones stock empleando para la transferencia pipetas o puntas de pipeta nuevos.
- Si necesita pesar material emplee espátulas limpias y secas.

Manipulación de muestras biológicas

- Además de los cuidados descritos previamente, asumiremos que todas las muestras se encuentran contaminadas con microorganismos patógenos y procederemos a su manipulación con las precauciones necesarias.
- Mantener las muestras biológicas siempre en el contenedor con hielo, extraer sólo la cantidad y el tiempo previo necesarios para equilibrar la muestra a la temperatura del experimento.

Ante cualquier duda PREGUNTE

Módulo I. Nutrición.

Determinación de capacidad antioxidante en alimentos.

Introducción

Las oxidaciones son reacciones químicas de transferencia de electrones entre un agente oxidante y un reductor. Bajo determinadas condiciones estas reacciones redox pueden generar moléculas altamente inestables capaces de reaccionar con oxígeno o con otras moléculas generando un desbalance redox, en el cual las oxidaciones se propagan a moléculas vecinas. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, impidiendo o terminando las oxidaciones en cadena. Aunque las reacciones de oxidación son cruciales para la vida, también pueden ser perjudiciales; por lo tanto las plantas y los animales mantienen múltiples sistemas antioxidantes, tales como glutatión y otros tioles, vitamina C, y vitamina E, así como enzimas tales como la catalasa, superóxido dismutasa y varias peroxidasas. Por su parte en los vegetales los polifenoles son muy importantes como antioxidantes.

En los últimos tiempos la determinación del contenido de antioxidantes se ha empleado como una herramienta para promover el consumo y sumarle valor agregado a productos de origen natural tales como: el vino, la miel y los propóleos, entre otros.

Preparación de extractos etanólicos (EE)

Preparar el EE (40 g/L) pesando 2 g de tejido molido (propóleos (M1), palta (M2), manzana (M3)), agregarle 20 mL de EtOH 75% y calentar a 50-60 °C con agitación durante 30 min. Dejar enfriar, filtrar, y llevar a 25 mL con EtOH 75%.

Preparación de Soluciones para el módulo

Buffer Fosfato 75 mM, pH 7.4 (BF)

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) 2 mM en etanol, 3 mL

2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en 40 mM HCl, 15 mL

Buffer acetato 300 mM, pH 3.6, 150 mL

FeCl₃ 20 mM, 15 mL

PBS pH 8.0, 100 mL

ABTS 5.00 × 10⁻⁴ M en PBS pH 8.0, 100 mL

Persulfato de sodio 6.89 × 10⁻³ M en PBS pH 8.0.

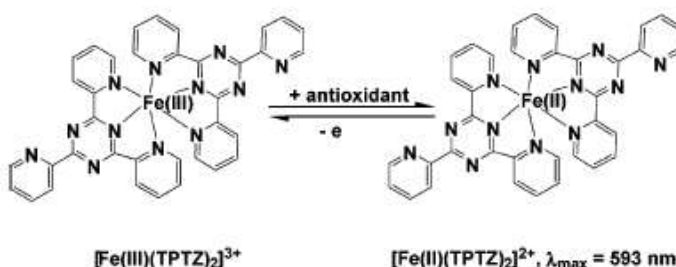
Para la preparación de ABTS: Se mezcla 1 mL de la solución de persulfato con 99 mL de la solución de stock de ABTS, incubándose durante 16 hrs en la oscuridad.

Fundamento teórico

Ferric Ion reducing antioxidant power (FRAP)

Es una técnica sensible y simple de realizar, que se emplea habitualmente para medir la capacidad antioxidante de diferentes fluidos del organismo, así como de diferentes componentes y

complementos de la dieta. En esta técnica una sal de hierro, el Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃, actúa como oxidante y cromóforo, ya que la forma reducida absorbe a 593 nm, no así la forma oxidada.



Procedimiento:

Preparar el reactivo FRAP, mezclando inmediatamente antes de usar:

2,5 mL de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM en 40 mM HCl
 25 mL de buffer acetato 300 mM, pH 3.6
 2,5 mL de FeCl₃ 20 mM

Sembrar 240 µL de este en el número adecuado de pozos de una placa de 96 (ver tabla).

Equilibrar a 37°C y medir absorbancia a 593 nm (absorbancia a tiempo cero).

Siguiendo el diseño que se muestra en la tabla, sembrar 10 µL de diluciones seriadas de Trolox (T, 0.05- 1 mM) y de las muestras (M, diluida 1/10, 1/100 y 1/1000).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	M1 1/10	M1 1/100	M1 1/1000
B	0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	M1 1/10	M1 1/100	M1 1/1000
C	0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	M1 1/10	M1 1/100	M1 1/1000
D	M2 1/10	M2 1/100	M2 1/1000	M3 1/10	M3 1/100	M3 1/1000	M4 1/10	M4 1/100	M4 1/1000	M5 1/10	M5 1/100	M5 1/1000
E	M2 1/10	M2 1/100	M2 1/1000	M3 1/10	M3 1/100	M3 1/1000	M4 1/10	M4 1/100	M4 1/1000	M5 1/10	M5 1/100	M5 1/1000
F	M2 1/10	M2 1/100	M2 1/1000	M3 1/10	M3 1/100	M3 1/1000	M4 1/10	M4 1/100	M4 1/1000	M5 1/10	M5 1/100	M5 1/1000

Incubar por 5 minutos.

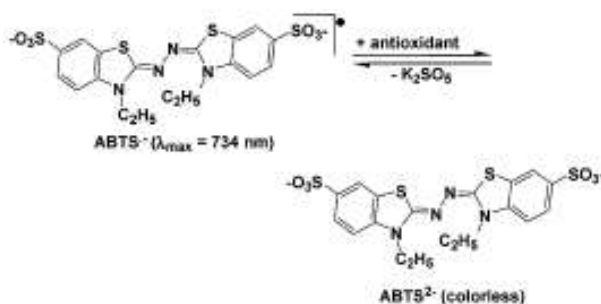
Medir absorbancia a 593 nm.

Calcular la diferencia entre la absorbancia a 5 minutos y tiempo cero.

Calcular el valor FRAP de la muestra en µM a partir de la curva de calibración.

TEAC - Ensayo de capacidad antioxidante equivalente a Trolox

Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC). En este ensayo el oxidante se genera mediante la oxidación mediada por persulfato del ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).



Procedimiento

Preparar varias diluciones de las muestras y del estándar (Trolox 0.05-1mM), todas por triplicado.

Sembrar en una placa de 96 pocillos 190 µL de ABTS.+ con 10 µL de lo que corresponda en cada pocillo según el esquema adjunto

Incubar por 30 min. a temperatura ambiente

Leer absorbancia a 420 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5	T=6	T=7	T=8	T=9	M1 dil -1	M1 1/100	M ₁ 1/1000
B	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5	T=6	T=7	T=8	T=9	M1 dil -1	M1 1/100	M1 1/1000
C	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5	T=6	T=7	T=8	T=9	M1 dil -1	M1 1/100	M1 1/1000
D	M2 dil -1	M2 1/100	M2 1/1000	M3 dil -1	M3 1/100	M3 1/1000	M4 dil -1	M4 1/100	M4 1/1000	M5 dil -1	M5 1/100	M5 1/1000
E	M2 dil -1	M2 1/100	M2 1/1000	M3 dil -1	M3 1/100	M3 1/1000	M4 dil -1	M4 1/100	M4 1/1000	M5 dil -1	M5 1/100	M5 1/1000
F	M2 dil -1	M2 1/100	M2 1/1000	M3 dil -1	M3 1/100	M3 1/1000	M4 dil -1	M4 1/100	M4 1/1000	M5 dil -1	M5 1/100	M5 1/1000
G	BLANCO											

Procesamiento de datos

Graficar el delta absorbancia en función de la concentración de Trolox.

Calcular la concentración de antioxidante o equivalentes de Trolox en las muestras.

Reportar los resultados obtenidos con cada técnica independientemente y graficar comparativamente (gráfico de Bland-Altman).

Referencias

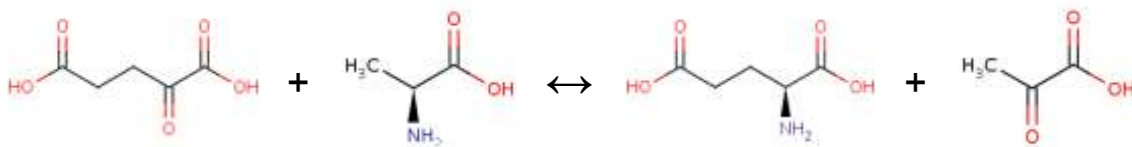
Huang D, Ou B, Prior R (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841–56.

Genta, G. Evaluación de las propiedades antioxidantes de propóleos uruguayos. Tesina de grado de la Licenciatura de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 2009

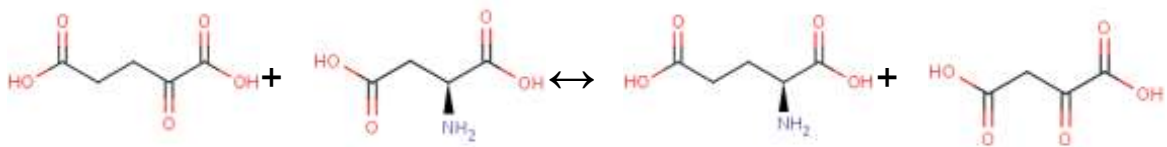
Módulo II: Aminoácidos y Proteínas

Medida de Actividad Transaminasa

La reacción de transaminación es probablemente una de las más difundidas en el metabolismo de los aminoácidos, su descubrimiento se debe a los científicos Braunstein y Kritzman en el año 1938. En esta reacción el grupo alfa-amino de un aminoácido es transferido al átomo de carbono alfa de un alfa cetoácido. Se conocen un gran número de transaminasas presentes en la mayoría de los tejidos. En las actividades prácticas a desarrollar estudiaremos la actividad de dos transaminasas diferentes en hígado, empleando dos técnicas la primera cromatográfica y la segunda espectrofotométrica. La transaminasa glutámico - pirúvica (TGP) o alanina amino transferasa (ALAT, EC 2.6.1.2) cataliza la transferencia del grupo amino del glutamato al piruvato para generar α -cetoglutarato y alanina:

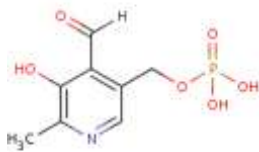


Por su parte, la transaminasa glutámico-oxalacética (TGO) o aspartato amino transferasa (ASAT, EC 2.6.1.1) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato para generar el aminoácido glutamato y el α -cetoácido oxalacetato.



La ALAT se encuentra predominantemente en hígado, mientras que la TGO tiene dos isoformas la TGO1 presente en glóbulos rojos y corazón y la TGO2 en mitocondrias hepáticas.

El fosfato de piridoxal, la forma biológicamente activa de la vitamina B6 es el cofactor de las reacciones catalizadas por estas enzimas.



A. Medida de actividad transaminasa en un lisado de hígado mediante cromatografía.

Materiales y Reactivos

- Baño termostático a 37°C
- Extracto enzimático de hígado
- Centrífuga, rotor y tubos de centrifuga de 15 mL y eppendorf de 1.5 mL
- Gradillas
- Pipetas automáticas P 20, 200 y 1000 y las puntas correspondientes.
- Cronómetro
- Papel de cromatografía
- Cámaras cromatográfica con tapa
- Estufa o secador potente
- Rociador
- Amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4)
- Arsenito de sodio 0,1 M. (para evitar la descarboxilación oxidativa del piruvato)
- Glutamato de sodio 0,2 M
- Glutamato de sodio 0.01 M (como estándar)
- Piruvato de sodio 0.2 M
- Alfa ceto-glutarato 0,01 M (como estándar)
- Alanina 0,01 M (como estándar)
- 2,4 dinitrofenilhidracina 5 mM (en HCl 2 M)
- Mezcla 1-butanol, NH₄OH, etanol (70:20:10) como solvente para cromatografía de cetoácidos
- Fenol-agua (80:20) como solvente para cromatografía de aminoácidos.
- Ninhidrina 0,2 % en etanol.

Actividades:

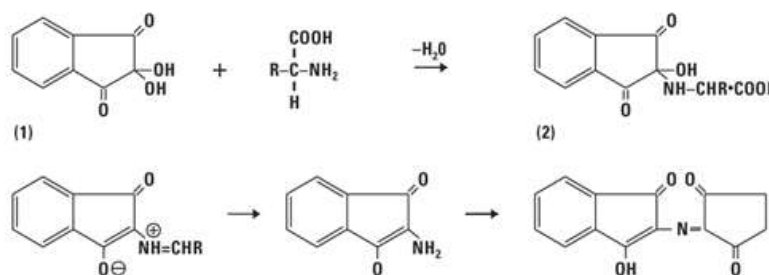
1. Preparación de soluciones
De las soluciones que se describen previamente, hacer los cálculos correspondientes (chequear los mismos con el docente) y preparar las soluciones a usar.
2. Preparación de homogeneizado de hígado.
 - a. En vaso de Bohemia apoyado en hielo cortar el hígado en trozos grandes empleando tijeras quirúrgicas y enjuagar varias veces con buffer fosfato para remover los restos de sangre.
 - b. Cortar el hígado en cubos pequeños (aprox 2 mm).
 - c. Transferir el tejido cortado al tubo del homogeneizador en aproximadamente 5 volúmenes de buffer fosfato/volumen de tejido y homogeneizar.
 - d. Centrifugar a 2500 rpm durante tres minutos a 4° C o filtrar a través de una gasa doble.
 - e. Guardar el sobrenadante en un tubo sumergido en baño de hielo y rotulado como extracto de hígado (EH).
 - f. Pasar la mitad del extracto a otro tubo rotulado como extracto de hígado calentado (EHC) y colocar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.
3. Desarrollo de actividad transaminasa para la cromatografía de aminoácidos
 - a. Preparar dos tubos falcon de 15 mL rotulados 1 y 2, de la siguiente forma:

	Volumen (μL)	
	Tubo 1	Tubo 2
Arsenito de sodio 0,1 M	200	200
Piruvato de sodio 0,2 M	150	150
Glutamato de sodio 0,2 M	150	150
Extracto de hígado (EH)	500	-----
Extracto de hígado calentado (EHC)	-----	500

Volumen final de reacción = 1000 μL

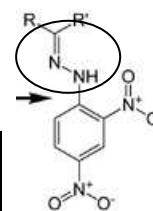
- b. Incubar los tubos a 37° C durante 1 hora para que transcurra la reacción.
 - c. Luego agregar 4 mL de etanol a cada tubo para detener la reacción.
 - d. Centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.
 - e. Conservar el sobrenadante para la identificación cromatográfica de los productos.
4. Cromatografía de aminoácidos
- a. Cortar un rectángulo de 5 x 10 cm de papel de filtro.
 - b. Sembrar en el extremo inferior el sobrenadante de los tubos 1 y 2 y los patrones de ácido glutámico (0.01 M) y alanina (0.01 M), identificándolas con un lápiz de grafo en el borde inferior del papel.
 - c. Colocar el papel sembrado en la cámara cromatográfica conteniendo la fase móvil (Fenol-agua (80:20)) y dejar correr el frente hasta una altura de 5 cm como mínimo.
 - d. Extraer y secar el papel al aire.
 - e. Para el revelado rociar el papel con ninhidrina* en la campana de gases y colocar en estufa hasta la aparición de las manchas.

* La ninhidrina es capaz de reaccionar rápidamente con el grupo α-amino de los aminoácidos, oxidándolo y liberando amonio. Este se condensa con la ninhidrina reducida y con otra molécula de ninhidrina para producir un aducto púrpura denominado Púrpura de Ruhemann



5. Actividad transaminasa para la cromatografía de cetoácidos.

- a. Primeramente se formarán las dinitrofenilhidrazonas de los cetoácidos, para ello prepare cuatro tubos de ensayo de la siguiente forma:



	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4
2,4 dinitrofenilhidracina	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Sobrenadante del tubo 1	100 μ L	-----	-----	-----
Sobrenadante del tubo 2	-----	100 μ L	-----	-----
Piruvato 0,2 M	-----	-----	100 μ L	-----
α-cetoglutarato 0,01 M	-----	-----	-----	100 μ L

Volumen final de reacción = 200 μ L

- b. Incube 10 minutos a temperatura ambiente para que transcurra la reacción.
6. Cromatografía de aminoácidos
- a. Siembre 10 μ L de sobrenadante de cada tubo en papel cromatográfico, identificándolos adecuadamente.
- b. Coloque el cromatograma en la cámara conteniendo la fase móvil (1-butanol, NH_4OH , etanol (70:20:10)) y déjelo correr hasta una altura de 5 cm como mínimo.
- c. Extraiga el papel y séquelo al aire.

Para el informe:

- Calcule los R_f de los patrones y muestras obtenidos en ambas cromatografías
- Identifique los aminoácidos y cetoácidos presentes en las muestras.
- Comparando los resultados de los tubos 1 y 2 y saque conclusiones acerca de los productos obtenidos en la reacción de transaminación.

B. Determinación de actividad transaminasa por espectrofotometría.

Fundamento:

El piruvato reacciona con dinitrofenilhidracina para formar la dinitrofenilhidrazona - piruvato y que al ser tratado con álcali fuerte resulta un color rojizo que absorbe luz a 505 nm, el cual es proporcional a la cantidad de piruvato y a la actividad de enzima presente en la muestra. Por su parte, el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato.

aspartato + α -ceto glutarato \rightarrow oxalacetato + glutamato

oxalacetato \rightarrow piruvato + CO₂

Materiales:

Baño termostatzado a 37° C

Cronómetro

Espectrofotómetro

Tubos y gradilla

Cubas de espectrofotómetro

Hígado de pollo, fracción citosólica.

Reactivos a preparar:

Sustrato TGO: 100 mM de L-aspartato y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4.

Sustrato TGP: 200 mM de dl-alanina y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4.

Reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH): solución conteniendo 2 mM DNPH en HCl 1 M.

Diluyente para Enzimas concentrado: solución de hidróxido de sodio 0.4 M. (Diluir la solución 4 M 1/10).

Estándar: solución de piruvato de sodio 2 mM. Listo para usar en la curva de TGP, diluir 1:2 con sustrato para la curva de TGO

Procedimiento:

Rotular tubos del 1 al 9, por duplicado, para la curva de calibración y por triplicado los tubos para el blanco (B), muestra (M) y control (C) **para cada una de las transaminasas** y proceder a preparar los tubos como se indica

Tubo	Agua destilada μ L	Piruvato μ L	Sustrato μ L	Muestra μ L
1	600	0	---	---
2	575	25	---	---
3	550	50	---	---
4	525	75	---	---
5	500	100	---	---
6	475	125	---	---
7	450	150	---	---
8	400	200	---	---

Tubo	Agua destilada (μL)	Piruvato (μL)	Sustrato (μL)	Muestra (μL)
B	100	---	500	---
M	---	---	500	100
C	500	---	---	100

Mezclar e incubar 30 min a 37° C.

Luego de transcurridos los 30 min agregar a cada tubo con intervalos de ½ minuto entre sí 500μL de DNPH, mezclar e incubar 10 min a 37° C.

Transcurridos 10 min de incubación en el primer tubo y manteniendo el control de tiempo cada ½ min agregar 5 mL de NaOH 0.4 M, mezclar por inversión y retirar del baño, esperar 10 min y leer absorbancia a 505 nm contra agua.

Par el informe:

- Graficar absorbancia a 505 nm en función de la concentración de piruvato y calcular a partir de ésta la concentración de piruvato formado en el tubo que contiene la muestra empleando la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la del blanco.
- Multiplicar por el factor de dilución, y calcular la velocidad de generación de piruvato por minuto, y la actividad del preparado (UI = μmoles/min).
- Calcular el CV%.
- ¿Por qué no fue necesario incluir fosfato de piridoxal en el tubo de muestra?.

Identificación de mecanismos catalíticos de enzimas proteolíticas¹.

Enzimas proteolíticas o peptidasas son las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. En base al mecanismo de catálisis se dividen en: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metálicas; por otro lado se agrupan aquellas que su mecanismo catalítico es desconocido (1).

Los métodos de determinación de actividad utilizan sustratos naturales o proteínas modificadas, generalmente conjugadas con un cromóforo, que permite seguir la hidrólisis espectrofotométricamente.

Para caracterizar una proteasa se determina como afecta su actividad la presencia de diferentes inhibidores conocidos. Se incuba la enzima con cada inhibidor determinado lapso y luego se determina actividad, por el método normal empleado para su medida inicial. El resultado, generalmente, se expresa como porcentaje remanente de actividad enzimática o en base a él se calcula el % de inhibición. Las principales características de los inhibidores de proteasas que utilizaremos en el práctico se muestran en la tabla 1.

	EDTA	I/A	PMSF
	Ac. etilendiaminotetracético	Iodoacetamida	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
Proteasas blanco	proteasas metálicas proteasas activadas por metales	proteasas cisteínicas	proteasas serínicas
Peso molecular	372,24 (sal disódica dihidratada)	184,9	174,2
Concentración efectiva	1-10 mM.	10-100 µM (preparar antes de usar)	0,1-1 mM (vida media 1 h a pH 7,5)
Solución stock	0,5 M en agua, pH 8,5.	10-100 mM en agua (preparar antes de usar)	200 mM en solventes secos (metanol, etanol)
Notas	Actúa como quelante del ión zinc del sitio activo de las proteasas metálicas pero puede también inhibir otras proteasas dependientes de iones metálicos tales como las proteasas cisteínicas dependientes de calcio.	No es específico para el residuo de cisteína del sitio activo de las proteasas cisteínicas y puede inhibir muchas otras enzimas. También reacciona con tioles de bajo peso molecular como β-mercaptoetanol.	También inhibe proteasas cisteínicas

Tabla 1. Inhibidores de proteasas que utilizaremos en el práctico (2).

Ensayos de inhibición de actividad proteolítica.

Evaluaremos la susceptibilidad de un preparado enzimático a la acción de inhibidores específicos de tipo catalítico. A cada grupo se asignará una muestra con actividad proteolítica previamente determinada. Cada subgrupo preincubará su extracto con las siguientes sustancias: PMSF, iodoacetamida y EDTA en las concentraciones finales que se indican en la tabla 1. Paralelamente se preincubará un extracto al cual no se le agregó ninguna sustancia. Se determinará la actividad proteolítica de las diferentes muestras utilizando caseína como sustrato.

Materiales:

Preparados enzimáticos con actividad proteolítica

- Buffer de actividad: Tris HCl 0,2 M, pH 8,0
- Caseína 1% (p/v) en buffer de actividad.

¹ Docentes responsables: Carolina Villadónica y Diego Valles

- Acido tricloroacético (TCA) 5 % (p/v) en agua.
- EDTA 500 mM
- IAA 100 mM
- PMSF 200 mM

Procedimiento:

Preincubación de los preparados enzimáticos los inhibidores.

1. Preparar las mezclas de preincubación como con se indica la tabla 2.
2. Incubar durante 15 minutos a 37 °C.

	A1	A2	A3	Ac
Preparado enzimático +	EDTA	IAA	PMSF	-
Concentración final				
Volumen de solución stock (mL)				
Volumen de diluyente (mL)				
Volumen final (mL)				

Preparación de sustrato para ensayo de actividad proteolítica (caseína al 1%)

1. Pesar 1g de caseína y colocar en un erlenmayer.
2. Agregar 100 mL de buffer (Tris HCl 0,1 M, pH 8,0)
3. Calentar a baño María 20 min a ebullición
4. Filtrar en caliente con papel de filtro.
5. Llevar a temperatura de reacción.

Actividad caseinolítica (3).

Determinar actividad caseinolítica de las muestras (triplicado) y los blancos (duplicado) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Colocar 50µL de cada alícuota del preparado enzimático en eppendorf en baño termostático a 37 °C, agregar 550µL de caseína.
2. Incubar el tiempo adecuado y agregar 900µL de TCA 10%.
3. Colocar los tubos 30 minutos en la heladera
4. Centrifugar 30 min a 10000 rpm.
5. Medir la absorbancia a $\lambda = 280 \text{ nm}$ ($A_{280 \text{ nm}}$) habiendo ajustado previamente el cero con el blanco correspondiente a cada muestra.
6. Para preparar los blancos, mezclar: 50 µL de preparado enzimático, 900 µL de TCA 10% y 550 µL de caseína.

Una unidad caseinolítica (Ucas) se define como la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm (con un paso de celda de 1 cm) por minuto en las condiciones del ensayo

Para el informe:

1. Calcular las Unidades caseinolíticas por mL (Ucas/mL) de la siguiente forma:

$$\text{Ucas/mL} = A_{280\text{nm}} \times \text{toma (mL)} \times \text{dilución} / \text{tiempo (min)}$$
2. Proponer el o los mecanismo/s catalítico/s de las enzimas proteolíticas en cada preparado.
3. Calcular el porcentaje de actividad remanente en cada caso tomando como 100 % de actividad la desarrollada por el control sin inhibidor.

Bibliografía

1. Barret AJ, Rawlings ND y Woessner JF. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2004, Academic Press, London.
2. Beyond RJ, Bond JS. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.*, 2001, IRL Press, Oxford
3. Vallés D., Furtado S. and Cantera A. M. B., 2006. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia Antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 409–413

Módulo III: Lípidos y Lipoproteínas plasmáticas.

Práctico 1. Determinación de la concentración plasmática de colesterol

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares, compuestos por proteínas (apo-lipoproteínas) y lípidos. La relación cualitativa y cuantitativa de estos componentes determina el tamaño y la densidad de las lipoproteínas, características empleadas para la clasificación. Desde este punto de vista del transporte plasmático de colesterol las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL y HDL) tienen un rol fundamental. Bajo condiciones normales la concentración plasmática de colesterol unido a estas lipoproteínas guarda un fino equilibrio dependiente entre otros factores del control preciso de la síntesis de colesterol y del número y funcionalidad de los receptores de LDL. Se ha visto que la cantidad de colesterol asociado a la lipoproteína de alta densidad (HDLc) guarda relación inversa con la cifra de arteriopatía coronaria. En cambio, el colesterol unido a LDL (LDLc) aumentado en sangre constituye un importante factor de riesgo para la aterosclerosis coronaria y tiene relación con el grado de lesión arterial, lo que ha sido demostrado a través de diferentes estudios epidemiológicos, experimentales y anatomoclínicos.

El cociente LDLc/HDLc se emplea en la clínica como un índice de riesgo de aterosclerosis. Numerosos estudios, incluyendo el Framingham Heart Study y el Ensayo de Intervención Múltiple sobre Factores de Riesgo, han aportado la base para ensayos clínicos dirigidos a reducir los lípidos y lipoproteínas séricos. La disminución de estos factores de riesgo reduce la incidencia de enfermedad coronaria, accidente cerebro-vascular y otras enfermedades vasculares. El LDLc constituye, entonces, un factor de riesgo causal modificable para la aterosclerosis coronaria (8). La clasificación de los enfermos con base en las características y tendencias de estos niveles permite identificar las hiperlipoproteinemias y las hipolipoproteinemias.

OBJETIVO

Determinar la concentración plasmática de colesterol total y unido a HDL y LDL, así como el cociente HDLc/LDLc con un método analítico empleando kits y técnicas que se emplean normalmente en el laboratorio clínico.

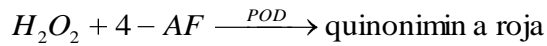
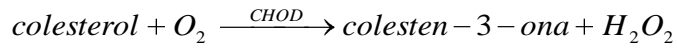
MATERIALES

- Suero o plasma heparinizado, otros anticoagulantes interfieren con la determinación
- Reactivo precipitante para la determinación de HDLc: sulfato de dextrán (PM 50.000) 0,032 mM y cloruro de magnesio 1,5 M.
- Reactivo precipitante para la determinación de LDLc: 1 g/l de sulfato de polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH 6,7.
- Estándar de colesterol (2 g/L).
- Colestat Enzimático (Wiener Lab), conteniendo 4-aminofenazona (4-AF) 0.2 mM, colesterol esterasa (CHE) ≥ 100 U/L, colesterol oxidasa (CHOD) ≥ 100 U/L, peroxidasa (POD) ≥ 1000 U/l, fenol 15 mM, colatodç de sodio 0.2 mM, amortiguador Good 50 mM, pH 6.8 (PIPES).
- Espectrofotómetro y cubas
- Pipetas automáticas y puntas
- Pipetas graduadas y peras
- Gradillas para tubos eppendorf, tubos eppendorf de 1.5 mL, tubos falcon de 15 mL.
- Baño termostatzado

- Heladeras y hielo

METODOS

La determinación de colesterol se basa en el empleo del sistema enzimático colesterol esterasa/colesterol oxidasa acoplado a peroxidasa/peróxido/4-aminofenazona (4-AF) desarrollado por Ramírez et al. (2005).



Para determinar el colesterol unido a HDL se precipitan las lipoproteínas más grandes y menos densas (LDL y VLDL), mediante polianiones en presencia de cationes divalentes (sulfato de dextrano-cloruro de magnesio), las HDL quedan en el sobrenadante y el colesterol unido a éstas se cuantifica empleando el sistema enzimático descrito previamente.

Las LDL se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular (sulfato de polivinilo). Luego de centrifugar, se cuantifica en el sobrenadante el colesterol unido a HDL y VLDL. El colesterol unido a LDL se determina a partir de la diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante.

Procedimiento:

1. Obtención de fracciones enriquecidas en HDL
 - Preparar el reactivo precipitante mezclando volúmenes iguales de sulfato de dextrán y cloruro de magnesio, cantidad necesaria.
 - A un tubo eppendorf rotulado con el número 1, agregar 50 µL de reactivo precipitante a 500 µL de suero.
 - Homogeneizar sin invertir e incubar en hielo durante 30 minutos.
 - Centrifugar a 1500xg durante 30 minutos a 4° C.
 - Separar el sobrenadante inmediatamente y conservar para la determinación de colesterol como se describe en 3.
2. Obtención de fracciones reducidas en LDL
 - A un tubo eppendorf rotulado con el número 2, agregar 100 µL de reactivo precipitante (sulfato de polivinilo) a 200 µL de suero.
 - Homogeneizar sin invertir e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 - Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
 - Separar el sobrenadante inmediatamente y conservar para la determinación de colesterol como se describe en 3.
3. Determinación de colesterol en las fracciones enriquecidas en HDL (aislada en 1), las reducidas en LDL (aislada en 2) y suero sin fraccionar (colesterol total).
 - Rotular tubos eppendorf de A a E para preparar diluciones de colesterol que usaremos como estándar.

Tubo	Concentración de colesterol (g/L)	Reactivo de trabajo	Colesterol (2 g/L)
A	0.25	175 µL	25 µL
B	0.5	150 µL	50 µL
C	0.75	125 µL	75 µL
D	1	100 µL	100 µL
E	1.5	50 µL	150 µL

- Preparar el número necesario de tubos según la tabla, recordando que cada condición debe prepararse por triplicado, y que cada muestra original de suero dio origen a tres fracciones diferentes de colesterol: 1. Fracción enriquecida en HDL. 2. Fracción reducida en LDL. 3. Colesterol total (suero sin procesar). Los controles

	Concentración de colesterol (g/L)	Reactivo colestat	Colesterol (tubos A-E)	Fracción
Blanco	0	1 mL	-	--
Colesterol A	0.25	950 μ L	50 μ L	--
Colesterol B	0.5	950 μ L	50 μ L	--
Colesterol C	0.75	950 μ L	50 μ L	--
Colesterol D	1	950 μ L	50 μ L	--
Colesterol E	1.5	950 μ L	50 μ L	--
Fracción 1	--	950 μ L	--	50 μ L
Fracción 2	--	950 μ L	--	50 μ L
Suero sin fraccionar	--	950 μ L	--	50 μ L
Controles	--	900 μ L	50 μ L	50 μ L

*por triplicado para cada muestra.

- Incubar todos los tubos a 37° C durante 30 minutos.
- Para leer absorbancia se puede emplear directamente el espectrofotómetro con cubas de 1 mL o transferir 200 μ L de cada una de las muestras a placas de 96 pozos y leer con lector de placas (ver el filtro).
- Leer absorbancia de **505 nm** contra el blanco (ajustar el cero).
- Si alguno de los valores quedara por fuera de la curva de calibración diluir en blanco.

Procesamiento de datos

- Generar la curva de calibración graficando: Absorbancia en función de la concentración de colesterol, a partir de la pendiente calcular el coeficiente de absortividad molar.
- Calcular la concentración de colesterol en las fracciones empleando el coeficiente determinado. Para reportar los resultados multiplicar por la dilución empleada durante el paso de precipitación, y calcular a partir de estos el promedio de cada valor para cada muestra y los desvíos estándares y los CV% correspondientes.
 - Comente la reproducibilidad del método considerando sus CV% para estándares y muestras. Compare sus valores y calcule los CV% con los valores obtenidos por los otros grupos.
 - Calcule el nivel de recuperación a partir de los controles.
- Calcular la concentración de LDLc a partir de la diferencia entre colesterol total y el de la fracción reducida en LDL.
- Calcular el cociente HDLc/LDLc para cada muestra.
- Graficar la media de cada uno de los parámetros determinados mediante gráficos de tipo estadístico donde se comparen medias y los percentiles (tipo *box* u otro similar) de los valores obtenidos para controles y portadores. Comente los resultados.

Bibliografía

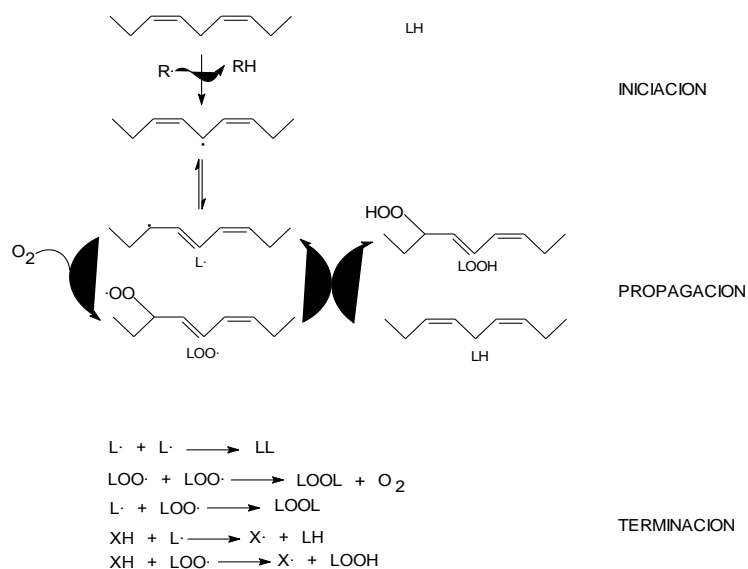
- Report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Ach. Int. Med.*, **1998**; 148:36-69.
- **Stykowski P, et al.** Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *New Engl. J. Med.* **1990**; 322:1635-1641.
- **Neaton JD, Wentworth D.** Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by ages for 316.099 white men. Multiple Risk Factor intervention Trial Research Group. *Arch. Intern. Med.* **1992**;152:56-64.
- **Stewart BF. et al.** Benefits of lipid lowering therapy in men with elevated apolipoprotein B are not confined to those with very high low density lipoprotein cholesterol. *J.A. Coll. Cardiol.***1994**; 23:899-906.
- **Ramírez A, et al.** Comparación entre la determinación analítica del colesterol-LDL y su estimación por cálculo. *Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud* , **2005** Vol. 3 (1), 43-46.

Práctico 2. Aislamiento y oxidación de LDL por Cu(II)²

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son partículas esféricas con un diámetro de 19-23 nm, un peso molecular entre 1,8 y 2,8 millones y una densidad entre 1,019 y 1,063 g/ml. Cada partícula contiene alrededor de 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos que juntos forman un centro lipofílico rodeado por una monocapa formada principalmente por fosfolípidos (particularmente fosfatidilcolina) y colesterol libre. Las cabezas polares de los fosfolípidos se encuentran en la superficie de la partícula de LDL contribuyendo a su solubilidad en la fase acuosa. Alrededor del 50 % son ácidos grasos presentes en la LDL son poliinsaturados, principalmente ácido linoleico (18:2). En la capa externa de la molécula se encuentra la única proteína que forma parte de la LDL y que recibe el nombre de apolipoproteína B-100 (apo B-100). La apo B-100 es una proteína constituida por 4536 aminoácidos y un peso de 512 kDa. Es importante resaltar la presencia de diversos antioxidantes como componentes estructurales de la LDL. Entre ellos se destaca el α -tocoferol con una concentración que equivale a aproximadamente seis moléculas de α -tocoferol por partícula de LDL. Los demás antioxidantes, como ser el γ -tocoferol, β -caroteno, α - caroteno y ubiquinol-10 se encuentran en cantidades menores. La hipótesis oxidativa de la aterosclerosis postula que las placas de ateroma se forman a partir de células (principalmente macrófagos y musculares lisas) cargadas con lípidos (ésteres de colesterol), como consecuencia de modificaciones oxidativas de la LDL (LDL oxidada o LDLox).

Oxidación lipídica. La lipoperoxidación es el proceso en el cual el oxígeno molecular es incorporado a moléculas de lípidos insaturados (LH) para formar hidroperóxidos lipídicos (LOOH). El proceso de ataque oxidativo que sufren los lípidos insaturados se debe a reacciones en cadena mediadas por radicales libres, iniciadas por la abstracción de un átomo de hidrógeno del metileno *bis*- alílico del lípido insaturado por un radical libre reactivo y seguido por una secuencia de reacciones de propagación.

² Modificado bajo autorización de: Trostchansky, A.; Trujillo, M.; Castro, L.; y Rubbo, H. Estudio de las modificaciones oxidativas de la lipoproteína de baja densidad (LDL): análisis de la oxidación del componente lipídico y proteico. Actividad Práctica UTI-DREMR Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, 2007.



Las tres fases de la lipoperoxidación.

LH: lípido; L·: radical (centrado en el carbono) lipídico; LOOH: hidroperóxido lipídico; LOO·: radical lipoperóxido; XH: compuesto

La lipoperoxidación procede a través de tres fases (ver esquema): iniciación, propagación y terminación. La fase de iniciación, el primer paso crítico, está promovida por algún tipo de "iniciador" (en nuestro caso Cu^{2+}) que sobrepasa la energía de disociación del enlace alílico causando la abstracción del hidrógeno y entonces la formación del radical alquilo (L·). La oxidabilidad de un lípido está dada por la facilidad con la que el átomo de hidrógeno inicial puede ser abstraído. Una vez que se formó el radical alquilo grupos adyacentes le proveen estabilización por resonancia. El oxígeno molecular reaccionará rápidamente con el radical alquilo para formar en el caso del O_2 radical peróxido (LOO·). El radical peróxido es un importante intermediario en la cadena de propagación porque una vez formado, continuará la cadena de reacciones oxidativas abstrayendo un átomo de hidrógeno de otros grupos alquilo cercanos. Este ciclo de reacciones propagadoras se repite a través de la abstracción de hidrógenos y formación de LOO·, siempre que se encuentran disponibles suficientes moléculas de O_2 y sustratos lipídicos insaturados. La duración del ciclo de reacciones de radicales peróxido es gobernado por varias reacciones competidoras de terminación. En teoría, estas incluyen la reacción bimolecular de dos radicales alquilo o de dos radicales peróxido para formar productos no radicalares. También existen reacciones de tipo radical-radical entre los radicales lipídicos generados durante la propagación y otras especies radicalares

Objetivos.

Estudiar la oxidación de la LDL por Cu(II) utilizando diferentes metodologías experimentales, analizando las modificaciones sufridas por los tres principales componentes de la lipoproteína: lípidos, apolipoproteína B-100 y antioxidantes.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos:

Plasma 24 mL

buffer fosfato 50 mM, pH 7.4

NaCl 0.15 M, KBr, $CuSO_4$, BHT, SDS 8,1% (0,405g en 5mL de agua)

Ácido 2- tiobarbiturico (TBA) al 0,8% (0,16 g en 20 mL de agua nano pura con agitación y calor)

Acido acético al 20% (4 mL en 16 mL de agua)

Malondialdehído (1,1,3,3-teramethoxypropane, MDA) 1mM (16,42 μ L en 100 mL de agua)
Gel de agarosa al 0,5% en buffer de corrida (Tris-Glicina 1x pH=8,3), aproximadamente 60 mL
→ 0,4 gr de agarosa

Buffer de muestra 5x : 0,58 mL de glicerol + 0,42 mL de H₂O + 1 mL de buffer corrida 10x

Buffer corrida: Tris-Glicina 1x pH=8,3, aproximadamente 500 mL. Se prepara por dilución de un stock 10x: 114,2 gr glicina + 30,3 gr Tris, disolver en 800 mL de H₂O, ajustar pH a 8,3 y llevar a 1 litro.

Solución de fijación: 250 mL de etanol:acético:agua (60:10:30) → 150 mL de EtOH + 25 mL acético + 75 mL de H₂O

Solución de tinción: Coomasie Brilliant Blue R-250 0,15% en Destain. Preparar aprox. 120 mL → 0,18 gr coomasie

Solución de Destain: MeOH:acético:H₂O (35:25:40). Se prepara 1 litro

Equipos:

Oxímetro con electrodo tipo Clarck, espectrofotómetro, cubas de cuarzo y vidrio, baño termostatzado, cuba y fuente de poder para electroforesis en agarosa.

Protocolo experimental.

Purificación de LDL.

- A partir de plasma humano fresco se purifica la fracción de LDL por ultracentrifugación.
- Se agregan 0.28 g de KBr por mL de plasma para llevar la solución a una densidad final de 1.3 g/L. Colocar en agitador hasta disolución total del KBr, obteniendo una solución de una fase.
- Cada tubo de ultracentrifugación debe llenarse hasta la tapa y el volumen total es de 20-22 mL. Agregar primero 8 mL de suero con KBr (~40% del volumen total). Luego agregar por las paredes lentamente 12 mL (~60%) de NaCl 0.15 M (0.9 %, isotónico).

Nota: el NaCl se agrega sobre las paredes del tubo para evitar que se mezclen ambas soluciones y alcanzar eficientemente el gradiente de densidad.

- Se centrifuga en rotor 60Ti a 55.000 rpm (300.000 x g) durante 90 minutos a 4 °C.
- Sacar los tubos con mucho cuidado del rotor evitando que se mezclen las fases y separar la banda de color naranja que se observa en la parte inferior del tercio superior del tubo evitando arrastrar fracciones superiores.
- La concentración proteica se determina a 280 nm (ϵ = 1 mg/mL) y la LDL se guarda a 4° C (nunca congelarla).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA MÓDULO II

- CuSO₄ 5 mM, 5 mL
- H₂O₂ 100 mM, 2 mL
- Amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4, 500 mL
- Buffer de corrida Tris-glicina stock 10x pH=8,3. Pesar 57,1 g. de glicina + 15,15 g. de Tris, disolver en 400 mL de H₂O, ajustar el pH a 8,3 y llevar a 500 mL con agua. Utilizar en una dilución 1X (50 mL de 10X + 450 mL de agua)
- Gel de agarosa al 0,5%. Para 1 gel pesar 0.2 g de agarosa y agregar 40 mL de buffer de corrida 1X (Tris-Glicina 1x pH=8,3) y colocar en soporte de electroforesis horizontal, con el peine correspondiente. Una vez gelificado colocar el gel con soporte en bolsa tipo ziploc con toallas de papel húmedas hasta su utilización.

- Buffer de muestra 5x : 580 μL de glicerol + 370 μL de H_2O + 50 μL de solución 1% de azul de bromofenol (cf: 0.025%) +1 mL de buffer corrida Tris-glicina 10x. Volumen total 2 mL. Alicuotar de a 200 μL en tubos eppendorf.
- Solución de Destain: MeOH:acético: H_2O (35:25:40). Se prepara 1 litro
- Solución de tinción Coomasie Brilliant Blue R-250 0,15% en Destain. Pesar 0.18 g de Coomasie R-250 y agregar 120 mL de solución de Destain
- Solución de fijación de etanol:acético:agua (60:10:30).
- Para 250 mL colocar 150 mL de EtOH + 25 mL acético + 75 mL de H_2O
- MDA (malondialdehído) 100 μM (8 μL en 500 mL de agua destilada)
- Sol.TCA/TBA/HCl: 15% w/v de TCA / 0.375 % w/v TBA / 0.25 N HCl. Calentar para favorecer la disolución del TBA. En 500 mL: 75 g de TCA/1.9 g de TBA/10mL HCl cc

DIA 3

PRÁCTICO 2 OXIDACIÓN DE COMPONENTES NO LIPÍDICOS EN LDL

Objetivo 1.

Estudiar la oxidación de los carotenoides presentes en la LDL por diferentes oxidantes

Reactivos

- LDL purificada
- CuSO_4 (5 mM)
- H_2O_2 (100 mM)
- Amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4

Medida de oxidación de carotenoides.

- 1) Determinar la concentración de LDL mediante la medida de absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{280} = 1$ mg/mL, PM: 500.000 g/mol).
- 2) Realizar un espectro de absorbancia para la LDL entre 380 y 550 nm para determinar el máximo de absorbancia para los carotenoides.
- 3) Tome 4 tubos y prepare un volumen final de 1 mL con las siguientes condiciones:
 - A) LDL (4 μM o 2mg/mL conc. final) como control
 - B) LDL (4 μM o 2mg/mL conc. final) + CuSO_4 (300 μM conc. final)
 - C) LDL (4 μM o 2mg/mL conc. final) + CuSO_4 (300 μM conc. final) + H_2O_2 (5 mM conc. final)
 - D) LDL (4 μM o 2mg/mL conc. final) + H_2O_2 (5 mM conc. final)
- 4) Sin demora pase el contenido de los tubos a cubetas de 1 mL y realice medidas puntuales a 460 nm (o el máximo determinado en el espectro) cada 3 minutos, durante 60 minutos para las tres condiciones.
No olvide ajustar previamente el cero del espectrofotómetro con agua o buffer
- 5) Preparación de muestras para electroforesis (objetivo 2) prepare un duplicado de A y C. Para el tubo A retire 40 μL a tiempo 0 y 60 min, para el tubo C retire 40 μL a tiempo 30, 45 y 60 min. A medida que vaya obteniendo las alícuotas agregue 10 μL de buffer de la muestra 5x.

Objetivo 2.

Estudiar la oxidación de Apo B100 por CuSO₄/H₂O₂

Reactivos

- Muestras obtenidas en objetivo 1
- Buffer de corrida Tris-glicina **stock 10x** pH=8,3.
- Gel de agarosa al 0,5%
- Buffer de muestra 5x
- Solución de Destain
- Solución de tinción Coomassie Brilliant Blue R-250
- Solución de fijación de etanol:acético:agua (60:10:30).

Electroforesis en agarosa.

- a. Se siembran por pocillo hasta 20 µL de solución de muestra con una cantidad final de proteína entre 10 a 20 µg.
- b. Corrida: 40 minutos a 65 voltios constante (aprox.30 mA) + 15 minutos a 90 voltios
- c. Fijación: 10-20 minutos en solución de fijación (antes de fijar poner en el congelador la solución de fijación y de tinción).
- d. Deshidratar el gel por peso entre papel de filtro seco (45 minutos mínimo)
- e. Coloración: 10 minutos en solución de tinción
- f. Decoloración: 1 hora (o hasta que exista buen contraste bandas/fondo) en destain con cambios sucesivos de la solución

Procesamiento de datos

- Calcular la concentración de la LDL purificada
- Presentar espectro de la LDL, señalando el máximo de absorbancia para los carotenoides.
- Calcular las pendientes para cada una de las condiciones y discutir el resultado obtenido con los diferentes oxidantes utilizados.
- Graficar las medidas realizadas en función del tiempo identificando, donde amerite, las fases de latencia, propagación y terminación.
- Para el caso de la electroforesis, y de acuerdo a la literatura, identificar las especies presentes en cada carril.

Bibliografía

- Herrera E. Metabolismo de las Lipoproteínas. In: Graw-Hill IM, ed. Elementos de Bioquímica, 1993.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341-90.
- Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27:1-10.
- Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1987; 22:299-304.
- Trostchansky, A., Batthyany, C., Botti, H., Radi, R., Denicola, A., and Rubbo, H. Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**: 225-232.; 2001
- Trostchansky, A., Ferrer-Sueta, G., Batthyany, C., Botti, H., Batinic-Haberle, I., Radi, R., and Rubbo, H. Peroxynitrite-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrin in the presence of uric acid. *Free. Rad. Biol. Med.* **35**: 1293-1300; 2003

DIA 4

Oxidación lipídica de LDL

Objetivo 1.

Oxidación lipídica de LDL por consumo de oxígeno

Reactivos

- LDL purificada
- CuSO₄ (5 mM)
- Amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4

Equipo

Oxímetro con electrodo tipo Clarck y baño termostatzado

Medidas de consumo de oxígeno.

CALIBRACIÓN: El oxímetro se calibra al 100% de oxígeno mediante el burbujeo con pipeta pasteur durante algunos minutos para saturar con aire la cámara que contiene agua solamente. Posteriormente esperar a que se estabilice la medida y llevar a 100% con la perilla de CAL. La concentración de O₂ correspondiente al 100% depende de la temperatura:

Temperatura (°C)	O ₂ nmoles/mL
5	397
10	351
15	314
20	284
25	258
28	244
30	237
35	222
37	217

Una vez calibrado se puede empezar a trabajar.

No olvidar dejar con agua la cámara una vez que se termina de trabajar.

La oxidación de la LDL se lleva a cabo a 25°C en presencia de Cu(II) de acuerdo a Batthyany C. et al (Arch. Biochem. Biophys., 2000).

En un volumen final de 2 mL, se incuba LDL (0.5 mg/mL, concentración final) en buffer fosfato 50 mM, pH 7.4 con CuSO₄ en una relación LDL/Cu(II) de 1:75. La mezcla de reacción se coloca sin demora en la cámara del oxímetro de 1.6 mL de volumen final con agitación constante.

El consumo de oxígeno se registra cada 3 min. durante 100 minutos.

Objetivo 2.

Oxidación lipídica de LDL por TBARS.

La técnica se basa en la reacción de ciertos compuestos aldehídicos (provenientes de la lipoperoxidación) con el ácido 2-tiobarbitúrico.

Reactivos

- LDL purificada
- CuSO_4 (5 mM)
- Amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.4
- MDA (malondialdehído) 100 μM
- Sol. TCA/TBA/HCl
- BHT 2.5 % w/v en etanol (0.05 g en 2 mL)

TCA: ácido tricloroacético

TBA: ácido tiobarbitúrico

TMP = MDA: malondialdehído

Realice la siguiente curva de calibración

MDA (μM)	Vol. MDA (μL)	Vol. buffer (μL)
0	0	1000
0.5	5	995
1	10	990
2	20	980
3	30	970
5	50	950
7	70	930
9	90	910

- Realice cada punto de la curva por triplicado en tubos de TBARS.
- Agregue 2 mL de solución TCA/TBA/HCl, mezclar enérgicamente y calentar a ebullición durante 15 min. Cuando el tubo alcance la temperatura ambiente mida la absorbancia a 535 nm ($\epsilon_{535\text{nm}} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previa realización de un blanco conteniendo: 1 mL de agua / 2 mL sol. TCA/TBA/HCl.

Oxidación de LDL

- En un volumen final de 2 mL coloque LDL ($\sim 1\text{mg/mL} = 2 \mu\text{M}$), CuSO_4 en una relación LDL: CuSO_4 (1:75, 150 μM) y H_2O_2 (5 mM) e incube a temperatura ambiente. Realice este tubo por duplicado
- De cada tubo tome alícuotas de 350 μL cada 20 minutos, incluyendo $t=0$ y agregue 650 μL de buffer y 45 μL de BHT 2.5%.
- Una vez obtenidos todos los tubos, caliente a ebullición por 15 min, espere a que se enfríe y centrifugue durante 10 min./1000 rpm
- Mida a 535 nm ($\epsilon_{535\text{nm}} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previa realización de un blanco conteniendo: 1 mL de agua / 2 mL sol. TCA/TBA/HCl.

Procesamiento de datos

- 1) Graficar los datos obtenidos en la oximetría identificando las fases de latencia, propagación y terminación.
- 2) Indicar para cada fase los principales intermediarios involucrados y que función cumplen: reductor u oxidante.

Referencias

- Herrera E. Metabolismo de las Lipoproteínas. In: Graw-Hill IM, ed. Elementos de Bioquímica, 1993.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341-90.
- Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27:1-10.
- Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1987; 22:299-304.
- Trostchansky, A., Batthyany, C., Botti, H., Radi, R., Denicola, A., and Rubbo, H. Formation of lipid-protein adducts in low-density lipoprotein by fluxes of peroxynitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **395**: 225-232.; 2001
- Trostchansky, A., Ferrer-Sueta, G., Batthyany, C., Botti, H., Batinic-Haberle, I., Radi, R., and Rubbo, H. Peroxynitrite-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrins in the presence of uric acid. *Free. Rad. Biol. Med.* **35**: 1293-1300; 2003

Módulo IV. Oxígeno y metabolismo de xenobióticos.

Día 3

XENOBIOTICOS³

Objetivo:

Estudiar la metabolización *in vitro* de un potencial profármaco citotóxico para células tumorales hipóxicas por DT-diaforasa utilizando fracción citosólica de hepatocitos de rata.

Introducción

La alta proliferación de células tumorales lleva al desarrollo de masas tumorales que por su rápido crecimiento no se vascularizan adecuadamente, dejando poblaciones celulares distantes de los vasos sanguíneos y como consecuencia son hipóxicas. A pesar de que la hipoxia tumoral es un problema al conferir resistencia a las terapias antitumorales actuales, en las circunstancias apropiadas puede ser visto como una ventaja. La identificación de la sobreexpresión de algunas enzimas en células tumorales hipóxicas como DT-diaforasa, CYP450, xantina oxidasa y aldehído oxidasa llevó al desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como profármacos bio-reducibles en hipoxia. Estos profármacos son compuestos inactivos *per se* que se reducen enzimáticamente *in vivo* a un intermediario, fármaco que es citotóxico, siendo este proceso reversible en presencia de oxígeno. De esta forma diseñar un profármaco sustrato de alguna de estas enzimas puede ser una buena estrategia para el desarrollo de fármacos antitumorales más selectivos.

Esto llevó al desarrollo de profármacos derivados de dióxidos de fenazinas, diseñadas como posibles interactuantes con ADN (figura 1). Los dióxidos de fenazina poseen grupos N-óxido que pueden bio-reducirse en condiciones de hipoxia. De manera que los dióxidos de fenazina pueden ser reducidos a la correspondiente fenazina (totalmente reducida, fármaco II, figura 1). Este proceso en condiciones de oxigenación normal (normoxia) es revertido.

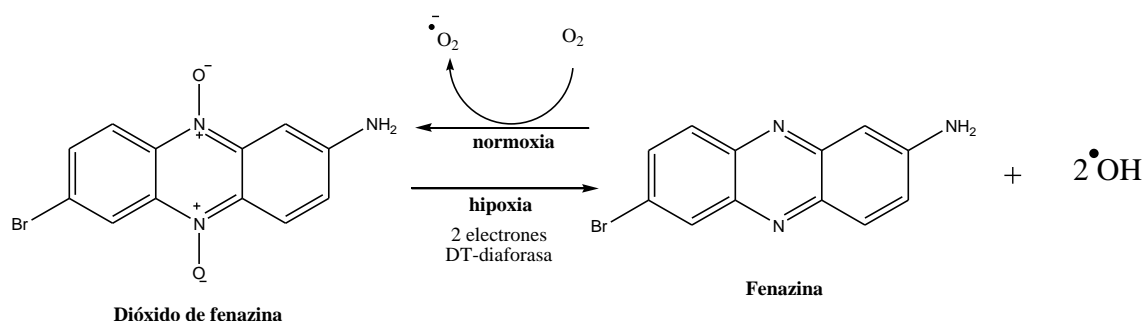


Figura 1-Dióxidos de fenazina como profármacos bio-reducibles en hipoxia.

La DT-diaforasa (EC 1.6.99.2), a pesar de no ser una transferasa es una enzima de detoxificación de xenobióticos de fase II y por tanto se encuentra predominantemente (90%) en el citosol. Es una flavoproteína que existe como dímero, teniendo cada monómero un peso molecular de 32.000 kD y se encuentran asociados no covalentemente con un grupo FAD como grupo prostético. Se puede referir a ella con sinónimos como NAD(P)H:quinona oxidoreductasa, vitamina K reductasa, menadiona reductasa entre otros.

La enzima cataliza la reducción de quinonas a sus respectivas hidroquinonas utilizando con la misma eficiencia NADH o NADPH como donadores de electrones (figura 2). También puede

³ DOCENTES RESPONSABLES: MAURICIO CABRERA, MARIA LAURA LAVAGGI

utilizar compuestos no-quinónicos como otros sustratos aceptores de electrones, un ejemplo lo constituyen algunos di-*N*-óxidos de aminas aromáticas como es el caso de dióxido de fenazina que se estudiará en este práctico. La reacción catalizada por DT-diaforasa transcurre via un mecanismo “Ping Pong”, la enzima forma un complejo binario con el donador de electrones, se disocia, reacciona luego con el sustrato aceptor de electrones y se disocia dando el producto.

Figura 2- Reducción de quinonas a sus respectivas hidroquinonas.

Es así que en base a la hipótesis que los dióxidos de fenazinas son capaces de sufrir procesos de bio-reducción en hipoxia, llevaremos a cabo un estudio enzimático para verificar si efectivamente estos compuestos son capaces de bio-reducirse. Para ello se estudiará la bio-reducción de un derivado de dióxido de fenazina en presencia de fracción citosólica de hepatocitos de rata y un sistema generador de NADPH (cofactor de algunas de las posibles enzimas involucradas en la bio-reducción) en condiciones de hipoxia y oxigenación normal. A su vez se estudiará si la bio-reducción es exclusivamente enzimática realizando el mismo procedimiento en ausencia del sistema generador de NADPH y por otro lado utilizando fracción citosólica inactivada térmicamente.

También se confirmará la participación de la enzima DT-diaforasa en la bio-reducción. Para ello se utilizará dicumarol, inhibidor de la actividad de esta enzima y se analizará los productos formados durante la incubación de las fenazina con fracción citosólica pre incubada con este inhibidor. La ausencia de productos de bio-reducción, en el ensayo con el agregado de dicumarol, confirmaría la participación de esta enzima en el proceso de bio-reducción.

Técnicas experimentales.

1) Bio-reducción¹. Se agrega un volumen a determinar de amortiguador fosfato (0.1M, 1.5 mM EDTA, pH 7.4), 10 μ L de cada uno de los componentes de un sistema generador de NADPH (1.3 mM MgCl₂, 40 μ M NADP⁺, 3.5 mM glucosa-6-fosfato, 0.5U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), 10 μ L del dióxido de fenazina disuelto en DMSO (40 mM) y un volumen a determinar para que la concentración final sea de 1mg/mL de fracción citosólica (obtenida del homogeneizado de hígado de rata Wistar de 3 semanas de 200g de peso corporal) para un volumen final de 1mL. Se incuba durante 30 minutos a 37°C. **La bio-reducción en condiciones de hipoxia simulada se realiza gaseando con nitrógeno previamente la mezcla de buffer y el sistema generador de NADPH durante 20 minutos, luego se agrega el dióxido de fenazina y la fracción citosólica y se incuba durante 30 minutos a 37°C.**

2) Aislamiento de los productos resultantes de la bio-reducción. La reacción se detiene agregando 400 μ L de metanol. Los productos se aíslan realizando tres extracciones con 400 μ L de acetato de etilo. El disolvente orgánico se destila a vacío y se resuspende en un volumen mínimo de acetona o acetato de etilo.

3) Identificación de los productos de bio-reducción por CCF. Se realiza una cromatografía en capa fina (SiO₂, acetato de etilo:hexano 1:1). Se comparan los productos obtenidos con patrones de posibles productos resultantes de la bio-reducción previamente sintetizados. La CCF se revelan con luz UV.

4) Identificación de la enzima de la bio-reducción.² Se realiza el ensayo de bio-reducción incubando previamente la fracción citosólica con el inhibidor enzimático (400 µM) durante 30 minutos, en presencia de nitrógeno. Inhibidores: para DT-diaforasa se utiliza dicumarol. Posteriormente se agrega el sistema generador de NADPH (1.3 mM MgCl₂, 40 µM NADP⁺, 3.5 mM glucosa-6-fosfato, 0.5U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y se gasea nitrógeno por 20 minutos. Posteriormente se agrega el dióxido de fenazina y se incuba por 30 minutos a 37°C. El proceso continúa según el punto 2)

Tabla de soluciones y reactivos.

Nombre	Concentración
Dióxido de fenazina	40 mM, en DMSO
Fracción citosólica [proteína]	21.53 mg/ml
MgCl ₂	1.3 mM
NADP ⁺	40 µM
Glucosa-6-fosfato	3.5 mM
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	0.5U/mL
Dicumarol	40 mM, en DMSO

Referencias:

1. Lind, C.; Cadenas, E.; Hochstein, P.; Ernster, L. DT-diaphorase: purification, properties and function. *Methods in Enzymology*, 186, 287-301, 1990.
2. Danson, S.; Ward, T.; Butler, J.; Ranson, M. DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 437-439, 2004.
3. Lavaggi, M.; Cabrera, M.; Cerecetto, H.; González, M. Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chemical Research in Toxicology*. 21, 1900-1906, 2008.
4. Sun, Z-C.; Botros, E.; Su, A-D.; Kim, Y.; Wang, E.; Baturay, N.Z.; Kwon, C-H. Sulfoxide-containing aromatic nitrogen mustards as hypoxia-directed bioreductive cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43, 4160-4168, 2000

Módulo V: Proteínas y pH plasmáticos

Cuantificación de albúmina y tioles en plasma ⁴

Introducción

La albúmina es la proteína mayoritaria del plasma, representa ~60 % del total de proteínas. Sus roles principales constituyen el mantenimiento de la presión coloidosmótica y la unión y transporte de diferentes ligandos, como ácidos grasos, bilirrubina, hormonas, vitaminas, hemina, ácidos biliares y cationes, así como una larga lista de compuestos exógenos. Esta capacidad de unir ligandos constituye el fundamento del procedimiento habitual para cuantificar albúmina a través del cambio en las propiedades ópticas de un colorante. La albúmina posee también un rol antioxidante que puede atribuirse a la presencia de una cisteína con un grupo funcional tiol (RSH), capaz de reaccionar con diferentes oxidantes. A diferencia de los compartimientos intracelulares, que poseen una alta concentración de tioles proteicos y no proteicos, como el glutatión (~5 mM), los compartimientos extracelulares, y particularmente el plasma, poseen concentraciones relativamente bajas de tioles reducidos, los cuales por su parte corresponden fundamentalmente a la albúmina.

Objetivo

- a. Determinar la concentración de albúmina en plasma.
- b. Determinar la concentración de tioles totales y tioles de bajo peso molecular.

Materiales

- Sangre de oveja. Mantener en hielo.
- Estándar de albúmina bovina de concentración conocida de aproximadamente 30 mg mL⁻¹. Mantener en hielo y conservar congelada.
- Tubos falcon de 15 mL.
- Centrífuga con rotor para tubos falcon de 15 mL.
- Reactivo BCP. Púrpura de bromocresol (BCP) 40 µM en amortiguador acético 0.1 M, pH 5.2.
- Reactivo DTNB. Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 200 µM en amortiguador pirofosfato 0.1 M, pH 9. Proteger de la luz.
- Amortiguador pirofosfato de sodio, 0.1 M, pH 9.
- Ácido tricloroacético (TCA) 45%.
- Colorímetros y celdas de plástico para 1 mL.
- Tubos de ensayo apropiados para trabajar con volúmenes de 1 mL.
- Gradillas.

Procedimiento

1. **Obtención de plasma a partir de la sangre.** Centrifugar aproximadamente 10 mL de sangre ovina en un tubo falcon de 15 mL, a 1000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Separar el sobrenadante (plasma) y guardarlo en otro tubo falcon de 15 mL, en hielo. Guardar también los glóbulos en hielo.

⁴ Protocolo elaborado por Beatriz Alvarez y Lucía Turell

2. **Determinación de la concentración de albúmina.** La albúmina del plasma se cuantificará utilizando el colorante púrpura de bromocresol (BCP), cuya absorbancia a 603 nm aumenta cuando está unido a la albúmina (Fig. 1). El valor de absorbancia obtenido para el plasma se comparará con una curva de calibración realizada con albúmina bovina estándar. Cada dilución se realiza por triplicado. La actividad se realiza completando la tabla de datos adjunta.

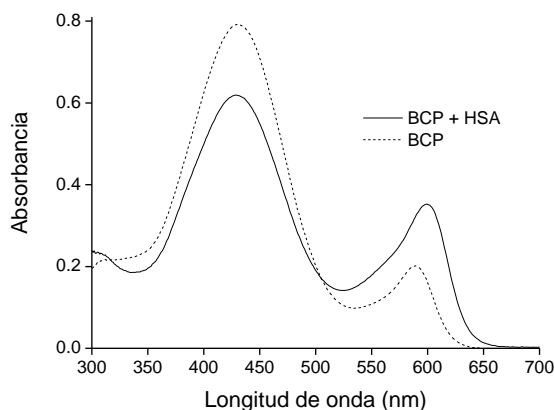


Fig. 1. Espectro UV-vis de púrpura de bromocresol (BCP, 40 μM en amortiguador acético, 0.1 M, pH 5.2) en ausencia (línea punteada) y presencia (línea continua) de albúmina humana (0.066 g L^{-1} , 1 μM).

2.1. Preparación de diluciones para la curva de calibración.

- Rotular 7 x 3 tubos de ensayo.
- Colocar 0, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 y 20 μL de albúmina bovina (BSA) estándar.
- Completar a 20 μL con agua.

2.2. Preparación de diluciones de la muestra problema de plasma ovino.

- Rotular 2 x 3 tubos de ensayo.
- Colocar 5 y 20 μL de plasma ovino.
- Completar a 20 μL con agua.

2.3. Desarrollo de color y lectura de la absorbancia.

- Agregar 1 mL de BCP a cada tubo y agitar.
- Leer la absorbancia a 603 nm. Previamente, asignar una absorbancia cero colocando agua en la celda.
- Anotar los valores de absorbancia en la tabla de datos.

2.4. Procesamiento de los datos.

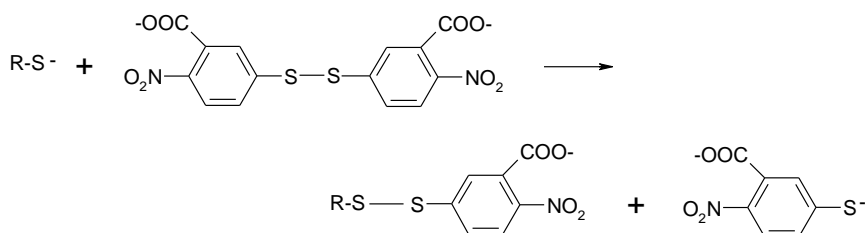
- Calcular la concentración de albúmina en cada condición de la curva de calibración y anotarla en la tabla de datos.
- Graficar absorbancia a 603 nm versus concentración de albúmina.
- Considerando la porción lineal de la gráfica, determinar la mejor recta y sus parámetros.
- Intrapolar en la curva de calibración, utilizando los valores correspondientes a la dilución que caiga dentro de la gráfica.
- Expresar la concentración de albúmina del plasma ovino en mg/mL de plasma y en μM , sabiendo que el peso molecular es de 66 kDa.

Tabla de datos para la determinación de la concentración de albúmina

Tubo	Volumen BSA (μL)	Volumen agua (μL)	Volumen plasma (μL)	Volumen BCP (μL)	[BSA] final (mg mL^{-1})	Absorbancia a 603 nm (blanco agua)
1a	0	20	-	1000	0	
1b	0	20	-	1000	0	
1c	0	20	-	1000	0	
2a	5	15	-	1000		
2b	5	15	-	1000		
2c	5	15	-	1000		
3a	7.5	12.5	-	1000		
3b	7.5	12.5	-	1000		
3c	7.5	12.5	-	1000		
4a	10	10	-	1000		

4b	10	10	-	1000		
4c	10	10	-	1000		
5a	12.5	7.5	-	1000		
5b	12.5	7.5	-	1000		
5c	12.5	7.5	-	1000		
6a	15	5	-	1000		
6b	15	5	-	1000		
6c	15	5	-	1000		
7a	20	0	-	1000		
7b	20	0	-	1000		
7c	20	0	-	1000		
8a	-	-	5	1000	-	
8b	-	-	5	1000	-	
8c	-	-	5	1000	-	
9a	-	-	20	1000	-	
9b	-	-	20	1000	-	
9c	-	-	20	1000	-	

3. **Determinación de la concentración de tioles totales en el plasma.** Se utilizará el disulfuro 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB, reactivo de Ellman), el cual, al reaccionar con un tiol (más precisamente un tiolato), libera tionitrobenzoato, amarillo, que se puede cuantificar por su



absorbancia a 412 nm. Se deberá restar las contribuciones a la absorbancia del reactivo y el plasma por sí solos.

- Según tabla adjunta, rotular 3 x 3 tubos de ensayo.
- Colocar 150 μL de agua (tubos 1, para controlar la contribución del reactivo).
- Colocar 150 μL de plasma (tubos 2 y 3).
- Colocar 1 mL de DTNB en los tubos 1 y 2.
- Colocar 1 mL de pirofosfato 0.1 M, pH 9, amortiguador en el cual se disuelve DTNB, en los tubos 3, para controlar la contribución del plasma.
- Leer la absorbancia a 412 nm. Previamente, asignar un valor de absorbancia cero a la celda conteniendo agua.
- Determinar la concentración de tioles totales en el plasma utilizando el valor del coeficiente de absorptividad del tionitrobenzoato, $\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tabla de datos para la determinación de tioles totales

Tubo	Volumen agua (μL)	Volumen plasma (μL)	Volumen DTNB (μL)	Volumen pirofosfato (μL)	Absorbancia a 412 nm (blanco agua)
1a	150	-	1000	-	
1b	150	-	1000	-	
1c	150	-	1000	-	

2a	-	150	1000	-	
2b	-	150	1000	-	
2c	-	150	1000	-	
3a	-	150	-	1000	
3b	-	150	-	1000	
3c	-	150	-	1000	

4. **Determinación de la concentración de tioles de bajo peso molecular en el plasma.** Se precipitarán proteínas utilizando ácido tricloroacético. Luego de centrifugar, se determinarán los tioles en el sobrenadante utilizando la misma reacción con DTNB.

- Colocar 2 mL de plasma en un tubo falcon de 15 mL.
- Agregar 0.2 mL de ácido tricloroacético 45%.
- Centrifugar 5 minutos en minifuga.
- Pasar el sobrenadante a otro tubo falcon.
- Según tabla adunta, rotular 2 x 3 tubos de ensayo.
- Colocar 150 μ L de agua (tubos 1, para controlar la contribución del reactivo).
- Colocar 150 μ L de sobrenadante o plasma deproteinizado (tubos 2).
- Colocar 1 mL de DTNB en los tubos 1 y 2.
- Leer la absorbancia a 412 nm. Previamente, asignar un valor de absorbancia cero a la celda conteniendo agua.
- Determinar la concentración de tioles de bajo peso molecular en el plasma utilizando el valor del coeficiente de absorptividad del tionitrobenzoato, $\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. No olvidar tener en cuenta el efecto de la dilución por agregado del ácido tricloroacético.

Tabla de datos para la determinación de tioles de bajo peso molecular

Tubo	Volumen agua (μ L)	Volumen sobrenadante (μ L)	Volumen DTNB (μ L)	Absorbancia a 412 nm (blanco agua)
1a	150	-	1000	
1b	150	-	1000	
1c	150	-	1000	
2a	-	150	1000	
2b	-	150	1000	
2c	-	150	1000	

Conclusiones

- ¿Cómo son los valores de albúmina, tioles totales y tioles de bajo peso molecular?
- ¿Qué relación hay entre los valores de tioles totales y los de albúmina?

Actividades adicionales

1. Cuando centrifugó la sangre, obtuvo una fracción de glóbulos. Si quisiera trabajar con ellos, ¿en qué los resuspendería? ¿Qué ocurriría si los resuspende en agua destilada? Si le da el tiempo, pruébelo.
2. ¿Qué valor de pH espera para el plasma? Si le da el tiempo, verifíquelo.

Bibliografía

Pinnell A. (1978) New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromcresol purple. *Clin. Chem.* 24/1, 80-86

- Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 266-276.
- Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. and Alvarez, B. (2009) Sulfenic acid - A key intermediate in albumin thiol oxidation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877(28):3384-92.
- Alvarez, B., Carballal, S., Turell, L. and Radi, R. (2010) Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin. *Meth. Enzymol.* 473, 117-136.