

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

I. Conceptos teóricos iniciales

El método científico	04
El Sistema Internacional de Unidades (SI)	06
Matemáticas para el laboratorio	10
Notación científica o exponencial	10
El método del factor unitario en los cálculos	11
Logaritmos	12
Gráficas	14
Algunos métodos utilizados en bioquímica	15
Centrifugación	15
Potenciometría	17
Electroforesis	19
Soluciones	22
Manejo de material biológico	28
Medidas de seguridad	31

II. Prácticas de laboratorio

<i>Práctica 1.</i> Soluciones	42
<i>Práctica 2.</i> Regulación del equilibrio ácido-base después de ejercicio muscular intenso y de la ingestión de bicarbonato de sodio	47
<i>Práctica 3.</i> Cinética enzimática. Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de la reacción enzimática	51
<i>Práctica 4.</i> Estudio del bombeo de protones por levaduras; efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones de los desacoplantes	57
<i>Práctica 5.</i> Determinación de glucosa en sangre total	60
<i>Práctica 6.</i> Determinación de lipoproteínas	63
<i>Práctica 7.</i> Integración metabólica	71
<i>Práctica 8.</i> Huella génica	79

III. Casos de correlación bioquímica y práctica médica

Caso 1. Cólera	85
Caso 2. Oclusión intestinal. Acidosis metabólica. Deshidratación grave	86
Caso 3. Hipoglucemia secundaria a intoxicación Alcohólica	88
Caso 4. Cetosis por inanición. Obesidad	89
Caso 5. Hipercolesterolemia y aterosclerosis	91
Caso 6. Gota	93

IV Casos clínicos (ABP)

Caso 1 Vi morado y rojo en poco tiempo	95
Caso 2 Sin aire me ahogo	96
Caso 3 Todo gira a mi alrededor	97
Caso 4 Sólo con sombrero salgo al sol	98

V Casos anexos

Caso 1 Obesidad infantil	100
Caso 2 Anorexia nerviosa	101
Caso 3 Diabetes mellitus gestacional	102
Caso 4 Síndrome de Cushing iatrogénico	102
Caso 5 Insuficiencia hepática secundaria a cirrosis Hepática	103

I

CONCEPTOS TEÓRICOS INICIALES

EL MÉTODO CIENTÍFICO

La cultura no puede comprenderse sin hacer referencia al método científico. La ciencia no es un sector de la civilización que pueda separarse del resto de ella, sino un esfuerzo creativo con su propio sistema de valores que, poco a poco, ha llegado a formar parte de los valores generales en la sociedad moderna.

La ciencia está basada en el método científico; su capacidad y limitaciones están definidas por él y dondequiera que el método científico sea aplicable, puede haber ciencia.

El origen de la ciencia se pierde en el más remoto pasado. Mucho antes de que existieran los registros históricos de la humanidad, la magia primitiva dio origen también a la religión y, mucho antes, al arte. Ciencia, religión y arte difieren en métodos, pero coinciden en metas: comprender e interpretar al universo y la interacción de sus partes para promover el progreso material y espiritual de la humanidad.

El objetivo de la ciencia es hacer teorías. Las teorías científicas explican los hechos y predicen con alto grado de probabilidad la ocurrencia de hechos similares.

La secuencia del método científico es: observar, plantear problemas, hacer hipótesis, experimentar y formular teorías. Cada uno de los procesos del método científico, tomado aisladamente, forma parte de la actuación cotidiana de todos los seres humanos, pero, en su conjunto, utilizados sistemáticamente, constituyen la más poderosa herramienta que ha diseñado la humanidad para conocer y controlar a la naturaleza.

Observación

El método científico se inicia con la observación. Lo que no puede observarse, directa o indirectamente por medio de instrumentos o de modificaciones de la conducta, no puede ser investigado por la ciencia.

La observación debe ser repetida en forma independiente por observadores diversos. Las observaciones únicas, que no se repiten ni actual ni potencialmente, no pueden ser objeto de estudio científico.

Problema

Después de que una observación se hace y se repite, el segundo tiempo del método científico es plantear un problema; en otras palabras, se hacen preguntas sobre la observación: ¿Cómo es que los hechos ocurren de esta manera? ¿Qué es lo que determina su desarrollo, evolución y término? Es en este punto donde el científico difiere del hombre común; ambos hacen observaciones pero sólo el primero muestra curiosidad científica sobre ellas.

Plantear un problema es hacer preguntas, pero, hacer “buenas preguntas” al igual que hacer “buenas observaciones” es un arte muypreciado. Para que tengan valor científico los problemas deben ser significativos y tener respuestas comprobables por técnicas apropiadas.

Las preguntas que se inician por ¿cómo? o ¿qué? se resuelven mejor, científicamente, que las que comienzan con ¿por qué?, pero los investigadores pueden formular los problemas para que adopten la forma adecuada.

Hipótesis

Una vez planteado un problema adecuado, el científico procede al tercer tiempo del método: formular una explicación o hipótesis. Por supuesto que un problema puede tener varias explicaciones posibles, pero sólo una de ellas es la verdadera. Las respuestas casuales a un problema son generalmente erróneas; pero el científico con su intuición, su experiencia y, a veces por incidentes afortunados, acierta en la hipótesis. Esto se sabe al emplear el cuarto tiempo del método científico.

Experimentación

El objetivo de la experimentación es comprobar la validez de la hipótesis. Si los experimentos demuestran que la hipótesis es errónea, se hace una nueva y se la sujeta a comprobación. El procedimiento puede prolongarse por mucho tiempo al formular nuevas hipótesis y tratar de comprobarlas experimentalmente.

La situación ideal en la experimentación consiste en reducir el problema a dos alternativas posibles que puedan contestarse con claridad, afirmativa o negativamente; pero en muchas ocasiones los resultados del experimento sólo conducen a soluciones parciales.

La experimentación es la parte más ardua del método científico. Cada experimento es un caso en sí mismo; el conocimiento anterior y la experiencia ayudan técnicamente para decidir la forma en que una hipótesis puede ser comprobada experimentalmente. La elección correcta del experimento y su interpretación es lo que separa al genio del aficionado a la investigación.

Teoría

Las pruebas experimentales son la base del quinto peldaño, final del método científico: la formulación de una teoría. Cuando una hipótesis se ha sostenido por pruebas convincentes, obtenidas por muchos laboratorios e investigadores independientes, se propone una teoría que consiste en una afirmación con límites mucho más amplios que los experimentos en que se basa y que expresa la creencia o probabilidad de que sea verdadera en cualquier combinación de sujeto, tiempo y lugar en donde se reúnan condiciones similares.

Desde este punto de vista una buena teoría permite hacer “predicciones.” Las predicciones científicas tienen siempre un soporte experimental muy sólido y aun cuando no afirman que un hecho ocurrirá con certidumbre, sí plantean que tiene una gran probabilidad de ocurrir.

Unas pocas teorías han probado su validez tan universalmente, y expresan tan alto grado de probabilidad, que se las conoce con el nombre de leyes naturales. Por ejemplo, ninguna excepción se conoce al hecho de que una manzana desprendida de su árbol caerá al suelo si no es sostenida de alguna manera. La ley de gravitación se basa en esta observación.

Las leyes naturales orientan la investigación científica. Si en el análisis de un hecho se elimina lo imposible, aquello que es contrario a las leyes naturales, lo que resta, aunque sea muy raro y poco probable, debe ser la verdad. La verdad son los hechos que nos rodean. Aunque acontecen sin cesar a nuestro alrededor, muy pocas personas y muy pocas veces se hace un análisis científico de ellas.

Si se emplean las leyes naturales para marcar lo imposible, con el resto posible se hacen nuevas hipótesis, se comprueban por experimentos, se formulan nuevas teorías y se acumula el conocimiento científico que ha permitido al hombre situarse en un Universo observable que tiene un radio (r) de millares de millones de años luz y que incluye un microcosmos tan pequeño que se expresa en órdenes de magnitud menores de 10^{-20} m y adquirir un dominio incuestionable sobre su ambiente.

SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI)

Los resultados de todos los experimentos en que se basan las teorías científicas y las leyes naturales derivan de las mediciones de objetos o de sus propiedades.

Medir es comparar magnitudes; toda medición comprende un número y una unidad. La unidad identifica la clase de dimensión y el número expresa las veces que la unidad está contenida en el objeto o la propiedad medida. La medición es un arte muy refinado; en la actualidad emplea instrumentos muy complejos y alcanza una precisión extraordinaria.

Un sistema de medidas preciso requiere unidades bien definidas. La Oficina Internacional de Pesas y Medidas revisa periódicamente el sistema para incorporar los adelantos tecnológicos y mejorar la exactitud y precisión de las medidas.

Se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un sistema de unidades universalmente aceptable. El producto de estos esfuerzos es el Sistema Internacional de Unidades (cuya abreviatura es **SI** en todos los idiomas). A partir del creciente intercambio de información científica este sistema ha sido aceptado por toda la comunidad y en especial en medicina. El SI

es esencialmente una versión ampliada del sistema métrico decimal.

El SI comprende tres tipos de unidades: las unidades de base, las unidades derivadas, las unidades suplementarias y una serie de prefijos que permiten tomar múltiplos y submúltiplos decimales de las unidades utilizadas.

Unidades de base

El SI consta de siete unidades básicas que son dimensionalmente independientes. Las unidades básicas están anotadas en el cuadro I.1, junto con los símbolos que hay que utilizar para indicar estas cantidades.

Unidades SI derivadas

Al multiplicar una unidad de base por sí misma o al asociar dos o más unidades de base por una simple multiplicación o división, se puede formar un amplio grupo de unidades llamadas SI derivadas (cuadro I.2). Ejemplo: la unidad derivada de volumen es el metro elevado al cubo, o metro cúbico.

La combinación de unidades de base para formar las unidades derivadas es una de las grandes ventajas del SI. En el SI no es preciso memorizar factores de conversión; el factor a que se recurre para formar las unidades derivadas es 1 (unidad), cualidad que hace al SI coherente.

Cuadro I.1. **Unidades básicas del SI.**

<i>Magnitud</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>
Longitud	metro	m
Masa	kilogramo	kg
Tiempo	segundo	s
Cantidad de sustancia	mol	mol
Temperatura termodinámica	kelvin	K
Intensidad luminosa	candela	cd
Intensidad de corriente eléctrica	ampere	A

Prefijos SI

Cuando las unidades SI derivadas resultan demasiado grandes o demasiado pequeñas para determinados fines (sería desproporcionado, por ejemplo, utilizar el metro cúbico para expresar el volumen de sangre del cuerpo humano), el SI contiene una serie de prefijos que permiten formar múltiplos y submúltiplos decimales de las unidades SI (cuadro I.4).

Los prefijos SI se anteponen directamente al nombre de la unidad, sin signo de puntuación alguno (ejemplo: nanómetro y no nano-metro).

El símbolo del prefijo se antepone también directamente al símbolo de la unidad, sin espacios intermedios ni signos de puntuación (ejemplo: mm, milímetros; nmol, nanomol que equivale 10^{-9} moles).

Cuadro I.2. **Algunas unidades derivadas simples**

<i>Magnitud</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>
Superficie	metro cuadrado	m ²
Volumen	metro cúbico	m ³
Concentración de sustancia	mol/metro cúbico	mol/m ³
Velocidad	metro por segundo	m/s

A cierto número de unidades SI derivadas se les ha dado nombres especiales, en su mayor parte tomados de los hombres de ciencia que han hecho contribuciones notables al conocimiento del tema de estudio correspondiente (cuadro I.3).

Cuadro I.3. Unidades SI derivadas con nombres especiales

<i>Magnitud</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Definición</i>
Fuerza	Newton	Nm.	kgm/s ²
Presión	Pascal	Pa	N/m ²
Trabajo; energía; cantidad de calor	Joule	J	Nm
Carga eléctrica; cantidad de electricidad	Coulomb	C	A.s
Potencia; flujo energético	Watt	W	J/s
Tensión eléctrica; potencial eléctrico	Volt	V	W/A
Temperatura Celsius	Grado Celsius	°C	K-273,16

Cuadro I.4. Prefijos SI.

<i>Factor</i>	<i>Prefijo</i>	<i>Símbolo</i>
10 ¹⁸	exa	E
10 ¹⁵	Peta	P
10 ¹²	Tera	T
10 ⁹	Giga	G
10 ⁶	Mega	M
10 ³	Kilo	k
10 ⁻³	Mili	m
10 ⁻⁶	Micro	μ
10 ⁻⁹	Nano	n
10 ⁻¹²	Pico	p
10 ⁻¹⁵	Femo	F
10 ⁻¹⁸	ato	q

Unidades no pertenecientes al SI

Ciertas unidades ajenas al SI son de uso tan frecuente que en cierto modo forman parte de nuestra vida cotidiana y se acordó utilizarlas juntamente con el SI (cuadro I.5).

Algunas de estas unidades, en especial el litro y las unidades de tiempo, son de gran importancia en las profesiones de la salud. Conviene señalar que el litro es un nombre especial que se da al submúltiplo, decímetro cúbico, de la unidad SI de volumen.

Cuadro I.5. **Algunas unidades no pertenecientes al SI.**

Magnitud	Unidad	Símbolo	Valor en SI
Tiempo	minuto	min	60 s
	hora	H	3 600 s
	Día	D	86 400 s
Volumen	Litro	l o L	10 ⁻³ m ³
Energía	caloría	cal	4.185J

Reglas de escritura de símbolos y cifras.

Los símbolos de las unidades no toman la terminación del plural (ejemplo: dos mililitros se escribe 2 ml, y no 2 mls).

Los símbolos de las unidades jamás van seguidos de un punto, salvo si están al final de una frase (ejemplo: 5 ml y no 5 ml.).

Cuando se escriben cifras, la coma sólo se puede utilizar para indicar los decimales; las cifras deben agruparse en tríos, dispuestos a la derecha y a la izquierda de la coma, y separados entre sí por un pequeño espacio. Ejemplo:

forma correcta: 1 000 000
 0,003 278
 0.003 278

forma incorrecta: 1,000,000
 0.003,278

La multiplicación de las unidades se indica con un punto a nivel o elevado (newton. metro=N.m) o un espacio (N m). La

división se puede indicar mediante una barra oblicua o por exponentes negativos:

$$1/s = s^{-1}$$

mol por metro cúbico puede expresarse por:

$$\text{mol/m}^3 \text{ o } \text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$$

El SI tiene muchas ventajas y algunas desventajas, pero se reconoce la realidad del esfuerzo para implantarlo como una forma de expresar los datos científicos, comprensible para todos. Se recomienda desechar las unidades que no pertenecen al SI a la mayor brevedad posible, pero la realidad del uso de otras unidades en textos y comunicaciones científicas no se puede negar. En este *Manual* las unidades SI se anotarán entre paréntesis cuando se juzgue conveniente.

Algunas recomendaciones para utilizar el SI en bioquímica

PARA EXPRESAR CONCENTRACIONES

La concentración de sustancias cuya masa molecular se conoce se expresa en forma de cantidad de sustancia, es decir, en moles (o en submúltiplos como el milimol o el nanomol) por litro.

Ejemplo:

Ácido úrico en el suero o plasma:

Varones: 0.18 a 0.53 mmol/l.

Mujeres: 0.15 a 0.45 mmol/l.

Colesterol en el suero o plasma: 3.9 a 7.2 mmol/l.

Glucosa en el suero o plasma: 3.6 a 6.1 mmol/l.

Vitamina A en el suero: 0.53 a 2.1 µmol/l.

La concentración en forma de cantidad de sustancia no debe ser denominada “concentración molar” o molaridad, ni utilizar el símbolo M en vez de mol/l (como tampoco mM, nM, etcétera, en vez de mmol/l, nmol/l, etcétera).

La concentración de sustancias cuya masa molecular se desconoce o es dudosa se expresa en kg/l, g/l, mg/l, etcétera. Ejemplo:

Proteína sérica total: 60 a 80 g/l.

Albumina sérica: 33 a 55 g/l.

Globulina sérica: 20 a 36 g/l.

Fibrinógeno en el plasma: 2 a 6 g/l.

Hormona antidiurética en plasma: 2 a 12 pg/ml

Concentración de sustancias en tejidos. Se expresa en unidades de masa (si no se conoce la masa molecular) o en moles (si se conoce la masa molecular) por kilogramo de tejido seco o húmedo. Ejemplo:

g/kg, mg/kg o mol/kg, mmol/kg, etcétera.

No se recomienda expresarla en unidades de volumen, es decir en mg/ml, g/l, etcétera.

Concentración de iones hidrógeno. La concentración de hidrogeniones en los líquidos biológicos se expresa en nmol/l, así como en unidades de pH. El valor del pH se define como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno ($\text{pH} = -\log \text{H}^+$), esta actividad puede determinarse potenciométricamente con la ayuda de un pH-metro.

Actividad enzimática. La unidad SI de actividad catalítica es mol por segundo: mol/s (también llamado katal, símbolo: kat) y corresponde a la cantidad de sustrato transformado por segundo

como resultado de la catálisis. La velocidad medida es proporcional a la cantidad de enzima presente.

La actividad también puede ser expresada en términos de unidades (símbolo: U). Por definición, una unidad es igual a la concentración de enzima necesaria para la formación de un micromol de producto por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$). La actividad específica de una enzima se define como la concentración de producto que se forma por 1 miligramo de enzima por minuto.

MATEMÁTICAS PARA EL LABORATORIO

Notación científica o exponencial

Cuando se expresan cantidades muy grandes o muy pequeñas, como es el caso frecuente en bioquímica, la dificultad de escribir y manipular muchos ceros se evita con el uso de la notación exponencial o científica.

En la notación exponencial todo número puede expresarse como una potencia entera de 10, o como un producto de dos números, uno de los cuales es una potencia entera de 10. Ejemplo: el número de Avogadro seiscientos dos sextillones se escribe:

602 000 000 000 000 000 000 000

y en la notación exponencial como una cantidad decimal multiplicada por 10 elevada a la potencia apropiada = 6.02×10^{23} . Como ejercicio, examine las cantidades siguientes:

$$200 = 2 \times 10 \times 10 = 2 \times 10^2$$

$$205 = 2.05 \times 10^2$$

$$205\,000 = 2.05 \times 10^5$$

$$0.205 = 2.05 \times 10^{-1}$$

$$0.000\,205 = 2.05 \times 10^{-4}$$

$$0.000\ 000\ 1 = 1/10\ 000\ 000 = 1 \times 10^{-7}$$

El exponente de la base 10 para números mayores de la unidad es el número de lugares desde la coma o punto decimal separada de la primera cifra significativa:

$$205 = 2.05 \times 10^2 = 2 \text{ lugares}$$

Para fracciones decimales menores de la unidad se separa la primera cifra distinta de cero después de la coma decimal y se cuentan los lugares hacia la izquierda hasta la coma decimal, incluso la cifra separada y el número es el exponente negativo:

$$0.000\ 205 = 0.000\ "2"05$$

del 2 a la coma decimal son 4 lugares; por lo tanto, es 2.05×10^{-4} .

Las operaciones de multiplicar y dividir, elevar a potencias o extraer raíces se facilitan manipulando los exponentes según reglas muy sencillas. La porción decimal no exponencial se opera en forma ordinaria, lo que reduce el manejo a tres cifras significativas como máximo; los exponentes se suman algebraicamente para multiplicar, se restan para dividir, se multiplican por una potencia deseada para tener el exponente de la misma y para encontrar raíces se divide el exponente entre el índice de la raíz. Ejemplos:

$$6 \times 10^6 \text{ por } 3 \times 10^3 = 18 \times 10^9 = 1.8 \times 10^{10}$$

$$\text{ya que } 6 \times 3 = 18 \text{ y } 10^{6+3} = 10^9$$

$$6 \times 10^6 \text{ entre } 3 \times 10^3 = 2 \times 10^3$$

$$\text{ya que } 6/3 = 2 \text{ y } 10^{6-3} = 10^3$$

Para la adición y la sustracción usando notación científica, primero se escribe cada cantidad con el mismo exponente n . Luego se realiza la operación deseada entre los valores N_1 y N_2 , donde N_1 y N_2 son los números obtenidos con el mismo exponente; estos últimos permanecen iguales. Ejemplo:

$$(5.1 \times 10^2) + (3.4 \times 10^3) = (0.51 \times 10^3) + (3.4 \times 10^3) = 3.91 \times 10^3$$

El método del factor unitario en los Cálculos

El procedimiento que se utilizará para resolver problemas que incluyan conversión de unidades se denomina método del factor unitario. Esta técnica se basa en las propiedades del número 1, es decir:

- Cualquier número al ser multiplicado por uno, sigue siendo el mismo número ($1 \times 5 = 5$).
- El número 1 puede ser escrito como el cociente de cualquier número dividido por si mismo ($3/3$ ó $6/6$).
- Se puede tomar cualquier ecuación y dividirla por uno de los miembros para obtener una razón igual al número 1.

Por ejemplo, dada la ecuación:

0 minuto = 60 segundos, obtener la razón igual al número 1.

$$\frac{1 \text{ minuto}}{1 \text{ minuto}} = \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}}$$

$$1 = \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}} \text{ ó } 1 = \frac{1 \text{ minuto}}{60 \text{ segundos}}$$

$$1 = \frac{60 \text{ segundos}}{1 \text{ minuto}} \text{ ó } 1 = \frac{1 \text{ minuto}}{60 \text{ segundos}}$$

Estas razones o factores que son equivalentes al número 1 se conocen como factores unitarios, factores de conversión o coeficientes de conversión.

El recíproco de cualquier factor unitario es también un factor unitario.

En ambos casos el numerador y el denominador describen la misma cantidad, por lo que se puede efectuar conversiones entre diferentes unidades que miden la misma cantidad.

El método del factor unitario consiste en:

1. Tomar una relación entre unidades y expresarla en forma de una ecuación,
2. Luego expresar la relación en forma de una fracción (llamada factor de conversión) y, por último;
3. Multiplicar la cantidad dada por ese factor. En esta multiplicación, las unidades idénticas se multiplican o cancelan como si fueran números.

Ejemplo: ¿Cuántos μl hay en 0.00005 L ($5 \times 10^{-5} \text{ L}$)?

$$1) 1 \mu\text{l} = 10^{-6} \text{ L} \text{ ó } 1 \text{ L} = 10^6 \mu\text{l}$$

$$2) \frac{10^6 \mu\text{l}}{1 \text{ L}}$$

$$3) 5 \times 10^{-5} \text{ L} \times \frac{10^6 \mu\text{l}}{1 \text{ L}} = 5 \times 10^{[-5+6]} = 5 \times 10^1 \mu\text{l} = 50 \mu\text{l}.$$

En este método las unidades se acarrearán en todo el proceso del cálculo, por lo tanto si la ecuación se establece en

forma correcta, todas las unidades se cancelan excepto la deseada.

Logaritmos

El logaritmo de un número es el exponente o potencia de una base determinada que se requiere para obtener el número. Si el número "a" elevado a la potencia "n" (a^n) es igual al número "N", entonces "n" es el logaritmo de base "a" del número "N." Es decir:

$$\text{si } a^n = N \text{ entonces } n = \log_a \text{ de } N$$

La base "a" puede ser cualquier número; en la práctica médica se usa como base el número 10 y los logaritmos resultantes se conocen como logaritmos "comunes" o de Briggs. Su símbolo es: \log o \log_{10} .

Los logaritmos son indispensables para manejar los datos bioquímicos; constan de dos partes que se separan por una coma o punto decimal; a la izquierda, la característica corresponde al orden de magnitud y puede ser positiva o negativa según sea la cantidad mayor o menor de la unidad. El exponente de la base 10 para números mayores de la unidad es siempre positivo. Cuando es negativo se indica con el signo menos arriba del número que la representa:

$$0.001 = 10^{-3} \text{ característica } 3$$

$$1\ 000 = 10^{-3} \text{ característica } 3$$

A la derecha, la mantisa es la fracción decimal de exponente que corresponde a los dígitos que ocupan el orden de

magnitud; se obtiene de tablas o de calculadoras electrónicas y siempre tiene valor positivo:

$$\log^2 = 0,3010 \text{ esto es } 10^{0.3010} = 2$$

Cuando la característica y la mantisa son de diferente signo (+ o -) se opera con el cologaritmo que se obtiene por la suma algebraica de la mantisa positiva con la característica negativa es un número todo negativo, ver el siguiente ejemplo:

$$\text{Log } 0.002 = 3.3010 = -2.6990$$

$$\begin{array}{r} 3.000 \\ +0.3010 \\ \hline -2.6990 \text{ cologaritmo} \end{array}$$

La característica indica la posición del punto decimal en la cifra representada por la mantisa y se determina por inspección del número.

Para un número mayor que 1, la característica es uno menos que el número de cifras antes del punto decimal; así: la característica de 100 es 2 porque el número cien tiene 3 dígitos a la izquierda del punto decimal. Para un número menor que 1, la característica es numéricamente uno más que el número de ceros que siguen al punto decimal; así: la característica de 0.000 000 1 es 7 con signo negativo.

Para encontrar el logaritmo de un número, por ejemplo: 0.000 809, se busca en la tabla las dos primeras cifras distintas de cero de izquierda a derecha (80) en la primera columna vertical de las tablas se sigue la horizontal correspondiente hasta la columna 9, que es el otro número, en donde se lee 9 079, que

es la mantisa requerida. La mantisa para 809, 8.09, 0.0809, etcétera; es la misma (9 079), pero difiere la característica. Así:

$$\text{Log } 0.000\ 809 = 4.9079 = -3.0921$$

Si el número del cual se requiere el logaritmo tiene cuatro cifras, la cuarta se busca en la misma columna horizontal en la parte de la tabla que dice “partes proporcionales” y debe agregarse a la mantisa como diez milésimos.

Por ejemplo, para el número 8 091:

Mantisa para 809 = 9 079
parte proporcional para 1 = 1

$$\begin{array}{r} 0.9079 \\ + 0.0001 \\ \hline 0.9080; \log 8091 = 3.9080 \end{array}$$

El antilogaritmo es el número que corresponde a un logaritmo dado. Para encontrarlo se busca la mantisa en la tabla de antilogaritmos, se determina el número a que corresponde y se fija la posición del punto decimal según la característica. Por ejemplo el antilogaritmo de 1.6747 es 47.29: la característica es 1 (hay dos dígitos a la izquierda del punto decimal) y la mantisa es 0.6747, que se buscaría en la tabla de logaritmos donde se hallaría que corresponde a 4 729.

Los estudiantes deben familiarizarse con el uso de logaritmos en las operaciones comunes.

El logaritmo del producto de dos números es igual a la suma de sus logaritmos:

$$\log a \times b = \log a + \log b$$

El logaritmo del cociente de dos números es igual al logaritmo del dividendo menos el logaritmo del divisor:

$$\log a/b = \log a - \log b$$

El logaritmo de la potencia "n" de un número es igual a "n" veces el logaritmo del número:

$$\log a^3 = 3 \times \log a$$

Gráficas

"Una figura equivale a mil datos en una tabla numérica" y así como se construye un modelo para visualizar un conjunto complejo de hechos, se utiliza una gráfica para presentar los datos experimentales en tal forma que fácilmente se asimilen y aprecien sus relaciones cuantitativas.

Se llama gráfica a la representación esquemática de las variaciones que sufren las distintas magnitudes que intervienen en los fenómenos físicos, químicos, biológicos, sociales o de cualquier otra índole. Tiene por objeto mostrar rápida e intuitivamente la relación que guardan las magnitudes comparadas.

Entre las diferentes clases de gráficas que existen las más importantes son:

Gráfica poligonal. Consiste en expresar las variaciones de un fenómeno continuo por medio de puntos y de representar la marcha de dicho fenómeno por medio de una línea que une esos puntos.

Para elaborar una gráfica poligonal se trazan en un papel, de preferencia milimétrico, dos rectas perpendiculares entre sí que se corten en cero. En cada una de ellas se representará una de las magnitudes que se van a relacionar. El punto cero (0) se llama origen y las rectas son los ejes; OX es el eje X y OY es el eje Y. Para referirse al eje X generalmente se dice: eje horizontal o eje de las abscisas (variable independiente) y para el eje Y: eje vertical o eje de las ordenadas (variable dependiente).

Los ejes dividen su propio plano en cuatro regiones llamadas cuadrantes que se numeran I, II, III y IV. En el laboratorio utilizamos habitualmente sólo el primer cuadrante (figura I.1).

Las distancias a la derecha de 0, a lo largo del eje X, se consideran como positivas y las de la izquierda como negativas. Similarmente, hacia arriba de 0, a lo largo del eje Y, se miden las distancias positivas y hacia abajo de 0 las negativas.

Después se trazan los puntos cuyas distancias a uno de los ejes sean proporcionales a la magnitud que se va a representar y, finalmente, al unir estos puntos por medio de segmentos de recta, se tiene la gráfica poligonal.

Nota: por lo general, es mejor que la curva llene una parte considerable de la página. Muy bien puede usarse la misma unidad de medida sobre los dos ejes, pero a menudo los valores tienen un campo de variabilidad muy amplio, lo cual hace necesario usar diferente escala para cada uno de los ejes.

Diagrama en barras. Cuando se quieren expresar simples comparaciones de medidas entre sí o para representar un fenómeno discontinuo se emplean las barras, que pueden ser horizontales o verticales.

Barras verticales. Las magnitudes se representan por medio de rectángulos, barras de base igual que descansan en el eje de las abscisas y cuya altura es proporcional a la intensidad del fenómeno y se mide en el eje de las ordenadas.

Barras horizontales. Las barras descansan sus bases en el eje de las ordenadas y el fenómeno se mide en el eje de las abscisas.

Gráfica de sectores circulares. Para hacer una gráfica de este tipo hay que tener en cuenta que el círculo debe tener el total de las magnitudes que se van a representar.

Los sectores circulares son proporcionales a las magnitudes que representan; magnitud que se mide en grados de circunferencia. Para determinar el número de grados que deben tener dichas partes se plantearán una serie de reglas de tres para cada una de ellas en las cuales se consideran: como 100% a la suma total de las magnitudes que se quieren graficar,

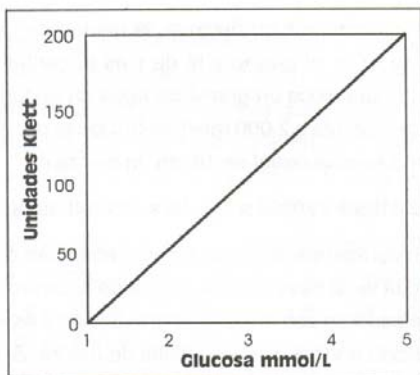


Fig. I.1. Curva patrón de glucosa.

para obtener en cada caso el porcentaje correspondiente; una vez obtenido éste, se pasará a grados, considerando 360° como 100% y procediendo entonces a hacer la gráfica.

ALGUNOS MÉTODOS UTILIZADOS EN BIOQUÍMICA

Centrifugación

Un método muy útil en el laboratorio para separar sustancias de diferente densidad suspendidas en un líquido es la centrifugación; en ella, la acción de la fuerza centrífuga (fuerza necesaria para desplazar hacia afuera un determinado peso en dirección radial) da como resultado que las partículas más pesadas se sedimenten más rápido que las partículas ligeras.

La fuerza centrífuga depende de la cantidad de materia (m) que se desplaza hacia afuera cuando está rotando a una velocidad por minuto de (n) veces a una distancia radial (r) y se expresa por la fórmula:

$$f \text{ (en dinas)} = 0.01096 n^2 m r$$

En el sistema métrico decimal, la unidad de f es la dina, la de m es el gramo y la de r es el centímetro. Ejemplo: si se coloca un gramo de agua en un tubo de centrifuga y se rota a 2 000 rpm (revoluciones por minuto) a una distancia radial de 16 cm, la fuerza es:

$$f = 0.01096 \times 2000^2 \times 1 \times 16 = 701\,440 \text{ dinas}$$

Si transformamos las dinas a peso, entonces el gramo de agua tiene peso porque es atraído al centro de la Tierra de acuerdo

con la ley de la gravitación y es atraído en estado normal, con 980 dinas de fuerza. Si usamos, por lo tanto, peso en vez de dinas como la unidad de nuestro problema tendremos:

$$f = 0.01096 \times n^2mr = 717 \text{ g}$$

980

o sea, interpretando la fórmula, la fuerza de contención para sostener la unidad masa (el gramo) e impedir que se vaya del centro de rotación es la fuerza que la gravedad ejercía sobre 716 g o, dicho de otra manera, el gramo a esa velocidad pesa en el fondo del tubo de la centrifuga 716 gramos comparado con el tubo en reposo o 716 veces la fuerza de la gravedad (g).

La centrifugación y ultracentrifugación son operaciones que se basan en el principio anterior y que permiten separar los componentes de una mezcla.

Las centrifugas ordinarias operan a rotaciones menores de 10 000 revoluciones por minuto (rpm). Las condiciones que limitan esta velocidad son la resistencia de la parte de la centrifuga que sostiene el rotor (brazo), la fricción con el aire y el calentamiento.

Las ultracentrifugas operan en cámaras refrigeradas, evacuadas de aire, y el rotor no gira sostenido por un "brazo" sino impulsado por chorros de aceite o aire comprimido que se aplica a una porción externa del rotor sostenido por una pared muy gruesa de una cámara cilíndrica de rotación. Se alcanzan velocidades de 20 000 a 70 000 rpm.

La sedimentación en la ultracentrifuga se expresa en unidades Svedberg (símbolo: S) y se aplica a la comparación práctica de tamaños moleculares que no sólo dependen de la masa de las moléculas implicadas sino también de su forma. Es

importante considerar que los valores de Svedberg no son aditivos, es decir, dos partículas 5S no crean una partícula 10S. Sin embargo, hay una correspondencia tosca que para las proteínas esféricas es de:

2 S = 10 kdal
4 S = 50 kdal
8 S = 160 kdal
16 S = 400 kdal

La unidad Svedberg es igual a 10^{-13} segundos; no pertenece al SI y puede suplirse por 0,1 piconsegundo (ps) o 100 femtosegundo (fs). En las moléculas menos densas que el medio de suspensión, como las lipoproteínas, el desplazamiento es hacia la superficie y se expresa en Svedberg de flotación (Sf) y permite la clasificación en: LDL, HDL y VHDL (*low density*, *high density* y *very high density*) con Sf de 0 a 10, 10 a 400 y las muy densas que no flotan y tienen una densidad mayor de 1.

El peligro del mal uso de la centrifuga deriva de la enorme fuerza que alcanza en el radio de rotación y el "peso" de las sustancias colocadas en el campo gravitacional del aparato.

Se debe tener cuidado con los siguientes puntos:

1. Los tubos en las centrifugas deberán colocarse por pares para que no haya diferencia de peso en un lado de la centrifuga. Enfrente de un tubo de un peso determinado debe estar otro, en la misma posición, con el mismo peso. El descuido de esta regla implica un desnivel que, a las velocidades y fuerzas señaladas, puede romper los tubos y dañar el aparato. Para balancear por pares los tubos lo mejor es usar una balanza de dos brazos y ajustar el peso hasta que sea idéntico.

2. Para no forzar el motor arránquese gradualmente la centrífuga hasta alcanzar la velocidad requerida.
3. Nunca se frene una centrífuga; déjese parar por su propia inercia; el no hacer esto conduce a que se agite el contenido de los tubos y se eche a perder el trabajo.
4. No alzar las tapas de la centrífuga cuando está en movimiento.
5. Ante cualquier dificultad o duda consulte al profesor.

Potenciometría

Muchas de las reacciones que se realizan en las células son reacciones de oxidación y de reducción, es decir, en las que se transfieren electrones.

La electroquímica estudia las reacciones químicas en las que hay transferencia de uno o más electrones.

La oxidación es la pérdida o liberación de electrones y la molécula que los cede se denomina agente reductor.

La reducción es la ganancia de electrones y la molécula que los acepta se denomina agente oxidante.

Cuando se oxida un agente reductor, se transforma en su forma oxidada y como la reacción es reversible las formas oxidada y reducida del compuesto constituyen un par conjugado llamado par redox o par de oxidorreducción.

El proceso de oxidación siempre va acompañado del proceso de reducción ya que los electrones que cede una molécula reductora son aceptados por una molécula oxidante, lo cual constituye las reacciones de oxidorreducción o reacciones redox.

La determinación cuantitativa de la concentración de las moléculas oxidantes y reductoras en una solución es el objeto de

estudio de la potenciometría. En esta técnica se determina el potencial eléctrico generado por la transferencia de electrones en una reacción redox en la cual estén involucradas las moléculas a estudiar. Este potencial se mide en una celda electroquímica. La celda más común es la de Daniell (Fig. 1.2), en la que en dos compartimientos separados que contienen $ZnSO_4$ y $CuSO_4$ se colocan cinc y cobre metálico, respectivamente; las dos soluciones se conectan por un puente salino (un tubo que contiene agar embebido en una solución de un electrolito como el KCl). Cuando los dos electrolitos se conectan por un alambre metálico, ocurre un flujo de electrones del electrodo de cinc al electrodo de cobre, el cual puede ser medido por medio de un voltímetro. Cuando el cinc cede los electrones se convierte en ion soluble, mientras que el cobre disuelto, al aceptar los electrones, se convierte en cobre metálico que se deposita en el electrodo. El puente salino cierra el circuito eléctrico entre las dos soluciones.

El hecho de que fluya una corriente eléctrica del polo positivo (ánodo, que en este caso es el electrodo de cinc) al polo negativo (cátodo, que en este caso es el electrodo de cobre), significa que hay una diferencia de potencial entre los electrodos denominada fuerza electromotriz (fem) de la celda. Dado que el potencial de un electrodo está relacionado con la magnitud de cargas positivas existentes, la diferencia de potencial compara las cargas relativas existentes en dos puntos. Se denomina potencial de electrodo (E) a la diferencia de potencial respecto a un electrodo de referencia arbitrario y depende de la concentración de las moléculas en la solución y de la temperatura.

En general, el potencial de los electrodos se mide con referencia al electrodo de hidrógeno al que se le ha asignado.

En general, el potencial de los electrodos se mide con referencia al electrodo de hidrógeno al que se le ha asignado arbitrariamente un potencial de cero a 25° C a una concentración de 1 mmol/L y una presión del gas de una atmósfera. Sin embargo, en la práctica es inconveniente porque se trata de un electrodo gaseoso.

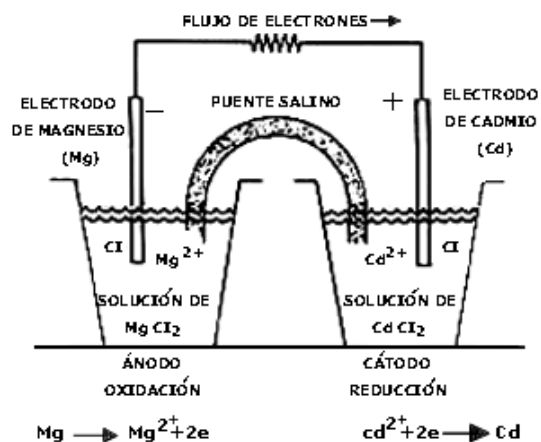


Fig. 1.2 Celda de Daniell

Es por ello, que se usan otros electrodos de referencia, como el de calomel, en el cual el sistema de medición es mercurio y cloruro mercurioso. En el caso de este electrodo, como sucede con todos los pares redox, debe calibrarse con respecto al electrodo de hidrógeno.

Los pares redox de interés para el bioquímico incluyen a menudo al ion hidrógeno como reactivo o como producto, por lo que tales sistemas están en función del pH del medio.

Hay diferentes tipos de electrodos: los metálicos (como los de la celda de Daniell), los metálicos-sal insoluble (como el de plata/cloruro de plata), los gaseosos (como el de hidrógeno, que

se adsorbe sobre platino), los electrodos selectivos de iones (que pueden ser para aniones o para cationes) y los de vidrio (que son electrodos selectivos de iones, especiales para determinar H⁺). Estos últimos son los más utilizados ya que una de las aplicaciones prácticas más importantes de la potenciometría es la determinación del pH.

Dentro del electrodo de vidrio hay un alambre de plata con un extremo sumergido en una solución de HCl 0.1M. El bulbo de la parte inferior es de un vidrio especial, permeable a los iones H⁺. La superficie interior de esta membrana de vidrio está en contacto con la solución de HCl y la exterior con la solución cuyo pH se quiere determinar. En las dos superficies la membrana de vidrio absorbe agua y forma una capa de gel a través de la cual difunden los iones hidrógeno y desplazan a otros iones de la estructura del vidrio (como sodio) y esto provoca el establecimiento de un potencial. En una solución amortiguadora que contenga Cl⁻ se sumerge un electrodo de Ag/AgCl. Cuando el electrodo se coloca en una solución cuyo pH es diferente al de la solución amortiguadora, aparece una diferencia de potencial entre los dos extremos, lo cual es una medida de la diferencia de los dos valores de pH.

La determinación más precisa del pH se realiza en un pH-metro que consiste, fundamentalmente, en un potenciómetro diseñado para emplearse con un sistema de electrodo de vidrio. Como una unidad de pH corresponde a 59 milivoltios a 25° C, el mismo medidor se puede usar con dos escalas para hacer lecturas en mv o en pH. El electrodo de vidrio consiste en una membrana de vidrio situada al final de un tubo de vidrio o plástico de paredes más gruesas. En el tubo se encuentra ácido clorhídrico diluido saturado de cloruro de plata y un hilo de plata

que conecta a la terminal del voltímetro con un electrodo de referencia. El pH se determina midiendo la diferencia de potencial a través de la membrana de vidrio que separa la solución a la cual se quiere determinar el pH, de la solución de referencia cuya concentración de hidrogeniones se conoce.

El esquema del circuito de un potenciómetro típico se encuentra en la figura 1.3. La sensibilidad del medidor se puede ajustar para cambios de acuerdo a la temperatura (botón de control de temperatura). Con el botón de calibración a cero se introduce un voltaje lateral en el circuito que permite que la lectura corresponda al pH de la solución reguladora tipo. Los medidores de pH se construyen de tal manera que el cero de la escala del potenciómetro corresponda a un pH de 7. El medidor se calibra antes de usarlo, primero

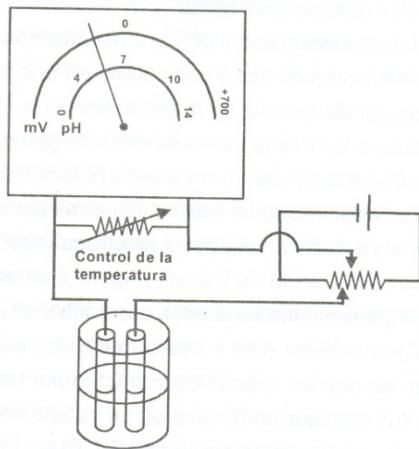


Fig. 1.3. Esquema de un potenciómetro.

con una solución reguladora de pH 7, ajustando el cero para que dé la lectura exacta; se lava el electrodo con agua destilada o

desionizada y se calibra con una segunda solución reguladora de pH 4 ó 10; se ajusta nuevamente el medidor, ahora con el control de temperatura, para que dé la lectura exacta; luego se determina el pH de la solución problema.

Electroforesis

Una partícula coloidal o un ion provistos de carga eléctrica emigran hacia el ánodo o el cátodo bajo la influencia de un campo eléctrico externo. Si las partículas de una mezcla tienen diferentes velocidades de desplazamiento, puede aprovecharse esta propiedad para separarlas. El empleo de fuerzas eléctricas para lograr esta separación se llama electroforesis y depende fundamentalmente de la carga y no de la masa molar de las partículas cargadas. Esta técnica se ha empleado en la separación de proteínas, péptidos, nucleótidos, ácidos orgánicos y porfirinas, entre otros compuestos. Es importante considerar que en el caso de una proteína su carga depende del pH del medio, por lo que es posible emplear la técnica para determinar el punto isoeléctrico de la misma.

Si se aplica un campo eléctrico a través de una solución, la fuerza que actúa sobre las moléculas cargadas de soluto depende de la carga eléctrica (e); del número de cargas en la molécula (z), y de la fuerza del campo eléctrico (E). Inmediatamente después de poner a funcionar el campo, las partículas cargadas se aceleran hasta que alcanzan un equilibrio, o sea, cuando la carga electrostática queda equilibrada por la fuerza de fricción que ejerce el medio disolvente; entonces, se mueven a una velocidad constante. La velocidad por unidad de campo eléctrico se denomina movilidad electroforética. Dado que la fricción depende del tamaño de la partícula y de la viscosidad

del medio en que se mueve, la facilidad con la que se mueve una partícula cargada depende directamente de su carga e inversamente de su tamaño y de la viscosidad del medio.

Existen dos tipos de electroforesis: la *frontal* y la *zonal*.

Electroforesis frontal o en medio líquido. Es el método clásico de Tiselius en el que la separación de los componentes de una mezcla se realiza en varios frentes o límites que se traslapan a lo largo del procedimiento. El movimiento de los frentes se realiza en un canal vertical y la densidad de la solución por debajo del frente debe ser mayor que la de arriba, ya que en caso contrario el sistema de frentes se destruiría. En el método, la solución a separar se coloca encima del medio amortiguador conductor. La técnica es difícil y costosa, aunque puede presentar la ventaja de que se evitan las interacciones de los solutos con cualquier superficie y se eliminan así los efectos adsorbentes y desnaturalizantes. Además, puede operarse en medios acuosos, a baja temperatura y bajo condiciones favorables de pH y fuerza iónica.

Electroforesis zonal. Uno de los problemas que presenta la técnica anterior es la necesidad de estabilizar las zonas de soluto contra la convección gravitacional y la difusión. Esto originó el empleo de otra técnica de electroforesis: la electroforesis zonal. En ella, el empleo de gradientes de densidad, sólidos porosos o fibrosos y geles permite resolver el problema de la difusión y de la convección gravitacional.

En este tipo de electroforesis la mezcla de solutos a separar se aplica como una mancha o una banda delgada en un punto del canal electroforético. Los solutos migran con distintas velocidades (de acuerdo a su movilidad) y se separan en zonas discretas. La distancia de migración es directamente proporcional

al voltaje aplicado y al tiempo. Los solutos migran a través del solvente que baña un soporte sólido. Este soporte puede ser de diversa naturaleza y cada uno presenta algunas ventajas y desventajas en su uso. Los soportes más comunes son papel, acetato de celulosa, almidón, agar, agarosa y poliacrilamida. Dado que en el caso de los geles es posible un manejo del tamaño del tamizado para lograr una máxima eficiencia en la separación, este método es el más usado en bioquímica.

En la técnica hay que cuidar algunos aspectos que pueden afectar la separación como: la selección adecuada del soporte, del amortiguador, vigilar la temperatura de la cámara, la intensidad del campo eléctrico, el tiempo, etcétera.

Electroforesis en papel y en acetato de celulosa. La electroforesis en papel fue el primer método de separación en zonas en un campo eléctrico. Es una técnica sencilla y rápida, que requiere pequeñas cantidades de muestra y que es especialmente útil en las electroforesis de alto voltaje para separar moléculas de bajo peso molecular como aminoácidos, péptidos, oligonucleótidos y otros compuestos orgánicos con grupos cargados. Ha sido muy utilizada en el mapeo bidimensional de proteínas (huella génica), para identificar diferencias entre proteínas similares, probar que una proteína es producto de otra de mayor tamaño, etcétera.

Dado que el papel tiene una alta actividad endosmótica*, lo que causa algunos problemas en la electroforesis, ha sido sustituido por el acetato de celulosa, que tiene una estructura microporosa uniforme, actividad endosmótica baja y en el que la adsorción de las proteínas ha sido eliminada.

En los aparatos en que se realizan estas técnicas el soporte se humedece al sumergirlo en el amortiguador y colocarlo

de tal manera que se establezca el contacto con las soluciones en que están los electrodos. Los aparatos se tapan para evitar la evaporación y para mantener una atmósfera húmeda dentro del aparato.

Electroforesis en geles de agar y agarosa. El agar es una mezcla de polisacáridos que se obtiene de ciertas especies de algas marinas. Está constituido de dos componentes principales: uno lineal o agarosa y uno ramificado y muy ácido llamado agar o pectina. El agar y la agarosa son solubles en soluciones acuosas a 100°C y solidifican a temperatura ambiente; forman geles de buena firmeza cuando se usan a una concentración de 0.5 a 2%. Su estructura se mantiene por numerosos puentes de hidrógeno entre cadenas adyacentes de polisacáridos. El gel de agarosa ofrece ciertas ventajas sobre otros soportes; posee una porosidad elevada y uniforme, lo que favorece la migración regular de las sustancias cargadas, lo cual se traduce en una mayor resolución.

Para realizar la electroforesis en estos medios se prepara el gel sobre una superficie de vidrio. Una vez solidificado el gel, se hacen pocillos en él para aplicar en ellos la muestra. Se lleva a cabo, o se "corre", la electroforesis y, al final, se fija la preparación, se tiñe y se seca. La técnica se ha usado en combinación con la inmunodifusión en el análisis inmunológico de proteínas y en la cuantificación de proteínas inmunoprecipitables.

La electroforesis en agarosa ha permitido el estudio de las moléculas del DNA, cuyo tamaño impide que puedan penetrar en los geles de poliacrilamida, pero que penetran fácilmente en geles de agarosa a 0.2%, si tienen un peso hasta de 150×10^6 , o a 0.8% si pesan hasta 50×10^6 .

Es posible separar moléculas de DNA que difieren sólo 1% de peso molecular según sea la concentración de la agarosa.

Para detectar las bandas, se sumerge el gel en una solución de bromuro de etidio el cual se pega al DNA y fluoresce cuando se excita con luz ultravioleta. El peso molecular se determina por la distancia de migración. También se han usado estos geles de agarosa para la obtención de mapas de restricción, los que permiten ver diferencias entre dos moléculas de DNA, localizar mutaciones, detectar recombinaciones de fagos, aislar fragmentos de DNA deseados, distinguir entre el DNA lineal, circular o superenrollado.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida son geles totalmente sintéticos que han sustituido a los geles de almidón en el estudio rutinario de proteínas por métodos electroforéticos. Esto ha sido posible gracias a la gran facilidad con que puede variarse según el contenido total del monómero y su grado de entrecruzamiento. Dada su capacidad de filtrador molecular, se ha empleado para separar compuestos con base en su peso molecular para lo que se usa lauril sulfato de sodio (SDS) con el objeto de evitar las diferencias individuales en las cargas de las proteínas.

Los amortiguadores que se usan pueden ser continuos (en los que se utiliza el mismo amortiguador en los tanques de los electrodos y los sistemas electroforéticos) y discontinuos, en los que hay dos tipos de geles: el de separación, o de poro cerrado, en el cual se resuelven los componentes de una mezcla (aquí es importante el uso del amortiguador adecuado) y el gel concentrador, o de poro abierto, que sirve para concentrar la muestra. A los geles se les puede incorporar sustancias disociantes como la urea y el SDS sin que sean afectados. También pueden emplearse agentes reductores como el 2

mercaptoetanol o ditioneitol para romper los puentes disulfuro de las proteínas.

Las dos aplicaciones principales de la electroforesis discontinua son la determinación de la pureza de proteínas y el análisis de los componentes de una mezcla. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS también se ha empleado en la determinación de los pesos moleculares de proteínas.

Electroenfoque. Si se coloca una proteína en un gradiente de pH sujeto a un campo eléctrico, se moverá hasta alcanzar su punto isoeléctrico, donde permanecerá sin moverse. Esta técnica es lo que se conoce como electroenfoque. Para formar un gradiente estable y continuo de pH se usan anfolitos sintéticos de una gran variedad de pesos moleculares y rangos de pH. Cuando se establece el campo eléctrico, los anfolitos migran y generan el gradiente de pH según sus propios puntos isoeléctricos. Esta técnica ha sido utilizada en combinación con la separación por pesos moleculares en la electroforesis bidimensional como método de análisis de proteínas.

*Nota: Cuando se aplica un potencial eléctrico a un líquido contenido en un soporte no conductor el líquido se moverá hacia uno u otro electrodo, en favor o en contra del movimiento electroforético, alterando la movilidad electroforética de las partículas cargadas. Este fenómeno se conoce como endosmosis. Si el soporte está cargado, induce la orientación de las cargas con signo opuesto en el líquido, lo que ocasionará al aplicar la corriente eléctrica que ocurra un flujo del líquido dentro del canal electroforético. Este fenómeno es lo que se conoce como actividad endosmótica y puede causar problemas en las separaciones electroforéticas.

SOLUCIONES

Una solución es una mezcla homogénea de por lo menos dos componentes: una fase dispersa, que es el *soluto* (sustancia que se disuelve), y una dispersora que constituye el *solvente* o disolvente (la sustancia que disuelve al soluto) y que, generalmente, se encuentra en mayor proporción. Las soluciones más utilizadas en bioquímica son las que tienen agua como solvente.

La solubilidad de un soluto en un solvente depende de la naturaleza de éstos, de la temperatura y, en el caso de un gas, de la presión. La solubilidad generalmente está dada en gramos de soluto por 100 g de solvente.

Se llaman *soluciones diluidas* las que contienen una proporción relativamente pequeña de soluto; se llaman *soluciones concentradas* las que contienen una gran cantidad de soluto. Sólo son posibles soluciones concentradas cuando el soluto es muy soluble.

Una *solución saturada* contiene la cantidad de soluto disuelto necesaria para la existencia de un equilibrio entre las moléculas disueltas y las moléculas en exceso que no están disueltas. Esta solución se forma por medio de una vigorosa agitación con exceso de soluto. Existe una *solución sobresaturada* cuando en la solución hay presente más soluto que en una solución saturada. Para prepararla se forma una solución saturada a temperatura elevada y se enfría cuidadosamente para evitar la cristalización. Las soluciones sobresaturadas son inestables y con facilidad se convierten en soluciones saturadas.

Las mencionadas soluciones son poco precisas y no indican, de manera cuantitativa, el soluto ni el solvente; los

métodos cuantitativos más comunes, que sirven para expresar la concentración (la medida numérica de la cantidad relativa de soluto en la solución) de las soluciones, son las porcentuales, las molares y las normales.

Soluciones porcentuales

En las soluciones porcentuales no se toma en cuenta el peso fórmula del soluto. En este tipo de soluciones se debe especificar si la relación es peso a peso (p/p), peso a volumen (p/v) o volumen a volumen (v/v). Ejemplos:

Solución porcentual p/p. Solución al 10% de NaCl contiene 10 g de la sal por 100 g de solución. El peso/peso porcentual expresa el número de gramos del soluto en 100 gramos de la solución final.

$$\%p/p = \frac{\text{g de soluto}}{100 \text{ g de solución}} \times 100$$

Solución porcentual p/v. Solución de NaCl a 10% p/v: 10 g de NaCl en 100 ml de solución. Esto expresa el número de gramos de soluto en 100 ml de la solución final. En bioquímica, si no se especifica otra situación, las soluciones porcentuales deben entenderse como p/v.

$$\%p/p = \frac{\text{g de soluto}}{100 \text{ ml de solución}} \times 100$$

Solución porcentual v/v. Se utiliza cuando el soluto y el solvente son líquidos. El v/v indica el número de volúmenes de soluto por 100 volúmenes de solución. Solución de etanol a 30%

v/v: 30 ml de éste en 100 ml de solución. Esto quiere decir que por cada 100 ml de solución, 30 ml corresponden al soluto y el resto, hasta completar 100 ml, al agua destilada o al solvente empleado.

$$\%v/v = \frac{\text{volumen de soluto}}{100 \text{ volúmenes de solución}} \times 100$$

Es importante insistir que los términos porcentuales expresan siempre una relación, es decir, podemos variar los volúmenes siempre y cuando no perdamos dicha relación. Por ejemplo, si nos pidieran preparar 50 ml de una solución de alcohol etílico a 20%, seguiríamos el siguiente planteamiento:

100 ml de sol. tienen 20 ml de alcohol puro
50 ml de sol. tienen x ml de alcohol puro

$$X = \frac{20 \times 50}{100} \times 10$$

Resultado: necesitamos 10 ml de alcohol puro y completar un volumen de 50 ml.

El alcohol etílico común es de 96% de pureza (v/v). Por lo tanto, si no contamos con alcohol puro y quisiéramos preparar una solución de alcohol a 20%, seguiríamos el siguiente planteamiento:

100 ml de sol. tienen 96 ml de alcohol puro
X ml de sol. tienen 20 ml de alcohol puro

$$X = \frac{20 \times 100}{96} = \text{ml de solución}$$

Resultado: necesitamos 20.83 ml de solución de alcohol a 96% y completar un volumen de 100 ml.

Si tan sólo queremos 50 ml de esta nueva solución, entonces:

100 ml de sol. de alcohol a 20% tienen 20.83 ml de alcohol a 96%

50 ml de sol. de alcohol a 20% tienen X ml de alcohol a 96%

$$X = \frac{50 \times 20.83}{100} = 10.41 \text{ ml}$$

Resultado: necesitamos 10.41 ml de alcohol de 96% y completar con agua destilada hasta un volumen final de 50 ml.

Soluciones molares

Una solución molar se define como el número de moles de soluto en un litro de solución:

$$M = \frac{\text{No. de moles}}{\text{litro de solución}}$$

donde un mol es igual al peso atómico o molecular expresado en gramos (átomo gramo o molécula gramo). Un mol contiene el número de Avogadro (6.023×10^{23}) de partículas, átomos o moléculas.

Si un mol de una sustancia se disuelve en agua hasta un volumen de un litro, se obtiene una solución 1 molar (1M).

Por ejemplo, si quisiéramos preparar una solución 1 molar de NaCl, tendríamos que considerar, primero, su peso

molecular (Na: 23 + Cl: 35.5 = 58.5) y este valor en gramos disolverlo en agua, hasta completar un litro.

Ahora bien, si nos piden preparar 400 ml de una solución 0.5 M de NaCl: ¿cuántos gramos de NaCl deben pesarse?

1. Sabemos que un mol de NaCl es de 58.5 g.

2. Haremos el siguiente planteamiento:

Una sol. 1M tiene 58.5g de NaCl.

Una sol. 0.5M tiene X g de NaCl.

$$X = \frac{0.5 \times 58.5}{100} = 29.25 \text{ g de NaCl}$$

3. De acuerdo con la definición de solución molar, los 29.25 g de NaCl los consideramos en un litro de solución, pero como nos piden preparar 400 ml haremos el siguiente planteamiento:

En 1000 ml de sol. hay: 29.25g de NaCl

En 400 ml de sol. hay: X g de NaCl

$$X = \frac{400 \times 29.25}{1000} = 11.7 \text{ g de NaCl}$$

Resultado: necesitamos 11.7 g de NaCl y disolverlo hasta completar un volumen de 400 ml.

En este ejemplo, cómo podemos ver, hemos multiplicado la molaridad del problema (0.5 mol/L) por el peso molecular de NaCl (58.5 g) y por el volumen del problema (400 ml). Posteriormente dividiremos entre 1 litro (1 000 ml). Para simplificar el procedimiento podemos aplicar la siguiente fórmula:

$$\underline{V \times PM \times M} = \text{gramos de la sustancia}$$

1000

En donde:

V = Volumen del problema en ml.

PM = Peso molecular de la sustancia en g.

M = Molaridad del problema.

Soluciones normales

Son las que contienen el peso equivalente de una sustancia en gramos por litro de solución:

$$N = \frac{\text{peso equivalente}}{\text{litro de solución}}$$

donde el peso equivalente de una sustancia es el número de unidades de esta sustancia que puede combinarse con una unidad de hidrógeno:

$$\text{Peso equivalente} = \frac{\text{peso molecular}}{n}$$

n = número de hidrógenos sustituibles.

Ejemplo: el *peso equivalente de un ácido* se calcula dividiendo el peso molecular entre el número de átomos de hidrógeno sustituibles en la molécula. El ácido sulfúrico (H_2SO_4), de peso molecular 98, tiene dos átomos de hidrógeno sustituibles en cada molécula; por lo tanto, su peso equivalente es: $98/2 = 49$.

El *peso equivalente de un hidróxido* se calcula dividiendo el peso molecular entre el número de grupos hidroxilo (OH^-) de la molécula. El hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$ contiene tres grupos

OH^- por molécula; su peso molecular es de 78; por lo tanto, su peso equivalente es $78/3 = 26$.

El *peso equivalente de una sal* se calcula dividiendo el peso molecular entre la valencia total de los cationes (cargas positivas) que contenga la fórmula. La valencia del sodio es 1, y el sulfato de sodio Na_2SO_4 (peso molecular 144) tiene dos iones de sodio en cada molécula; por lo tanto, el peso equivalente del sulfato de sodio será $144/2 = 72$.

El *peso equivalente de un oxidante (reductor)* se calcula dividiendo el peso molecular entre el número de electrones ganados (o perdidos) que puedan aportar por molécula.

Recordemos la fórmula utilizada para calcular la cantidad de sustancia necesaria para preparar cualquier cantidad de una solución determinada:

Para calcular la cantidad de una sustancia que se necesita pesar para preparar un volumen determinado de una solución de cualquier normalidad, se aplica una fórmula semejante:

$$\frac{V \times \text{Eq} \times N}{1000} = \text{gramos de la sustancia}$$

Ejemplo: preparar una solución 0.1 N de cloruro de calcio (CaCl_2) para obtener un volumen de 300 ml:

$$V = 300 \text{ ml}$$

$$N = 0.1$$

$$\text{Eq} = \text{peso molecular del } \text{CaCl}_2 / 2 = 111/2 = 55.5$$

$$\text{Sustituyendo} = \frac{300 \text{ ml} \times 55.5 \text{ g} \times 0.01 \text{ N}}{1000} = 1.67$$

Resultado: necesitamos 1.67 g de CaCl_2 para preparar 300 ml de una solución 0.1 N.

Soluciones osmolares

El fenómeno de la ósmosis se presenta cuando una solución está separada de su solvente por una membrana semipermeable. La ósmosis es la difusión de solvente a través de la membrana desde la parte de menor a la de mayor concentración. La presión osmótica es la presión que debe aplicarse sobre la solución de mayor concentración a fin de impedir el paso del solvente (ósmosis) a través de la membrana.

Las membranas biológicas tienen permeabilidades distintas y se dice que son semipermeables, es decir, que son permeables de forma selectiva para las moléculas del solvente o pequeñas moléculas, pero no permiten el paso libre de todas las moléculas disueltas.

Las mediciones cuantitativas demuestran que la presión osmótica es proporcional a la concentración molar (para sustancias no disociables) del soluto, por lo que una solución osmolar es aquella que contiene un mol de la sustancia en gramos en un litro de solución; el osmol es una medida del número total de partículas en solución. La concentración expresada en osmol por litro se llama osmolaridad; el osmol por kilogramo de disolvente se denomina osmolalidad; en las soluciones muy diluidas, como son las del cuerpo humano, las dos medidas son tan cercanas que con gran frecuencia se utilizan indistintamente.

La presión osmótica depende del número de partículas y no de su carga, ni de su masa; la misma fuerza osmótica es ejercida por una molécula grande, como una proteína, con peso

molecular de varios miles y muchas cargas, como por una molécula de glucosa o un ion de Na^+ o de Cl^- . Así para determinar el efecto osmótico de una solución hay que sumar los efectos de todas las partículas incapaces de atravesar la membrana independientemente de su peso molecular.

Por ejemplo: el cloruro de sodio en solución acuosa se disocia casi completamente en iones sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-). Por lo tanto, cada molécula da origen a dos partículas osmóticamente activas, y una solución osmolar contiene media molécula gramo (peso molecular expresado en gramos) por litro, o sea:

$$1 \text{ osm/l} = 58.5/2 = 29.25 \text{ g/l ó también}$$

$$1 \text{ mol de NaCl} = 2 \text{ osm/l}$$

En cambio, la glucosa en solución no se disocia y para esta sustancia la solución osmolar contiene un mol en gramos por litro:

$$1 \text{ mol de glucosa} = 180 \text{ g/l} = 1 \text{ osm/l}$$

La mayoría de los líquidos corporales tiene una presión osmótica que concuerda con la de una solución de cloruro de sodio a 0.9 % y se dice que esta solución es isosmótica con los líquidos fisiológicos.

Soluciones isotónicas

Las soluciones isotónicas con respecto unas a otras ejercen la misma presión osmótica; es decir, contienen la misma concentración de partículas osmóticamente activas. Cuando se habla de soluciones isotónicas en

el laboratorio, suele tratarse de las que tienen la misma presión osmótica que el plasma sanguíneo, que es aproximadamente de 0.3 osmolar (300 miliosmoles). Las soluciones fisiológicas de concentración menor a 300 mosm/l se llaman hipotónicas; cuando su concentración es mayor de 300 mosm/l se denominan hipertónicas.

Una solución es isotónica con respecto a una célula viva cuando no ocurre ganancia ni pérdida neta de agua en la célula, ni se produce ningún otro cambio en ésta cuando entra en contacto con la solución.

El término isotónico, que significa: igualdad de tono, se emplea en medicina como sinónimo de isosmótico; pero los términos isotónico y tonicidad sólo deben emplearse en relación con un líquido fisiológico. Por ejemplo, una solución de ácido bórico que es isosmótica con la sangre y el líquido lagrimal, sólo es isotónica con el líquido lagrimal, ya que esta solución ocasiona hemólisis de los eritrocitos porque las moléculas de ácido bórico atraviesan libremente la membrana eritrocitaria a cualquier concentración. En consecuencia, isotonicidad connota compatibilidad fisiológica, mientras que isoosmotividad, no necesariamente. En otras palabras, la tonicidad es una fracción de la presión osmótica total de la solución; por tanto, la tonicidad de una solución no se puede predecir únicamente por su composición ya que intervienen también las propiedades distintivas de la membrana limitante.

Cálculo y expresión de diluciones

La dilución consiste en preparar una solución menos concentrada a partir de una solución inicial más concentrada. Las diluciones se expresan usualmente como una razón matemática, como 1:10.

Esto significa una unidad de solución original diluida a un volumen final de 10, esto es, 1 volumen de solución original con 9 volúmenes de solvente (volumen final = 10).

Para calcular la concentración de la solución diluida se multiplica la concentración de la solución original por la dilución expresada como fracción.

Ejemplo: una solución de 300 mg/100 ml se diluye en la razón 1:10. La concentración de la solución final es:

$$300 \times 1/10 = 30 \text{ mg /100 ml.}$$

Si se hace más de una dilución, a partir de una misma solución, la concentración de la solución final se obtiene al multiplicar la concentración original por el producto de las diluciones. Ejemplo: la solución anterior se diluye a su vez en la razón 1:100. La concentración de la solución será: $300 \times 1/10 \times 1/100 = 0.3 \text{ mg/100 ml.}$

La dilución y redilución sistemáticas de una solución se llaman *diluciones seriadas*. Para encontrar la concentración en un tubo dado de la serie, se multiplica la dilución en ese tubo por cada una de las diluciones precedentes, incluida la del tubo original.

Ejemplo: hacer una dilución seriada 1:2, 1:4, 1:8, etcétera, a un volumen final de 1 ml.

Paso 1: a 0.5 ml de la solución a diluir, añadirle 0.5 ml del diluyente y etiquetarlo como tubo 1 (dilución 1:2, volumen 1 ml).

Paso 2: transferir a otro tubo 0.5 ml de la dilución anterior y agregarle 0.5 ml de diluyente (dilución 1:2). La dilución final obtenida se calcula al multiplicar la dilución del tubo 1 (o anterior) con la nueva dilución ($1/2 \times 1/2$), igual a 1:4. Los pasos siguientes

se hacen igual que para el paso 2. En el siguiente cuadro se muestra un resumen de lo anterior.

Tubo	Dilución
1.	$\frac{0.5 \text{ ml}_{(1)}}{0.5 \text{ ml}_{(1)} + 0.5 \text{ ml}_{(2)}} = \frac{0.5 \text{ ml}_{(1)}}{1 \text{ ml}_{(3)}} = 1:2_{(4)}$
2.	$\frac{0.5 \text{ ml}_{(1)}}{0.5 \text{ ml}_{(1)} + 0.5 \text{ ml}_{(2)}} = \frac{0.5 \text{ ml}_{(1)}}{1 \text{ ml}_{(3)}} = 1:4_{(4)}$
es decir:	$1/2 \square \times 1/2 = 1:4$
3.	$1/4 \times 1/2 = 1:8$
4.	$1/8 \times 1/2 = 1:16$
5.	$1/16 \square \square \times 1/2 = 1:32$

- (1) Volumen de la solución original a diluir.
- (2) Volumen del agua necesaria para la dilución.
- (3) Volumen final.
- (4) Dilución obtenida.
- (5) Volumen de la solución diluida 1:2 (o anterior).

MANEJO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se le llama material biológico al conjunto de seres vivos o sus productos utilizado en el desarrollo del trabajo en el laboratorio. La utilidad e importancia de este material es muy grande ya que muchos fenómenos de los seres vivos sólo pueden estudiarse en ellos mismos, por ejemplo, la experimentación de nuevos fármacos o los mecanismos que se presentan en entidades patológicas y la producción de las mismas en forma experimental. Del correcto manejo dependerá en gran parte el éxito de la

experimentación y la veracidad de los resultados obtenidos. A continuación se darán algunas generalidades sobre el manejo del material biológico utilizado en las prácticas de este *Manual*.

Animales

El animal utilizado más comúnmente en el laboratorio de bioquímica es la rata. Para su correcto manejo es importante la forma cómo se sujeta, lo cual se hará con firmeza, pero a la vez, en forma suave para no lesionarla; no debe demostrársele miedo o repugnancia para evitar que se ponga nerviosa e intranquila, lo que puede ocasionar que muerda.

La palma de la mano se coloca sobre el dorso del animal; la cabeza de éste entre el dedo pulgar y el dedo índice; de esta manera se logra su inmovilidad y es posible levantar el animal y moverlo de lugar.

Muchas veces es necesaria la inyección intraperitoneal de alguna sustancia, para lo cual se sostendrá al animal con una mano, como se indicó antes, mientras con la otra se introduce la aguja de la jeringa formando un ángulo de 10° con la pared abdominal en el cuadrante inferior izquierdo, ligeramente a la izquierda de la línea media; es importante mantener el ángulo de la aguja porque, si éste se abre, la aguja puede llegar a la vejiga o al intestino. Para tener la seguridad de estar en la cavidad peritoneal, hay que jalar el émbolo de la jeringa para que se haga el vacío; si el vacío no se hace y, por el contrario, se extrae líquido, es probable que se haya puncionado la vejiga.

Para la extracción de vísceras, como el hígado, es necesario sacrificar al animal, lo cual se logra fácilmente y con menor sufrimiento para la rata anestesiándola o descerebrándola, o sea, seccionando la médula espinal a nivel del cuello mediante un

golpe certero en este lugar contra el borde de una mesa. Después se prosigue a la extracción de la víscera y se abre la pared abdominal con unas tijeras o bisturí.

Extracción de sangre para análisis

El profesor a cargo del grupo deberá estar presente en el momento de la extracción; de lo contrario, por ningún motivo, el alumno podrá hacerla por su cuenta.

Procedimiento para obtener una muestra de sangre venosa:

1. Para que un alumno sea considerado como voluntario deberán tomarse en cuenta algunos antecedentes como: no padecer o haber padecido hepatitis o alguna otra enfermedad infectocontagiosa; no tener problemas de coagulación y no ser muy aprensivo. El donador (de preferencia con las venas visibles), estará sentado con el brazo sobre la mesa.
2. Con una ligadura elástica, aplicar un torniquete en el brazo por encima del sitio de la punción (esto causa congestión venosa y evita el retorno de la sangre). El uso prolongado del torniquete causa estasis de la sangre y hemoconcentración. Si las venas no se hacen prominentes, pedir al donador que cierre y abra la mano varias veces. Escoger una vena fija y de buen calibre, localizarla y palparla con el dedo para sentir su consistencia y trayectoria; antes de puncionar, asegurarse de que la jeringa no contenga aire y que el émbolo se deslice suavemente. Las dimensiones de la aguja y la jeringa dependen de la cantidad de sangre que se necesita así como del tamaño e integridad de la vena que se usa. También se puede usar el sistema Vacutainer que consiste en un tubo al

vacío, un mango y una aguja recolectora de muestras múltiples.

3. Limpiar minuciosamente la zona con una torunda humedecida con alcohol de 70° y dejar secar espontáneamente. Sujetar la piel con el pulgar izquierdo; puncionar primero la piel y luego penetrar la vena con el bisel de la aguja hacia arriba siguiendo el trayecto de la vena.
4. Después que se ha entrado a la vena, la sangre llenará los tubos vacíos del sistema vacutainer. Si se usa jeringa, se necesita una ligera succión con ésta para obtener la muestra (por lo general, aparece una gota de sangre en la base de la aguja). Una succión excesiva puede causar colapso de la vena. Tirar del émbolo de la jeringa hasta que se haya extraído la cantidad de sangre deseada.
5. Soltar la ligadura antes de extraer la aguja con un movimiento rápido y uniforme mientras que se ejerce una presión sobre la herida con una torunda.
6. Mantener la presión por un momento o hasta que se haya detenido el sangrado. Cubrir la punción con una cinta adhesiva.
7. Retirar la aguja de la jeringa en el contenedor de punzocortantes y vaciar lo más pronto posible la muestra de sangre en un tubo de centrifuga procurando deslizar la sangre suavemente por la pared del tubo (si es que no se utilizó el sistema Vacutainer).

Alerta clínica

Si es difícil detener el sangrado de la punción, elevar la zona y aplicar una cubierta que presione. Los hematomas se pueden evitar:

- Usando una buena técnica.

- Aflojando el torniquete antes de retirar la aguja.
- Aplicando la presión suficiente sobre el sitio de punción después de completar el procedimiento.

La sangre obtenida puede tratarse de diferentes maneras según el empleo que se le vaya a dar.

Para obtener *suero*. La sangre se recibe en un tubo de ensayo o de centrífuga seco y se deja coagular a temperatura ambiente o en una estufa o baño de agua a 37° C. Si se va a trabajar inmediatamente con el suero, separar con un aplicador de madera el coágulo y centrifugar el resto del tubo. Si se desea la separación espontánea del suero, se deja a temperatura ambiente por unas horas para que el coágulo se retraiga. Debe evitarse que el suero se mezcle con porciones de coágulo; si esto sucede, es necesario centrifugar y volver a separar el suero con una pipeta Pasteur.

Para obtener *plasma*. Hay que evitar la coagulación por medio de un anticoagulante (heparina, citrato de sodio o EDTA) en el tubo que recibe la sangre.

Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar a 2 500 rpm durante 5 minutos y extraer enseguida el plasma sobrenadante con una pipeta Pasteur; pasarlo a otro tubo.

La sangre, el plasma o el suero y todos los recipientes que los contengan deben considerarse como material potencialmente infectante, por lo que (torundas, agujas, tubos, etcétera) deberán depositarse, de acuerdo a su clasificación, en envases que tengan impreso el símbolo de riesgo biológico y entregarse a la coordinación del laboratorio para su desinfección y desecho.

MEDIDAS DE SEGURIDAD

Durante el desarrollo del curso de bioquímica, en el laboratorio se pueden llegar a utilizar sustancias o muestras biológicas que, en ocasiones representan riesgos potenciales a la salud, debido a que pueden ser: corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico infecciosas.

Aunque los laboratorios se consideran en general lugares de trabajo seguros, esto es así sólo cuando conocemos y seguimos las normas de seguridad existentes en la materia acerca de la clasificación, manejo y disposición final de estas sustancias, lo cual nos permite identificar los peligros y disminuir los riesgos.

Manejo de materiales peligrosos y/o biológico infecciosos

Precauciones generales: Se refieren a las medidas para minimizar la difusión de enfermedades transmisibles, especialmente hepatitis B o SIDA y para evitar incendios, cortaduras o exposiciones simples, de corta duración o accidentales a sustancias químicas peligrosas.

1. Manejar cualquier líquido corporal, sangre, plasma, suero, orina, tejido, cadáver o cultivo como potencialmente infeccioso. Todas las sustancias químicas proporcionadas, equipos y materiales del laboratorio deberán ser utilizados con el máximo cuidado, atendiendo a las indicaciones de peligrosidad y cuidados específicos, según el caso.
2. Se debe conocer los símbolos y los códigos de color sobre las precauciones y los peligros en el laboratorio. Asegurarse de conocer la localización de extinguidores, del botiquín y de las salidas de emergencia.

3. Usar bata en el laboratorio, la cual deberá estar cerrada durante todo el tiempo que se permanezca en el laboratorio.
4. Lavar las manos y usar guantes. Los guantes deben usarse para efectuar punciones vasculares y para manipular sangre, líquidos corporales, cultivos de microorganismos, sustancias o superficies contaminadas. Después del uso de cualquier material biológico, se procede al lavado de manos con los guantes puestos. Después de quitarse los guantes debemos lavarnos nuevamente las manos.
5. Todos los materiales desechables y no desechables se deben descontaminar en una solución 1:10 de hipoclorito de sodio de 4 a 7 % de concentración, durante más de 20 minutos antes de ser desechados.
6. Los elementos punzocortantes deben desecharse en recipientes especiales destinados para ello, los cuales deben estar etiquetados con la leyenda que indique "Peligro, residuos punzocortantes biológico-infecciosos" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico. Nunca reencapuchar las agujas
7. Limpiar las superficies potencialmente contaminadas con hipoclorito de sodio al 1%, con alcohol al 70% o con agua oxigenada.
8. *Todas las sustancias químicas son potencialmente tóxicas y peligrosas, por lo que se deberá:*
 - a) Conocer las propiedades (venenosas, cáusticas o corrosivas) y el uso correcto de las mismas.
 - b) Nunca probar, así como tampoco inhalar, directamente las sustancias. Para determinar el olor se acerca la tapa del frasco cuidadosamente a la nariz, o bien, si se trata de sustancias volátiles o vapores acercar éstos con la mano a la nariz.
 - c) Evitar el contacto de sustancias con la piel, especialmente la cara; usar bata y guantes para proteger la ropa y el cuerpo; nunca dirigir un tubo de ensayo o la boca de un matraz con líquidos en ebullición o material de reacción hacia el vecino, o a sí mismo, ya que puede proyectarse el contenido; para las sustancias que no tienen un efecto pronunciado sobre la piel, pero cuya ingestión es peligrosa, evitar la contaminación de alimentos, cigarrillos o manos que después se llevarán a la boca o con las que se tocarán alimentos (nunca ingerir alimentos en el laboratorio). Por último, nunca pipetear con la boca, especialmente los ácidos fuertes, productos cáusticos, oxidantes fuertes y compuestos venenosos.
9. Seguir las indicaciones del profesor y del personal a cargo del área de prácticas. Es una regla de laboratorio que todos los accidentes personales, por triviales que sean, se comuniquen inmediatamente al profesor. Nunca realizar actividades experimentales sin la supervisión del responsable del grupo.
10. Manejar adecuadamente los residuos peligrosos derivados de las prácticas, identifique su nivel de riesgo y el mecanismo para su desecho. Queda prohibido desear sustancias a la tarja o por cualquier otro medio, sin autorización del responsable del grupo. Las hojas de seguridad correspondientes incluyen qué hacer en caso de accidentes y la forma correcta de desear los residuos.

11. Indicaciones generales para evitar incendios o explosiones al utilizar solventes inflamables. Los solventes inflamables (alcohol, éter, cloroformo, acetona, tolueno, xilol, etcétera) se utilizan en todos los laboratorios, por lo que se recomiendan las siguientes precauciones:

- a) No fumar en el interior del laboratorio.
- b) No utilizar la llama del mechero sin cerciorarse de que no hay cerca líquidos inflamables. No mantener el mechero encendido cuando esté fuera de uso.
- c) Si se vierten accidentalmente sobre las mesas, secar de inmediato con un trapo húmedo y enjuagar éste en el chorro de agua, exprimiéndolo.
- d) Nunca calentar un líquido orgánico sobre una flama. Para calentar, usar baño de agua o parrilla eléctrica.

En caso de incendio debe hacerse lo siguiente: para un incendio pequeño en un vaso, un matraz, etcétera, éste se cubrirá con un recipiente mayor o se ahogará el fuego con un trapo mojado o se combatirá con un extinguidor.

Cuando el fuego sea de un solvente derramado sobre la mesa o el piso, se utilizará un extinguidor de bióxido de carbono. Si el fuego no puede vencerse de inmediato, se evacuará el laboratorio y se avisará al departamento contra incendios de la institución.

12. Los accidentes más frecuentes que ocurren en el laboratorio son las lesiones debidas a cortes, laceraciones, etcétera, por cristalería rota.

En caso de heridas pequeñas dejar que sangre unos segundos; tener cuidado de no dejar partículas de vidrio en la herida y aplicar un desinfectante.

Las heridas de mayor importancia deben ser atendidas por un médico. Mientras tanto, evitar el sangrado aplicando presión en un punto más arriba la herida o antes de ella (no mantener la presión por más de 5 minutos).

10. Casi siempre, los choques eléctricos en el laboratorio son de poca importancia; las precauciones de seguridad se deducen de la naturaleza del peligro. Nunca tocar un aparato eléctrico con las manos húmedas o cuando se esté parado sobre un piso húmedo. Siempre apagar y desconectar los aparatos antes de cualquier manipulación.

Pictogramas de seguridad

En las etiquetas de productos químicos de uso en el laboratorio además de la identificación del contenido, calidad y límite de pureza de lo que contiene, podemos encontrar pictogramas (símbolos internacionalmente aceptados y reconocidos) que indican los riesgos principales. Los pictogramas de seguridad son:

RIESGO BIOLÓGICO



Todo aquello que pueda contener bacterias, virus u otros microorganismos con capacidad de infección o cuando contiene toxinas producidas por microorganismos que causen efectos nocivos a los seres vivos. Ejemplo: jeringas, sangre.

Medidas de prevención: evitar el contacto con los ojos, la piel y las vías respiratorias. Utilizar elementos de protección personal.

E = EXPLOSIVO



Es toda sustancia sólida o líquida o mezcla de sustancias que pueden desprender gases a una temperatura, presión y velocidad tales que pueden detonar, producir violentas deflagraciones, o explotar al exponerse al calor cuando están parcialmente confinadas. Ejemplo: azida de plomo, fluoruro de carbono.

Medidas de prevención: almacenarlas alejadas de otros productos, evitar todo choque, fricción y mantener alejadas de fuentes de calor, chispas o fuego.



O = OXIDANTE

Sustancias capaces de aportar oxígeno cuando reaccionan con otra sustancia, por lo que cuando entran en contacto con combustibles o inflamables avivan la reacción pudiendo desarrollar reacciones violentas. Ejemplo: nitrito de sodio, hiposulfito de sodio.

Medidas de prevención: mantener alejadas de las sustancias combustibles o inflamables, ya que pueden favorecer los incendios y dificultar su extinción.



Xn = NOCIVO

Sustancias de menor toxicidad pero pueden causar daños a la salud. También se incluyen aquellas mezclas o preparados que tienen alguna sustancia que puede ser tóxica pero que se encuentra a una baja concentración en la mezcla.

Xi = IRRITANTE

Sustancias que pueden causar irritación a la piel, mucosas, o los ojos, por contacto inmediato, prolongado o

repetido, pudiendo también provocar inflamación. Ejemplo: cloroformo, SDS, hipoclorito de sodio, aminoantipirina.

Medidas de prevención: evitar el contacto con los ojos, la piel y las vías respiratorias. Utilizar elementos de protección personal.



F+ = EXTREMADAMENTE INFLAMABLE

Sustancias cuyo punto de ignición es menor de 0°C y su punto de ebullición máximo de 35°C.

F = INFLAMABLE

Sustancias líquidas cuyo punto de ignición es menor a 40°C. Ejemplo: etanol, tolueno, éter dietílico.

Medidas de prevención: mantener alejado de fuentes de calor, de ignición o eventuales chispas, de materiales combustibles y oxidantes.



N = NOCIVO PARA EL MEDIO AMBIENTE

Aquellas sustancias o preparados que cuando son liberados al medio ambiente pueden presentar un efecto inmediato o diferido, poniendo en peligro a alguna especie. Ejemplo: tiourea, o-toluidina.

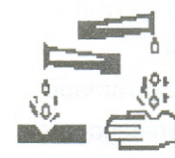
Medidas de prevención: evitar que los derrames alcancen los desagües, tratar los residuos en condiciones ambientalmente adecuadas.



T+ = ALTAMENTE TÓXICO, T TÓXICO

Sustancias que pueden causar daño en forma aguda o crónica a la salud o causar la muerte si son inhaladas, ingeridas o se absorben por la piel, aún en pequeñas cantidades. Ejemplo: azida de sodio, dinitrofenol, bromuro de etidio.

Medidas de prevención: evitar todo contacto directo. Utilizar elementos de protección personal. Emplear estrictas medidas de higiene personal y del ambiente del laboratorio.



C = CORROSIVO

Sustancias capaces de atacar y destruir los tejidos orgánicos si entran en contacto con ellos o bien atacar ciertos metales o materiales. Ejemplo: hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido acético.

Medidas de prevención: evitar el contacto con los ojos, la piel y las vías respiratorias. Utilizar elementos de protección personal.

Identificación sobre los riesgos específicos y los consejos de prudencia

Frases "R" éstas advierten acerca del riesgo más común asignado a esa sustancia química, por medio de la enumeración de riesgos específicos en frases cortas que son adaptables a las distintas sustancias.

Las frases "S" brindan los consejos de prudencia o las medidas de prevención más importantes relacionadas con el riesgo asignado a esa sustancia química y que permitirán su manipulación y almacenamiento en forma segura. En algunos casos se mencionan combinaciones de frases R o de frases S, cuando dos o más riesgos tienen relación entre sí (cuadro I.6).

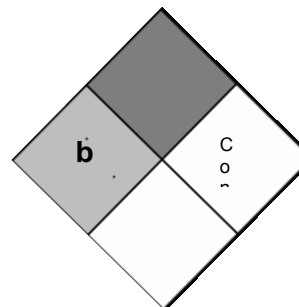
El símbolo de la N.F.P.A. (National Fire Protection Association)

El símbolo de la N.F.P.A. es un sistema de identificación de riesgos de un producto químico, en tres categorías principales: "salud", "inflamabilidad" y "reactividad" indicando el grado de severidad por medio de una escala numérica desde (4) que indica el riesgo mayor, (3) riesgo severo, (2) riesgo moderado, (1) riesgo menor, hasta (0) que representa ausencia de riesgo.

Este símbolo es útil para alertar acerca del riesgo de ese producto y, a su vez, puede ayudar a determinar los cuidados a tener en cuenta en el almacenamiento y en caso de emergencias, de derrames o salpicaduras.

La información se presenta por medio de una estructura espacial en forma de rombo principal, dividido a su vez en otros cuatro.

El rombo azul a la izquierda identifica el riesgo para la salud. El rombo rojo en la parte superior indica el riesgo por inflamabilidad. El rombo amarillo a la derecha señala el riesgo por reactividad o inestabilidad. El rombo blanco en la parte inferior indica riesgos especiales tales como: W reactivo al agua, COR corrosivo, AIR reactivo al aire, OXY oxidante. Ejemplo:



Ácido clorhídrico

Hojas de seguridad

Cada práctica cuenta con las hojas de seguridad para cada reactivo o sustancia que se utilice en el laboratorio.

Las hojas de seguridad proveen información sobre (cuadro I.7, pág. 100):

- Los componentes de un producto, su reactividad, las medidas precautorias principales o las advertencias más importantes.
- Los elementos de protección personal que se recomienda emplear en la manipulación.
- Las vías de ingreso y los órganos blanco.

- Las medidas por derrame accidental y de primeros auxilios.
- La información toxicológica.
- Las recomendaciones para su almacenamiento.
- Las condiciones para la disposición de los residuos.

Clasificación de los residuos

Los residuos que se generan en laboratorios de instituciones de enseñanza o investigación así como en hospitales y clínicas contienen residuos no peligrosos o municipales, residuos biológicos infecciosos y residuos especiales.

Residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI): es todo aquello que ha entrado en contacto con pacientes o animales, sus muestras biológicas y/o cepas de microorganismos, se clasifican en: sangre, cultivos, patológicos (tejidos, órganos, partes y fluidos corporales, etcétera), no anatómicos (gasas, algodones, jeringas, etcétera) y punzocortantes (lancetas, agujas, pipetas Pasteur, etcétera).

Residuos municipales: son aquellos que no representan peligro para la salud y sus características son similares a los residuos domésticos comunes.

Residuos especiales CRETI: son aquellos residuos que constituyen un peligro para la salud por sus características agresivas tales como: **Corrosividad, Reactividad, Explosividad, Toxicidad e Inflamabilidad** Es importante no olvidar que, la mezcla de residuos municipales con residuos biológico infecciosos hace que se consideren en su totalidad como biológico infecciosos, mientras que la mezcla de residuos biológico infecciosos con peligrosos CRETI se deben considerar como peligrosos CRETI.

Envasado y etiquetado de RPBI para su desecho.

Los residuos RPBI deben ser envasados de acuerdo con sus características físicas y biológico infecciosas conforme la norma oficial mexicana 087-ECOL-95 (cuadro I.8).

Es importante destacar que todos los envases tengan impreso el símbolo universal de riesgo biológico y leyendas que indiquen la peligrosidad de los residuos y el tipo de residuos que contienen.

Los contenedores para punzocortantes deben de ser: De color rojo.

- De paredes rígidas.
- De polipropileno.
- Resistentes a fracturas y pérdida del contenido al caerse.
- Destruibles por métodos fisicoquímicos.
- Esterilizables y con tapa, la que puede tener o no separador de agujas.

Precauciones: depositar los RPBI, de acuerdo a su clasificación, inmediatamente después de su generación.

No compactar los residuos durante el envasado y no mezclar residuos de diferente clasificación.

Una vez identificados, separados y envasados correctamente los residuos peligrosos, el personal responsable del laboratorio se encargará de su recolección, tratamiento y disposición final así como de las medidas necesarias para la desinfección, esterilización y limpieza del material y equipo utilizado en el laboratorio.

De manera general, los envases destinados a los residuos CRETI deben ser de cristal de color ámbar, con capacidad de uno a

cuatro litros, latas de aluminio para solventes (capacidad máxima de 20 litros) y, en algunos casos recipientes de plástico, siempre y cuando las características fisicoquímicas de la sustancia a envasar lo permita. Cada residuo debe envasarse en forma individual y colocar en el frasco respectivo el pictograma de seguridad correspondiente.

Manejo de residuos CRETI

El manejo, consistente en la separación, envasado y almacenamiento de cada uno de los reactivos peligrosos CRETI utilizados en las prácticas deberá realizarse de acuerdo a cada reactivo en cuestión según lo indicado en las hojas de seguridad.

El manejo de accidentes, tales como derrames, ingestión o salpicaduras, así como la aplicación de primeros auxilios deberán de realizarse de acuerdo al reactivo en cuestión según lo indicado en la hoja de seguridad. Las hojas de seguridad serán proporcionadas para cada práctica en el laboratorio.

De manera general, los envases destinados a los residuos CRETI deben ser de cristal de color ámbar, con capacidad de uno a cuatro litros, latas de aluminio para solventes (capacidad máxima de 20 litros) y, en algunos casos recipientes de plástico, siempre y cuando las características fisicoquímicas de la sustancia a envasar lo permita. Cada residuo debe envasarse en forma individual y colocar en el frasco respectivo el pictograma de seguridad correspondiente.

	Frases R	Frases S		Combinación de frases
R 7	Puede provocar incendios	S 3 Conservar en sitio fresco	R 20/21	Nocivo por inhalación y contacto por la piel
R 23	Tóxico por inhalación	S 20 No comer ni beber durante la manipulación	R 39/25	Tóxico: peligro de efectos irreversibles graves por ingestión
R 36	Irrita los ojos	S 29 No tirar los residuos por los desagües	S 3/7	Mantenga el contenedor bien cerrado y en un lugar fresco
R 45	Puede ser cancerígeno	S 37 Llevar guantes de protección adecuados	S 36/37/39	Utilice ropa protectora adecuada, guantes y protección facial o gafas

Cuadro I.6 Ejemplos de frases S y R

TIPO DE RESIDUO	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
Sangre	Sólido Líquido	Bolsa de plástico Recipiente hermético	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos Líquidos	Bolsa de plástico Recipiente hermético	Rojo
Residuos no anatómicos	Sólidos Líquidos	Bolsa de plástico Recipiente hermético	Rojo
Patológicos	Sólidos Líquidos	Bolsa de plástico Recipiente hermético	Amarillo
Objetos punzocortantes usados y sin usar	Sólidos	Recipientes rígidos	Rojo

Cuadro I.8 Envasado y etiquetado de RPBI para su desecho.

Ácido clorhídrico

Identificación

Fórmula química: HCl

Apariencia y olor: solución de color ligeramente amarillo o incolora con olor característico muy penetrante.

Marcaje líquido corrosivo

Sinónimos: ácido muriático, cloruro de hidrógeno.

Generalidades

Está presente en el sistema digestivo de muchos mamíferos y una deficiencia de éste provoca problemas en la digestión; un exceso provoca úlceras gástricas. La disolución acuosa grado reactivo contiene aproximadamente 38% de HCl.

Propiedades física y químicas

PM: 36.46

Solubilidad: soluble en agua

pH de disoluciones acuosas: 0.1 (1.0N), 4.0(0.001N).

Reacciona con la mayoría de los metales desprendiendo hidrógeno.

Con agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno genera cloro, el cual es muy peligroso.

Niveles de toxicidad.

DL₅₀ (oral en conejos): 900 mg/Kg, inhalación en ratas): 3124 ppm/1 h.

CLMo (concentración letal mínima publicada): (inhalación en humanos) 1300 ppm/30 min; 3000ppm/5 min.

Riesgos

Produce gas inflamable cuando se encuentra en contacto con metales. Se generan vapores tóxicos e irritantes de cloruro de hidrógeno cuando se calienta.

Inhalación: el gas causa dificultad para respirar, tos, inflamación y ulceración de nariz, tráquea y laringe. Exposiciones severas causan espasmo de la laringe y edema en los pulmones.

Contacto con los ojos y piel: es un irritante severo de ojos y piel, puede causar quemaduras serias, dermatitis, reducir la visión o, incluso, la pérdida total de ésta.

Ingestión: produce corrosión de las membranas mucosas de la boca, esófago y estómago, causa náusea, vómito, disfagia, sed intensa y diarrea

Primeros auxilios

Ojos: lavar inmediatamente con agua corriente durante 15 minutos.

Piel: quitar ropa y zapatos contaminados, lavar inmediatamente la zona dañada con abundante agua.

Inhalación: mover a la persona al aire fresco; si se dificulta la respiración proporcionar oxígeno y mantenerlo caliente y en reposo, no dar a ingerir nada.

Ingestión: no provocar vómito y dar a beber agua continuamente, por ejemplo, una cucharada cada 10 minutos o dar a beber leche de magnesia.

En todos los casos de exposición, el afectado debe ser transportado al hospital tan pronto como sea posible.

Manejo y almacenamiento

Peligro: corrosivo y veneno. Manténgase en envase de vidrio, en lugares secos, bien ventilados, alejados de materiales oxidantes y fuentes de ignición o calor.

Tratamiento en caso de accidente

Control de fuego: en caso de accidente utilizar CO₂, polvo químico seco o arena seca. Los extinguidores de fuego se eligen dependiendo de los alrededores, ya que el HCl no arde.

Fugas y derrames: ventilar el área y protegerse con el equipo de seguridad necesario. Cubrir el derrame con bicarbonato de sodio o una mezcla de 50:50 de hidróxido de calcio y cal sodada, mezclar cuidadosamente. Mantener el material lejos de fuentes de agua y drenajes hasta no ser neutralizado como se indicó anteriormente.

Desechos

Neutralizar las soluciones concentradas de ácido clorhídrico con carbonato de calcio o cal y diluir con agua cuidadosamente. La disolución resultante puede verterse al drenaje, con abundante agua. En caso de soluciones diluidas,

Cuadro I.7. Hoja de seguridad para el ácido Clorhídrico.

II

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Práctica 1

Soluciones

Tiempo de la práctica: 3 horas

Objetivos

Que el alumno:

1. Identifique la existencia de soluciones en los sistemas biológicos.
2. Explique los cálculos y procedimientos para preparar soluciones porcentuales, molares y normales, así como las diferentes diluciones de éstas.
3. Presente ejemplos de soluciones utilizadas en medicina (solución isotónica, Ringer, Darrow y Hartman).

Responda a las siguientes preguntas:

1. ¿Qué es una solución?
2. ¿Cuántas clases de soluciones existen?
3. ¿Qué significan los siguientes términos: mol, solución molar y solución normal?
4. ¿Qué significan: v/v, p/v, p/p y ppm?
5. ¿Cuál es la composición de las siguientes soluciones: solución isotónica de cloruro de sodio, suero glucosado al 5%, Ringer-lactato?
6. ¿Cuáles son los tipos de soluciones que existen in vivo? Mencionar ejemplos.
7. ¿Qué es una solución isotónica?
8. ¿Qué es una solución osmolar?
9. ¿Cómo se calcula la osmolaridad de una solución?

10. ¿Qué les pasa a los eritrocitos cuando se ponen en contacto con soluciones salinas de diferente osmolaridad?
11. ¿Qué se entiende por dilución y dilución seriada de las soluciones?

Material

Por equipo:

- 3 vasos de precipitado de 10 ml
- 1 pipeta de 1.0 ml
- 1 pipeta de 5.0 ml
- 1 pipeta de 10.0 ml
- Gradilla con 9 tubos de ensayo
- Eritrocitos humanos lavados en solución salina isotónica
- Solución de azul de metileno al 1.0%
- Cloruro de sodio en cristales (NaCl)
- Balanza granataria

Por grupo:

- 1 Microscopio marca Leica.

Procedimiento

1. Hacer los cálculos correspondientes para comprobar que la solución a 0.9% de NaCl es isotónica con respecto al plasma (ver pag. 26). Considerar que:
 - a) El cloruro de sodio se disocia en solución acuosa en los iones sodio y cloruro, por lo que la concentración iónica se duplica ($1 \text{ mmol/l} = 2 \text{ mosm/l}$).
 - b) La presión osmótica normal del plasma es de 290-310 mosm/l.

2. Preparar 20 ml de una solución de NaCl a 4.5% (etiquetar como solución 1).

3. A partir de la solución anterior, preparar 25 ml a 0.9% (solución 2) y 50 ml a 0.045% (solución 3).

4. Colocar en tres tubos de ensayo 1 ml de las diferentes soluciones de cloruro de sodio preparadas en los puntos 2 y 3. Con la ayuda de un gotero (dejando caer lentamente por las paredes del tubo) 2 gotas de eritrocitos lavados. Mezclar con cuidado y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Valorar el grado de hemólisis que sufren los eritrocitos cuando se ponen en contacto con las diferentes soluciones.

5. De las 3 soluciones preparadas tomar una gota de cada una y por separado colocarlas en un porta-objetos, colocar un cubre-objetos y observarlas al microscopio, para valorar el efecto de los eritrocitos.

Leer las instrucciones para el uso del microscopio

6. Hacer la dilución y redilución (dilución seriada) de la solución de azul de metileno como se muestra en el siguiente cuadro:

DILUCIÓN SERIADA DE AZUL DE METILENO

Tubo	H₂O (ml)	Sol de azul de metileno	Volumen de transferencia
1	2	0.5 ml*	-
2	2	-	0.5 ml
3	2	-	0.5 ml
4	2	-	0.5 ml
5	2	-	0.5 ml
6	2	-	0.5 ml

*Nota: para mezclar al hacer las diluciones se debe succionar y soplar con cuidado la pipeta en cada tubo varias veces antes de transferir la dilución al siguiente tubo.

Resultados

1. Expresar en forma ordenada los cálculos efectuados para cada uno de los ejercicios.

2. Deducir el movimiento o no del solvente cuando se ponen en contacto eritrocitos con soluciones hipo, hiper e isoosmóticas.

1. Calcular la dilución y la concentración de azul de metileno en cada uno de los seis tubos de la dilución seriada (ver pág. 28). Asegúrese que la coloración obtenida disminuya gradualmente conforme avanza la dilución.

Problemas

1. Hacer los cálculos para preparar una solución de KCl al 3%.
2. Hacer los cálculos para preparar una solución de CaCl_2 0.25 M se requieren 15 ml.
3. Calcular el volumen de H_2SO_4 que se requiere para preparar una solución 3N 40 ml volumen final. (densidad= 1.84g/ml).
- 4.- Prepare 500 ml de una solución 0.125 M de NaHCO_3
- 5.-250 ml de H_2SO_4 0.1 M
- 6.-100 ml de glucosa 0.5 M
- 7.-Cuántos mililitros de HCl 0.1M contiene 0.025 mol de HCl.
- 8.-Cuántos gramos de soluto se requieren para preparar las siguientes soluciones:
125 ml de NaCl al 10%
50 ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ al 3.35 %
750 ml de CaCl_2 al 1.5%
- 9.-Cual presenta la osmolaridad más alta NaCl 0.1M o Na_2SO_4 0.08 M
- 10.-A un enfermo hay que inyectarle 15 g de KCl y 126 g de glucosa ($\text{C}_6\text{O}_6\text{H}_{12}$)
¿Cuánta agua habrá que añadirles para que resulte un suero 0.4 osmolar?
- 11.- Calcular la osmolaridad a partir de la composición de algunas soluciones como Dextrosa a 10 % en solución salina a 0.45%.

12.-Calcular la osmolaridad a partir de Dextrosa a 5 % en solución salina a 0.2 %.

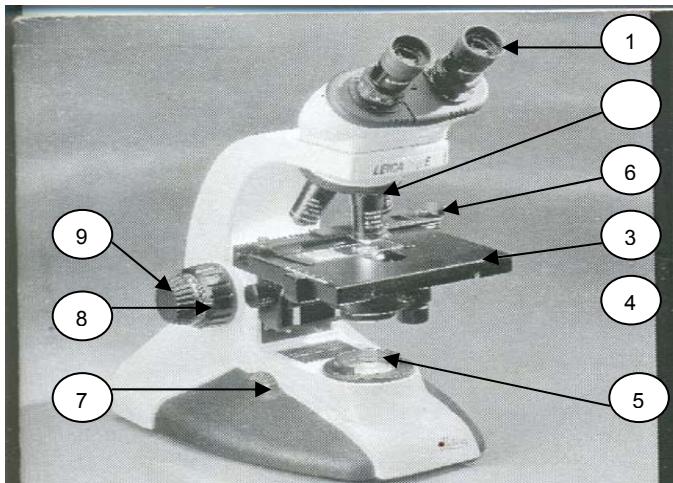
Buscar las composiciones de las siguientes soluciones. Hartman, Ringer y Darrow.

Referencias

1. Villazón SA, Cárdenas CO, Villazón DO, Sierra UA. Fluidos y electrolitos. México: JGH Editores; 2000.
2. Peña-Díaz A, Arroyo BA, Gómez PA, Tapia IR, Gómez EC. Bioquímica. Undécima reimpresión de la 2a. ed. México: Editorial Limusa; 2004.
3. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 5a.ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2002: p. 41-56.
4. Holum JR. Fundamentos de química general, orgánica y bioquímica para ciencias de la salud. México: Editorial Limusa Wiley; 2001.
5. Farias GM. Química clínica. Décima edición México: Editorial El Manual Moderno; 1999.
6. Bloomfield MM. Química de los organismos vivos. México: Editorial Limusa; 1997.

INSTRUCCIONES PARA EL USO DEL MICROSCOPIO MARCA LEICA

1. Nunca use un adaptador entre el cable y la fuente de alimentación.
2. Use siempre el microscopio sobre una superficie dura y estable.
3. Conecte el cable de alimentación del microscopio a una toma de corriente con conexión a tierra. Se suministra un cable de tres terminales con toma a tierra.
4. Encienda el microscopio girando el interruptor de control de la iluminación situado en la parte inferior izquierda del instrumento.
5. Coloque el interruptor de control de la iluminación en el nivel más bajo. El control de iluminación le permite ajustar la intensidad de luz.
6. Abra completamente el diafragma de apertura del condensador girando el anillo hacia el extremo derecho.
7. Usando el botón de enfoque del condensador, suba el condensador hasta el extremo superior de su desplazamiento. Iluminación crítica únicamente: si el desplazamiento del condensador es excesivo, límitelo con el tornillo situado debajo de la platina hasta que la lente superior del condensador se encuentre debajo de la superficie de la platina.
8. Coloque la preparación de la muestra con la muestra en la platina.
9. Gire el revólver hasta situar el objetivo 4X en la posición de trabajo. (pag X)
10. Suba la platina girando el mando de enfoque macrométrico hasta que observe la preparación y, finalmente, enfoque la muestra con precisión utilizando el mando de enfoque micrométrico.
11. Ajuste los tubos oculares a la distancia de los ojos.
12. Al término del uso del microscopio retirar la muestra de la platina.
13. Bajar la platina hasta el tope y regresarla a su posición original si es necesario.
14. Colocar el revolver de los objetivos de manera que el objetivo de 4X sea el que quede en dirección de la lámpara.
15. Desconectar el equipo y enrollar el cable.
16. Limpiar la platina y oculares con un paño humedecido con metanol o con un limpia cristal comercial.
17. Colocar al microscopio la funda contra el polvo para mantenerlo en buenas condiciones físicas y mecánicas.



Partes del microscopio:

- 1) Oculares.
 - 2) Revolver con 4 objetivos 4X, 10X, 40X y 100X.
 - 3) Platina.
 - 4) Diafragma.
 - 5) Lámpara.
- Tornillo de la platina para desplazar la muestra.
Interruptor de control de la iluminación.
Tornillo macrométrico.
Tornillo micrométrico.

Práctica 2

Regulación del equilibrio ácido-base después del ejercicio muscular intenso y de la ingestión de bicarbonato de sodio

Tiempo de práctica: 3 horas

Objetivos

1. Al finalizar la práctica, el alumno constatará las actividades reguladoras del pulmón y el riñón para mantener el equilibrio ácido-base en condiciones que tienden a romperlo.
2. Mediante la determinación del pH observará la variación de la concentración de hidrogeniones en la orina de un individuo que ha realizado ejercicio muscular intenso.
3. Relacionará los resultados obtenidos con los cambios metabólicos originados por el ejercicio muscular intenso.

Conteste las siguientes preguntas:

1. ¿Por qué es importante que se mantenga constante, dentro de ciertos límites, el pH en el organismo?
2. ¿Cuáles son las fuentes de iones H^+ en el organismo?
3. ¿Cuáles son los sistemas reguladores que facilitan la eliminación del H^+ producido en el organismo con el fin de mantener constante el pH sanguíneo?

4. ¿Cuáles son las reacciones de formación del ácido carbónico (H_2CO_3) a partir de CO_2 y H_2O , y de su disociación para formar el ion bicarbonato? Escríbalas.
5. ¿Qué sistemas amortiguadores participan directamente en la regulación del pH sanguíneo?
6. ¿Cuáles son los sistemas extrasanguíneos que tienden a mantener el pH extracelular?

Escriba la ecuación de Henderson y Hasselbalch aplicada al sistema HCO_3^-/H_2CO_3 y, con base en ella, conteste la siguiente pregunta:

- a). ¿Cómo participan el aparato respiratorio y el riñón en el control del pH sanguíneo?

INTRODUCCIÓN

Dentro de los mecanismos de regulación de que dispone el organismo para mantener la integridad fisiológica, aquellos involucrados en la homeostasis del pH en los fluidos extracelulares desempeñan un papel crucial para la supervivencia del individuo. En este sentido cabe señalar

que, como resultado de la oxidación de los alimentos, un humano adulto promedio produce alrededor de 20 moles de CO_2 al día. Al difundir a la sangre, gran parte de dicho gas se combina con el agua en el interior de los eritrocitos, produciendo ácido carbónico (H_2CO_3), reacción que es seguida por la disociación del H_2CO_3 para producir el anión bicarbonato HCO_3^- y un ión hidrógeno (H^+). Dado el carácter de ácido débil del H_2CO_3 , la fracción disociada del mismo es pequeña; sin embargo, considerando la gran cantidad de CO_2 que produce el organismo, la acidificación de los fluidos extracelulares sería importante en ausencia de mecanismos reguladores. En el hombre, la intervención de los pulmones y los riñones evita que ocurra tal acidificación manteniendo en un nivel constante la concentración de H^+ y, por consiguiente, del pH.

Para entender el papel que juegan ambos órganos en la homeostasis del equilibrio ácido-base, debe tenerse presente que el sistema del ácido carbónico implica la participación de un componente gaseoso o volátil (el CO_2) y dos componentes no volátiles (el HCO_3^- y el H^+). En la sangre, el equilibrio entre dichos componentes determina el valor del pH sanguíneo, que puede evaluarse mediante la bien conocida ecuación de Henderson-Hasselbach. En el individuo normal, dicho valor fluctúa en un promedio 7.4, siendo la sangre venosa –enriquecida en CO_2 ligeramente más ácida en relación con la sangre arterial. Ahora bien, ya que a temperatura ambiente el CO_2 existe en estado gaseoso, la cantidad de CO_2 disuelto en la sangre dependerá de la presión parcial (P_{CO_2}) ejercida por el mismo a nivel de los alvéolos pulmonares. En el humano, la magnitud de dicha P_{CO_2} es de aproximadamente 40 mmHg

lo que se traduce en una concentración de CO_2 sanguíneo de aproximadamente 25 mM; este último valor incluye no solo el CO_2 como tal, sino también el bicarbonato y el ácido carbónico. Considerando el pH sanguíneo normal y el pKa del sistema bicarbonato-ácido carbónico, la relación $[\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{CO}_2]$ es de aproximadamente 20. Es precisamente la P_{CO_2} la que es controlada por los pulmones, ya que durante el proceso de la exhalación se elimina CO_2 , manteniendo constante la P_{CO_2} en los alvéolos y evitando así que aumente el nivel de CO_2 disuelto en la sangre. Todo proceso o patología que se manifieste en una alteración en la frecuencia y/o profundidad del proceso de inhalación-exhalación, dará como resultado una alteración de la P_{CO_2} alveolar –aumentándola o disminuyéndola, –con la siguiente modificación del nivel de CO_2 disuelto en sangre y, por consiguiente, del pH.

Por lo que respecta a los riñones, su participación en el mantenimiento de un pH extracelular constante se da a través de dos mecanismos: la excreción de equivalentes ácidos (H^+) hacia la orina y la regulación de la cantidad de HCO_3^- reabsorbido hacia la sangre desde el filtrado glomerular. A diferencia del intercambio gaseoso en los pulmones, los mecanismos de regulación renal son de largo plazo, por lo que su efecto será manifiesto en cuestión de horas. Su importancia se enfatiza en situaciones patológicas donde se altera el intercambio de gases pulmonar (es decir, en la acidosis y alcalosis respiratorias), en cuyo caso es necesario aumentar o disminuir la tasa de reabsorción del HCO_3^- , o bien en estados fisiológicos que producen cantidades importantes de ácidos orgánicos (por ejemplo, en la diabetes no controlada o durante el ejercicio

intenso) donde se incrementa la excreción de H^+ . Gran parte de este último aparece en la orina acompañado con el amoníaco en forma de ión amonio (NH_4^+) o asociado con el fosfato en forma de fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4), representando este último la llamada acidez titulable. En general, el pH de la orina será un reflejo de la producción de ácidos no volátiles por el organismo.

El resultado final de los mecanismos fisiológicos que participan en el mantenimiento del equilibrio ácido-base es el de mantener el pH extracelular en un rango compatible con el funcionamiento adecuado del organismo.

Material

- Diez probetas o vasos de precipitado.
- Orina.
- Solución de bicarbonato de sodio a 3%.
- Potenciómetro.

Método

Un alumno por equipo desayunará o comerá normalmente (evitar ingestión de jugos ácidos); después hará lo que se indica a continuación.

1. Tomar 250 ml de agua una hora antes de la clase práctica. Vaciar la vejiga y descartar esa orina.
2. Tomar 250 ml de agua inmediatamente antes de la clase práctica.
- 3.-Orinar en un vaso de precipitado de 100 ml.
4. Ingerir 250 ml de agua.
5. Realizar ejercicio muscular intenso, como subir y bajar varias veces las escaleras de tres o cuatro pisos u otro ejercicio sugerido por el profesor.

6. Obtener muestras de orina cada 15 minutos, como en el inciso 3, hasta completar por lo menos cinco muestras.

7. A cada muestra se le determinará el pH inmediatamente después de haber sido obtenida ya que con el tiempo el pH tiende a aumentar debido a la pérdida de dióxido de carbono y a que el crecimiento bacteriano produce amoníaco a partir de la urea.

Análisis de resultados

Análisis de resultados

Una vez obtenido el valor del pH para cada una de las 5 muestras de orina, trazar una gráfica de pH contra tiempo; interpretar los resultados y discutirlos en grupo.

Objetivos (Segunda parte)

1. *El alumno constatará el papel del riñón en el mantenimiento del equilibrio ácido-base en una situación de alcalosis metabólica provocada por la ingestión de bicarbonato de sodio.*
2. *Mediante la medición del pH, observar la variación de la concentración de hidrogeniones en la orina de un individuo que ha ingerido una carga de bicarbonato de sodio.*

Hipótesis

Elabore la hipótesis apropiada.

Material

- Orina
- Solución de bicarbonato de sodio al 3%
- Potenciómetro

Método

1. Tomar 250 ml de agua una hora antes de la clase práctica. Vaciar la vejiga y descartar esa orina.
2. Tomar 250 ml de agua inmediatamente antes de la clase práctica.
3. Orinar en un vaso de precipitado de 100 ml.
4. Ingerir 250 ml de agua con 7.5 g de bicarbonato de sodio.
5. Obtener muestras de orina cada 15 minutos, hasta completar por lo menos 5 muestras.
6. A cada muestra se le determinará el pH inmediatamente después de haber sido obtenida.

Una vez obtenido el valor del pH para cada una de las cinco muestras de orina, trazar una gráfica de pH contra tiempo; interpretar los resultados y discutirlos en grupo.

Referencias

1. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverte; 2004.
2. Montgomery R. Bioquímica: casos y texto. 6a. ed. Editorial Harcourt-Brace; 1998: cap.4.
3. Villazón SA, Cárdenas CO, Villazón.

Práctica 3

Cinética enzimática.

Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción enzimática

Tiempo de práctica: 2 horas

Objetivo

El alumno:

1. Explicará el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.
2. Calculará por métodos gráficos la velocidad máxima y la constante de Michaelis de una reacción enzimática.
3. Conocerá los diferentes tipos de inhibidores que existen y estudiará su efecto sobre la K_m y $V_{máx}$.
4. Conocerá aspectos básicos de fotolorimetría (ver pág, 115).

Para lograr los objetivos de esta práctica contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Qué es la velocidad de una reacción enzimática?
2. ¿Cómo se define la constante de Michaelis (K_m) de una reacción enzimática?
3. ¿Cómo se define la velocidad máxima ($V_{máx}$) de una reacción?
4. ¿Para qué le sirve a un médico la determinación de la actividad de algunas enzimas?

5. ¿Cuáles son las enzimas cuya determinación tiene valor diagnóstico?

Hipótesis

Si la velocidad de una reacción enzimática es proporcional a la concentración del sustrato; cuando la concentración del sustrato es muy alta, por lo tanto la enzima se satura y alcanza su velocidad máxima.

La enzima que sirve de modelo en esta práctica es la glucosa oxidasa acoplada a la peroxidasa.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son las proteínas más notables de la naturaleza; sin ellas, la vida como la conocemos no sería posible. Las enzimas son catalizadores, esto es, aceleran la velocidad de las reacciones sobre las que actúan sin consumirse en el proceso. El poder catalítico de las enzimas es mucho mayor que el de los catalizadores inorgánicos, algunas de ellas están limitadas solo por la velocidad con que colisionan con sus sustratos; son catalizadores perfectos.

Aunque las reacciones que ocurren en la célula son

termodinámicamente favorables, la velocidad a la cual transcurren la mayoría de ellas es extremadamente lenta; sin la presencia de las enzimas, las reacciones necesarias para sostener la vida ocurrirían a una velocidad incompatible con ésta. Además de su enorme poder catalítico, las enzimas son altamente específicas por sus sustratos y tienen la capacidad de regular su velocidad en respuesta a las concentraciones de sustrato y la presencia de inhibidores, activadores, reguladores alostéricos, etc. Así pues, las enzimas desempeñan un papel central en los procesos biológicos, son las responsables de degradar y sintetizar las moléculas que nos forman y de extraer, transformar y utilizar toda la energía relacionada con estos procesos. Por último, las enzimas son las responsables de regular y coordinar todas las reacciones que ocurren en un organismo para lograr el delicado balance que representa la vida.

El primer modelo matemático que explicó de manera general la cinética de las enzimas no alostéricas, donde la velocidad de la reacción se incrementa hiperbólicamente conforme aumenta la concentración de sustrato, fue propuesto en 1913 por Leonor Michaelis y Maud Menten a partir de los trabajos previos de Victor Henri y Archibald Hill. Este modelo postula la idea central de que la enzima y el sustrato libres establecen un equilibrio rápido con el complejo enzima-sustrato; en un segundo paso más lento, este complejo se rompe liberando el producto y regenerando la enzima libre. La ecuación de Michaelis-Menten explica la relación entre la velocidad de la reacción catalizada por una enzima y la concentración de sustrato a través de los dos parámetros de la ecuación, V_{max} y K_m . La ecuación de Michaelis-Menten puede ser re-arreglada matemáticamente

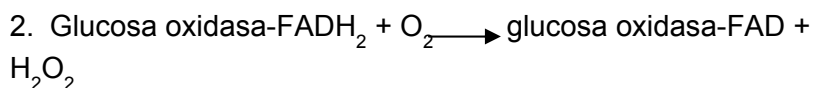
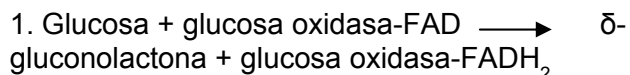
para obtener su forma lineal, permitiendo determinar de manera sencilla los parámetros cinéticos de una enzima a través del gráfico de Lineweaver-Burk. Este mismo gráfico permite inspeccionar rápida y visualmente las diferentes formas de inhibición enzimática.

El estudio de las enzimas es de suma importancia dentro de las ciencias médicas; las enzimas están implicadas en el origen, diagnóstico y tratamiento de una gran cantidad de patologías y es claro que en el futuro, su preponderancia será cada vez mayor. Por ejemplo, la deficiencia de algunas enzimas, como las proteasas de la coagulación en la hemofilia, es causa de enfermedades hereditarias. La presencia anormal de algunas enzimas en el torrente sanguíneo ayuda a diagnosticar el daño específico de tejidos, este es el caso de la amilasa y lipasa en las patologías pancreáticas y las transaminasas en las enfermedades hepáticas. Las enzimas son también el blanco de varios fármacos: la aspirina inhibe a la ciclooxigenasa, el omeprazol a la ATPasa de protones y el captopril a la enzima convertidora de angiotensina; estas inhibiciones redundan en un efecto terapéutico. La capacidad de producir enzimas recombinantes abrió la posibilidad de utilizarlas rutinariamente con fines terapéuticos, tal es el caso de la estreptocinasa para la terapia fibrinolítica en el infarto agudo al miocardio. Es claro que todas estas aplicaciones no serían posibles sin la previa y profunda comprensión de la estructura y función de estas fascinantes moléculas.

Fundamento

El método se basa en el hecho de que la glucosa, en presencia del oxígeno del aire y con la participación de la glucosa oxidasa, se oxida hasta ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno que se forma en el curso del proceso se descompone mediante la peroxidasa. El oxígeno atómico que se desprende en esta última reacción se combina con un cromógeno que se colorea al oxidarse. La intensidad de la coloración del cromógeno oxidado es proporcional a la concentración de glucosa.

La glucosa oxidasa (β -D-glucosa: oxígeno óxidorreductasa, EC1.1.2.4) tiene un peso molecular de 160 000. Existe en forma dimérica y contiene dos moles de FAD como grupo prostético por mol de enzima. La glucosa oxidasa es altamente específica, hecho que ha permitido su empleo para el análisis cuantitativo de glucosa. La reacción consiste de dos pasos:



La δ 4-gluconolactona se hidrata espontáneamente dando ácido glucónico. La reacción global se expresa:

Glucosa oxidasa



La peroxidasa cataliza la transferencia de oxígeno del peróxido a un aceptor que es cromógeno como la ortotoluidina, la ortodiansidina, la 2,2-azino-bis (3-

etilbencenziazolin-6-sulfónico) o la 4-amino-antipirina (y fenol) que se colorean al oxidarse.

La reacción se expresa:



Material y reactivos

- 2 Gradillas con 8 tubos de ensaye cada una.
- 1 Pipeta de 5 ml.
- 2 Pipetas de 1 ml.
- Fotocolorímetro con filtro azul.
- Solución estándar de glucosa 40 mmol/l y una dilución 1:10 de ésta para los tubos 2, 3 y 4.
- 2 frascos con solución de enzimas: 41.6 Uml⁻¹ de glucosa oxidasa, 4.6 Uml⁻¹ de peroxidasa, ortodiansidina 0.21 mmol/l.
- Solución de azida de sodio 400 mmol/l como inhibidor.
- Gotero con HCl.

Método I (con azida de sodio)

1. Preincubar 20 minutos la solución de enzimas con 0.3 ml del inhibidor.
2. Preparar la siguiente serie de tubos (tabla 1).
- 3.- Considerar un intervalo de 30 segundos para cada tubo al agregar la enzima.
- 4.- Agitar cada tubo e incubar 5 minutos a temperatura ambiente y de inmediato detener la reacción agregando 3 gotas de HCl concentrado. Considerar un intervalo de

30 segundos para cada tubo al agregar el HCl.

Método II (sin inhibidor)

1.- Preparar nuevamente una serie de tubos como lo indica la tabla 1.

2.- Repetir los pasos 3 y 4 del **Método I**

Leer ambas series de tubos en el fotocolorímetro; utilizar como blanco el tubo 1

Tubo No.	Solución de glucosa (ml)	H ₂ O (ml)	Solución de enzimas (ml)
1	0.0	1.0	3
2	dil 1:10 0.1	0.9	3
3	dil 1:10 0.25	0.75	3
4	dil 1:10 0.5	0.5	3
5	0.1	0.9	3
6	0.25	0.75	3
7	0.5	0.5	3
8	1.0	0.0	3

Resultados (cuadro 5.2)

1. Cálculo de la concentración inicial de sustrato en cada tubo; tomar en cuenta que la solución de glucosa contiene 40 $\mu\text{molas ml}^{-1}$.
2. La velocidad será igual a las unidades Klett por $\cdot 5 \text{ min}^{-1}$ de incubación.
3. Con los datos obtenidos completar el cuadro 5.2 y hacer las dos gráficas en papel milimétrico.
4. Hacer una segunda gráfica con los valores de $1/v$ vs $1/[S]$.

5. Calcular el valor de la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}$) y de la constante de Michaelis (K_m) con y sin inhibidor.

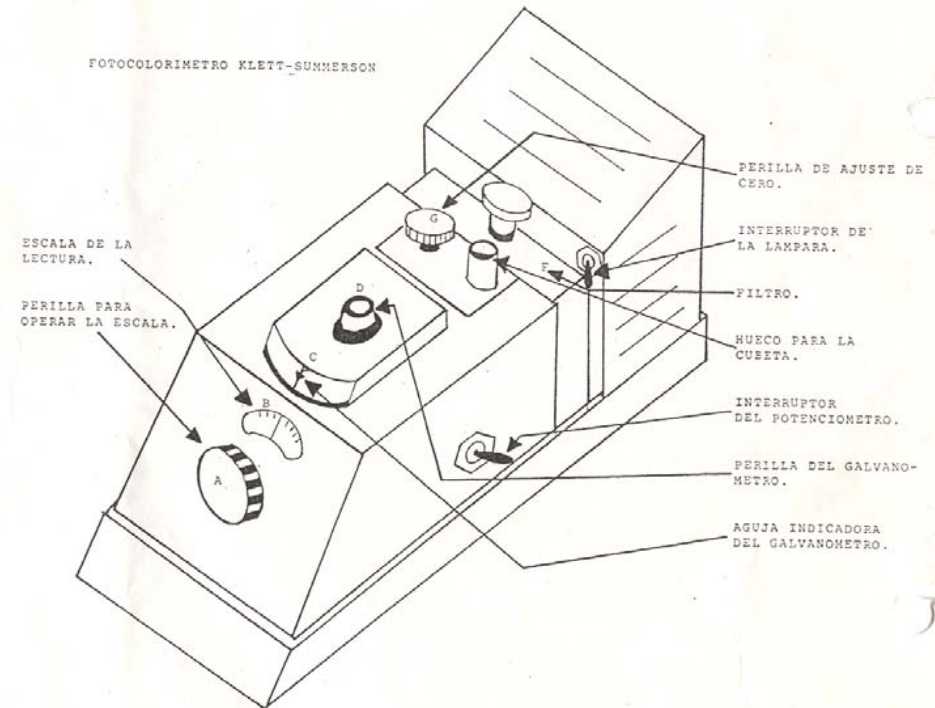
6. Determinar el tipo de inhibidor de acuerdo con las gráficas del punto anterior.

7. Analizar si los resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis planteada.

Instrucciones para la operación del fotocolorímetro Klett-Summerson

1. Antes de encender el fotocolorímetro cerciórese que el filtro (F) está en su sitio. La luz sin el filtro puede dañar la fotocelda.
2. Asegúrese que la aguja indicadora (C) está en cero. En caso contrario, ajústese a cero con la perilla (D) que sólo debe usarse cuando la lámpara del colorímetro esté apagada.
3. Encienda el foco con el interruptor de la derecha y deje que el instrumento se caliente hasta que se equilibre su operación. Cinco minutos son suficientes.
4. Ajuste la escala del potenciómetro (B) a cero usando la perilla (A).
5. Ponga una cubeta limpia llena con el blanco de reactivos en el hueco del instrumento en tal forma que la marca del tubo (ej. Pyrex) se sitúe directamente al frente. Es una buena práctica limpiar la superficie externa de la cubeta con un pañuelo desechable antes de cada lectura. Sólo deben usarse tubos seleccionados como "cubetas" para las determinaciones.
6. Por medio de la perilla (G) ajuste la lectura del galvanómetro a cero; esto es, la aguja (C) debe coincidir con el trazo central y, al mismo tiempo, con la escala (B) en cero.

7. Para leer las soluciones problema retire el “blanco” y ponga en el hueco del instrumento la cubeta con la solución problema. La aguja (C) se desviará de su posición en la línea de cero; por medio de la perilla (A) gírese la escala (B) hasta que la aguja (C) sea llevada exactamente a cero. La lectura de la escala (B) se anota y corresponde a la lectura del problema; léase únicamente hasta la marca más próxima. Cualquier intento de apreciar mayor exactitud es innecesario, pues la construcción del instrumento no proporciona una precisión mayor.
8. Continúe con la lectura de otros problemas y, de vez en cuando, compruebe el cero con el “blanco.”



Referencias

1. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
2. Lehninger AL, Nelson, DL. Principios de bioquímica. 4a. ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2005.
3. Mathews CK, van Holde KE. Bioquímica. 3a. ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2003.
4. Voet D, Voet JG, Pratt C. Fundamentals of biochemistry. USA: John Wiley and Sons; 1999.

Tubo No.	Concentración de sustrato μmol de glucosa inicial ml-1 ABCISAS (X)	Velocidad de la reacción unidades Klett 5 min-1 1/V ORDENADAS (Y)	Velocidad de la reacción con INHIBIDOR 1/V Unidades Klett 5 min-1 (Y)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Cuadro 5.2 Resultados

Tubo No.	Concentración de sustrato μmol de glucosa inicial ml-1 ABCISAS (1/X)	Velocidad de la reacción unidades Klett 5 min-1 ORDENADAS (1/Y)	Velocidad de la reacción con INHIBIDOR Unidades Klett 5 min -1
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Cuadro 5.3 Resultados (Inverso)

Práctica 4

Estudio del bombeo de protones por levaduras; efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones y de los desacoplantes.

Tiempo de práctica: 2 horas

Objetivos

1. Que el alumno relacione el consumo de glucosa con los cambios de pH producidos por las levaduras.
2. Que el alumno describa las vías por las cuales la glucosa genera los cambios de pH.
3. Que el alumno interprete el efecto de los inhibidores y los desacoplantes sobre la salida de protones.

Responda a las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son las fuentes de carbono que usa la levadura?
2. ¿Cuáles son las vías metabólicas que catabolizan a los carbohidratos?
3. ¿En qué consisten la glucólisis y la fosforilación oxidativa?
4. ¿Cuáles son los productos finales del catabolismo de los carbohidratos en las levaduras?

5. ¿Cuáles son los inhibidores de la cadena respiratoria de los sitios I, II y III? Describa su efecto sobre el consumo de O_2 y la síntesis del ATP.

6. ¿Cuál es el mecanismo por medio del cual los protonóforos desacoplan la fosforilación oxidativa? Describa su efecto sobre el consumo de O_2 y la síntesis del ATP.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son organismos unicelulares que se dividen por gemación. En común con otras células eucariontes, las levaduras tienen un núcleo □□en donde reside la información genética de la célula□, mitocondrias □en donde se lleva a cabo la síntesis de ATP□ y un retículo endoplásmico y aparato de Golgi que se encargan de la síntesis de proteínas cuya localización final es la membrana plasmática o el exterior.

A nivel de la membrana plasmática, las levaduras tienen una ATPasa de H^+ que acopla la hidrólisis del ATP con el bombeo de protones hacia afuera de la célula. Esta proteína es semejante desde un punto de vista estructural y funcional a la ATPasa de Na^+/K^+ de las células animales y, al igual que la bomba de sodio/potasio, se inhibe con concentraciones micromolares de vanadato. Como resultado de la actividad

de la ATPasa de H^+ en la levadura, se genera un gradiente electroquímico de protones que se utiliza para impulsar el transporte de nutrientes al interior de la célula, proceso catalizado por sistemas de transporte llamados simportadores o uniportadores. Para darse una idea de la importancia de esta enzima en la economía celular y en la energización de la membrana celular, basta decir que la ATPasa de H^+ consume hasta un 25 % del ATP que se sintetiza en la célula.

Además de esta ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, las levaduras tienen otra bomba de protones en la membrana interna de las mitocondrias, la ATP sintasa, que se encarga de la síntesis del ATP. En contraste con la enzima de membrana plasmática, el flujo de protones a través de la ATP sintasa induce la síntesis de ATP. Uno de los inhibidores más efectivos de esta enzima es la oligomicina.

Así, se puede proponer uno de los muchos ciclos en los que interviene el ATP en la levadura: por un lado, el ATP se sintetiza en la mitocondria por medio de la ATP sintasa, y a nivel de la membrana plasmática, la ATPasa de H^+ lo hidroliza para bombear protones al exterior de la célula. El factor común en ambos casos es un flujo de protones a través de la membrana.

Hipótesis

Si las levaduras consumen glucosa, se observará una disminución progresiva de su concentración en el medio de cultivo con el tiempo y cambios en el pH extracelular.

Material

- Tres vasos de precipitado de 100 ml.

- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Potenciómetro.
- Piceta para enjuagar el electrodo del potenciómetro.
- Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) 200 mg/ml.
- Solución de glucosa (10%) para una concentración final de 1%.
- Solución de dinitrofenol 40 mmol/l en etanol.
- Solución de azida de sodio 400 mmol/l.
- Agua destilada.

Método

Experimento 1 (control)

1. Diluir 5 ml de la levadura con 40 ml de agua destilada.
2. Determinar el pH de la solución y repetir la medición dos veces más con intervalos de 3 minutos para obtener la línea basal.
3. Adicionar 5 ml de glucosa a 10 %, agitar y medir el pH.
4. Determinar el pH de la solución cada 5 minutos 4 veces, y luego cada 10 minutos 2 veces más.

EXPERIMENTO 2 (DINITROFENOL)

1. Diluir 5 ml de la levadura con 40 ml de agua destilada.
2. Añadir por decantación (no pipetear) 0.2 ml de la solución de dinitrofenol 40 mmol/l, concentración final de 200 μ mol/l.
3. Determinar el pH de la solución y repetir la medición dos veces más con intervalos de 3 minutos para obtener la línea basal.
4. Esperar 5 minutos.
5. Repetir los pasos 3 y 4 del experimento control.

EXPERIMENTO 3 (AZIDA)

1. Diluir 5 ml de la levadura con 40 ml de agua destilada.
2. Añadir por decantación (no pipetear) 0.5 ml de la solución de azida de sodio 400 mmol/l, concentración final de 5 mmol/l. Agitar con cuidado.
3. Determinar el pH de la solución y repetir la medición dos veces más con intervalos de 3 minutos para obtener la línea basal.
4. Esperar 5 minutos.
5. Repetir los pasos 3 y 4 del experimento control.
6. Registrar sus datos en la siguiente tabla.

Tiempo (min)	Glucosa	pH	
		Dinitrofenol	Azida de sodio
0			
5			
10			
15			
20			
30			
40			

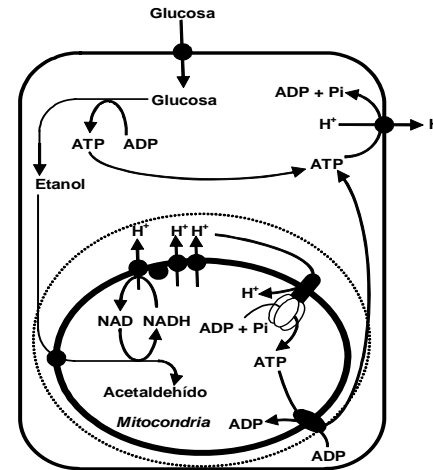
Análisis de resultados

1. Hacer una gráfica de cada uno de los experimentos; utilizar los valores de las lecturas de pH contra tiempo.
2. Analizar el significado de los cambios de pH en el experimento control, con dinitrofenol como desacoplante y con azida de sodio.

3. Hacer una relación de las vías que producen estos cambios; tomar en cuenta que las levaduras poseen una ATPasa de protones en la membrana mitocondrial que se encarga de sintetizar ATP y que tienen otra ATPasa de protones en la membrana plasmática cuya función es similar a la bomba de Na^+/K^+ en las células de los mamíferos (ver fig. 7.1).

Referencias

1. Peña A. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Arch Biochem Biophys. 1975; 167:397-409.
2. Pardo JP. La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de los hongos. Mensaje Bioquímico.



1990; 13: 119-172.

Práctica 5

Determinación de glucosa en sangre total

Tiempo de la práctica: 3 horas

Objetivos

1. Que el estudiante comprenda el metabolismo de la glucosa en sujetos sanos en diferentes condiciones.
2. Que el estudiante corrobore los cambios de glucosa e insulina durante la ingesta de alimentos.
3. Que el alumno sea capaz de interpretar y relacionar las mismas condiciones en ayuno.
4. Que el alumno sea capaz de ver las curvas de índice glicémico de diferentes monosacáridos.

Introducción

En el estado de postabsorción (ayuno) de los individuos normales, la relación insulina/glucagón sanguínea es baja, haciendo que el glucógeno muscular y hepático sea degradado como una fuente de glucosa. Un ayuno adicional resulta en la degradación de las proteínas a aminoácidos en el músculo esquelético, y en la lipólisis de los triacilglicéoles a ácidos grasos en el tejido adiposo. El aminoácido alanina y el glicerol son usados para sintetizar glucosa por medio de la

gluconeogénesis estimulada por glucagón. Además, los ácidos grasos libres pueden ser usados como combustible por el corazón, los músculos esqueléticos y el hígado.

Algunos minutos después de la ingesta de una comida, los niveles de insulina sanguínea aumentan. La glucosa y los aminoácidos de la dieta tales como la leucina, isoleucina y lisina, son estimulantes potentes de las células beta del páncreas haciendo que éstas segreguen insulina. La mayor parte de las células periféricas responden al aumento de la glucosa sanguínea con un aumento rápido del transporte de la glucosa dentro de las células. De esta manera, los niveles de glucosa sanguínea aumentan solamente de un 20% a un 40% en los individuos no-diabéticos. Sin embargo, aproximadamente el 80% de la entrada de glucosa no es insulino dependiente, ya que el cerebro, los glóbulos rojos, el hígado y los intestinos no requieren de insulina para la entrada creciente de glucosa cuando está presente glucosa sanguínea elevada. El músculo es el tejido dependiente de insulina más importante. Los niveles crecientes de insulina y glucosa sanguíneas inhiben la lipólisis así como a aproximadamente el 60% de la liberación normal de glucosa hepática.

Las concentraciones de glucosa en los niños menores de 5 años de edad son aproximadamente del 10 al 15% más baja que los niveles encontrados en los adultos. Los recién nacidos muestran concentraciones de glucosa desde 200 a 800 mg/l (1.11 a 4.44 mmol/l), aun cuando las concentraciones de

glucosa sanguínea en los infantes prematuros son menores. Las concentraciones de glucosa en los adultos saludables varían entre 700 a 1050 mg/l (3.9 a 5.8 mmol/l). Las concentraciones de glucosa del líquido cefalorraquídeo son aproximadamente del 40% al 80% de aquellos valores encontrados en el suero o en el plasma. Las concentraciones de glucosa en el suero son aproximadamente 15% más altas que las concentraciones de glucosa en la sangre total. Debe tomarse en cuenta que las concentraciones totales en la sangre varían con el hematocrito. La glucosa sanguínea total se aproxima muy marcadamente a la glucosa plasmática cuando el hematocrito es bajo. La diferencia del 15% entre la glucosa sanguínea total y la glucosa plasmática descrita arriba es para un valor del hematocrito de aproximadamente el 45%.

Referencias

- 1.-Kaplan LA, Pesce AJ. (2002). Química Clínica. Teoría, análisis y correlación. 3ª Edición. Ed. Pesce Kaplan Publicaciones, Capítulos: 32.
- 2.-NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-015-SSA2-1994, "Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria". Listado de Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud.
- 3.-MODIFICACIÓN a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Listado de Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud.
- 4.-Manual para el manejo de las insulinas 2001. 2ª Edición. Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica. SSA. México.

Determinación de glucosa.

Requisito para la práctica: ayuno de 8 horas

Podrá participar un integrante por equipo, de manera que en todo el grupo se puedan trabajar las diferentes condiciones.

Glucómetros One Touch Ultra.
Tiras reactivas One Touch Ultra [Glucosa Oxidasa (*Aspergillus niger*)].
Lancetas estériles.
Recipiente para material punzo cortante.
Recipiente para material biológico infeccioso
Jabón para manos.
Torundas de algodón con alcohol.

Sujetos con diferentes ingesta de carbohidratos:

- a).-15 gramos de glucosa. 1er Equipo
- b).-15 gramos de sacarosa. 2º Equipo
- c).-15 gramos de cereal. 3er Equipo

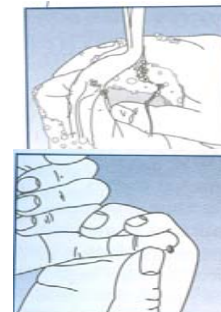
Método.

Determinación de glucosa.

1.-A cada uno de los sujetos se les determinará la concentración de glucosa en sangre total por medio de un glucómetro en los siguientes tiempos:
0 minutos (antes de ingerir la carga de los diferentes monosacáridos).
30 minutos, 60 minutos y 90 minutos, después de de ingerir los alimentos.
Para realizar la determinación de glucosa en sangre total seguir los siguientes pasos:

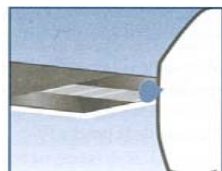
1.-Lave sus manos y limpie con una torunda de algodón con alcohol la zona donde se realizará la punción.

2.-Aplique un suave masaje a la punta de su

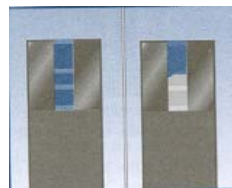


dedo que le ayudará a obtener una gota de sangre adecuada. No exprima en exceso el área de punción.

3.- Acerque y mantenga la gota de sangre en el canal estrecho del borde superior de la tira reactiva.

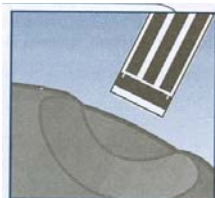


4.- a) Muestra adecuada
b).Muestra insuficiente

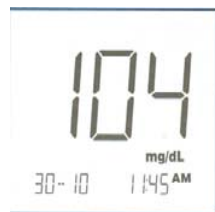


a b

5.- Inserte la tira reactiva en el puerto de análisis, con el extremo de las barras de contacto de primero y mirando hacia arriba. Empújela hasta que no avance más.



6.- Hasta que la ventana de confirmación este completamente llena de sangre, antes que el medidor comience la cuenta regresiva.



7.-Lectura: el resultado de la prueba de glucosa de su sangre aparecerá después de que el medidor cuente en forma regresiva de 5 a 1.

Anotar el resultado en la tabla correspondiente Tabla 5.1.

8.-Es importante desechar con mucho cuidado la lanceta usada luego de cada uso, con el fin de evitar que se produzcan lesiones accidentales con las puntas de las lancetas. Para el desecho de las lancetas siga los siguientes pasos:

9.-Deposite la lanceta en un recipiente para material punzo cortante.

10.-Deseche las tiras reactivas en una bolsa para material biológico-infeccioso junto con las torundas de algodón empleadas en la práctica.

11.-Con los datos obtenidos completar el cuadro 9.1 y hacer una gráfica de todas las variantes en papel milimétrico.

Cuadro 5.1 Resultados

Fecha: _____

Nombre:	
Edad:	Sexo:
Tiempo en (min.)	[Glucosa mg/dl]
0	
30	
60	
90	

Práctica 6

Determinación de colesterol y lipoproteínas plasmáticas

Tiempo de práctica: 2 horas

Objetivos

1. Recordar la estructura de los diferentes lípidos circulantes y sus funciones.
2. Describir las diferentes fuentes de colesterol, su función y la dinámica del colesterol plasmático.
3. Investigar el papel del colesterol y otros lípidos en el desarrollo de la aterosclerosis.
4. Describir la composición y la función de las lipoproteínas.
5. Describir los principios analíticos para la determinación del colesterol total, colesterol de HDL y de LDL, apolipoproteínas y triacilglicerol plasmáticos.
6. Calcular la concentración de colesterol de VLDL y de LDL a partir de las concentraciones de colesterol total, de colesterol de HDL y triacilglicerol.

INTRODUCCIÓN

Los dos lípidos de la sangre con un máximo interés en el diagnóstico clínico son el colesterol y los triacilglicerol (TAG); ambos se transportan en las lipoproteínas, que son partículas globulares de alto peso molecular con un núcleo formado por lípidos hidrofóbicos □TAG y ésteres de colesterol□, los cuales aportan la mayor parte de la masa de la partícula, y por una sola

capa superficial de moléculas de fosfolípidos, colesterol y proteínas o polipéptidos que rodean al núcleo y estabilizan la partícula para que permanezca en solución dentro del plasma. Las lipoproteínas principales que circulan en el plasma humano son los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

El colesterol es esencial para el crecimiento y la viabilidad de las células de los organismos superiores; sin embargo, los altos niveles de colesterol sérico son considerados como un importante factor de riesgo de enfermedad y muerte porque contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas. El colesterol se transporta en la sangre por tres diferentes lipoproteínas: LDL, HDL y VLDL. Los estudios epidemiológicos han establecido con claridad que mientras mayor sea el valor del colesterol-LDL mayor será el riesgo de enfermedad cardíaca aterosclerótica; por el contrario, mientras mayor sea la concentración del colesterol-HDL menor será el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. En otras palabras, las cifras elevadas de LDL son aterógenas, en tanto que las de HDL son protectoras, por lo que el cálculo del cociente colesterol-HDL/colesterol-LDL –que es normalmente de 0.34 ± 0.11 – constituye un índice de aterogenicidad.

En general, se cree que las lipoproteínas que contienen apoB 100 son potencialmente aterógenas.

ALTERACIONES DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y ATEROGENÉISIS

Desde el punto de vista clínico se ha atribuido a determinadas lipoproteínas el papel de factores esenciales directos en el desarrollo o en la prevención de ciertas enfermedades, principalmente de tipo vascular. Las anomalías en el transporte de lípidos ocurren básicamente en los sitios de producción o en los de utilización de las lipoproteínas del plasma y provocan varios tipos de hipo e hiperlipoproteinemias disminución o elevación de los niveles plasmáticos de lipoproteínas.

El análisis de las lipoproteínas plasmáticas tiene valor diagnóstico, ya que permite el reconocimiento de defectos primarios □ hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia familiares, deficiencia familiar de lipoproteína lipasa o apoproteína CII, etcétera □ y es de gran valor para describir la alteración lipoproteica subyacente a otro trastorno clínico, como la diabetes, la obesidad, la hepatitis, el hipotiroidismo, el consumo de alcohol, el uso de anticonceptivos orales.

Cabe destacar que la mayor parte de las hiperlipoproteinemias, aquellas que consisten en una elevación de la concentración de colesterol de LDL, de VLDL y de Lp(a), conllevan un alto riesgo de producir accidentes cardio y cerebrovasculares, necrosis o pérdida de la función en las extremidades, lo cual se debe a que el colesterol es el agente causal de la aterosclerosis subyacente en dichos padecimientos. De ahí el interés actual por el diagnóstico temprano y el tratamiento de estas hiperlipoproteinemias.

Se desconoce el mecanismo exacto por el cual la hipercolesterolemia conduce a la aterosclerosis. Sin embargo, se cree que al alterarse la relación colesterol/fosfolípido que lleva

consigo un incremento en la viscosidad y maleabilidad de las membranas se inducen cambios en el endotelio y en los monocitos con un aumento en su migración y adherencia probablemente la primera anomalía celular de la aterosclerosis.

Según la hipótesis de respuesta a la lesión, la más aceptada sobre la patogénesis de la aterosclerosis, cualquier lesión en el endotelio o músculo liso de la pared vascular que puede ser causada por la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, el estrés mecánico de la hipertensión arterial, agresiones químicas como el tabaquismo, etcétera altera la relación existente entre el endotelio vascular, las células del músculo liso, los monocitos, los macrófagos, las plaquetas y los componentes de la sangre circulante, en particular los lípidos, y genera una respuesta inflamatoria fibroproliferativa, con la participación de un gran número de factores de crecimiento, citocinas y moléculas vasorreguladoras, que dan origen a las placas ateroscleróticas.

Por otro lado, se ha observado que las partículas LDL oxidadas por los macrófagos lo cual ocurre normalmente causan lesión al endotelio, lo que puede ser, de manera particular, aterógeno. La formación de anticuerpos contra LDL oxidadas también puede ser importante en la formación de la placa. Por tanto, hay un interés clínico cada vez mayor en la función de los antioxidantes, como las vitaminas C, E y el β-caroteno. Los estrógenos también pueden actuar como antioxidantes en la prevención de aterosclerosis. Inclusive, se ha visto que las lipoproteínas HDL tienen efectos antioxidantes *in vitro*.

Tradicionalmente, las anomalías de los lípidos sanguíneos se han valorado con un examen global de colesterol y TAG. En la actualidad estos datos son insuficientes para valorar

correctamente una hiperlipemia, por lo que se deben investigar también las diferentes fracciones lipoproteicas.

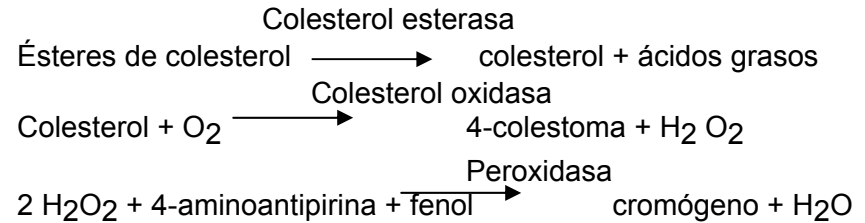
FUNDAMENTO DE LAS DETERMINACIONES

La evaluación de pacientes en los que se sospecha alguna alteración en los lípidos plasmáticos puede incluir la medición de colesterol total y TAG y de una o más lipoproteínas. Además, la cuantificación de Lp(a), apoA1 y apoB, o la actividad de la lipoproteína lipasa u otras enzimas, está siendo ampliamente valorada para incluirla como procedimiento clínico de rutina.

Determinación del colesterol total. El colesterol total es igual a la suma del colesterol contenido en las tres lipoproteínas que lo transportan:

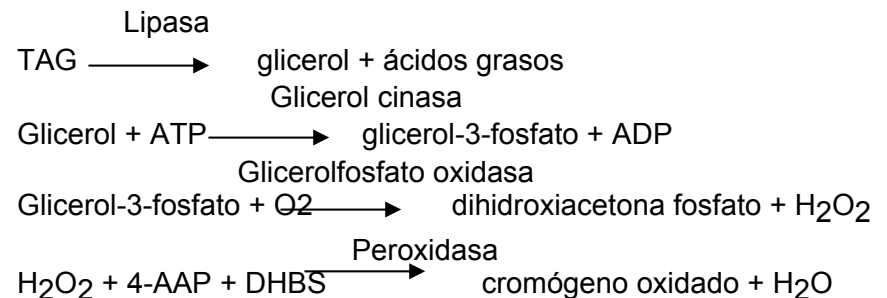
Colesterol total = colesterol VLDL + colesterol HDL + colesterol LDL

Además, el colesterol existe en el organismo en dos fracciones: una en estado libre y otra esterificado –60 a 75%–, por lo que, para la determinación del colesterol total, se utiliza una serie de reacciones enzimáticas en donde, en una primera reacción, los ésteres se hidrolizan dejando libre el grupo 3-OH del colesterol. En la segunda reacción este grupo se oxida y se obtiene, como un producto, el peróxido de hidrógeno, el cual, por efecto de la peroxidasa, transfiere uno de sus oxígenos a un aceptor cromógeno. La absorbencia del cromógeno 4-benzoquinona-monoimino-fenazona) se determina a 520 nm y es proporcional a la concentración de colesterol. La reacción global es la siguiente:



Determinación de triacilglicerol. El método utilizado se basa en la hidrólisis de los TAG por una lipasa y la determinación del glicerol liberado en la reacción. Para ello, el glicerol es fosforilado por la glicerol cinasa formando glicerol-3-fosfato, el cual se oxida por la glicerolfosfato oxidasa a dihidroxiacetona fosfato generando en la reacción peróxido de hidrógeno. La peroxidasa cataliza la transferencia de oxígeno del peróxido a un aceptor que es cromógeno, como la 4-aminoantipirina (4-AAP) y el 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfonato (DHBS), que se colorean al oxidarse. La absorbencia del cromógeno oxidado a 520 nm es proporcional a la concentración de TAG.

La reacción completa se expresa:



Determinación de colesterol-HDL. Por regla general, el análisis de las lipoproteínas del plasma requiere, primero, la

separación de las clases de lipoproteínas y, segundo, la medición de la lipoproteína o del componente lipoproteico de interés.

La determinación es relativamente simple si se precipitan todas las lipoproteínas que contienen apoB100 –VLDL, IDL, LDL y Lp(a)– a excepción de las HDL con un polianión, generalmente glucosaminoglicanos con carga negativa –heparina, dextran o fosfotungsteno– y un catión bivalente–por lo común, Mn^{2+} o Mg^{2+} y se determina el colesterol-HDL que queda en solución por el método descrito para el colesterol total.

La relación colesterol total/colesterol-HDL se considera como un indicador de riesgo coronario. Normalmente esta relación es menor de cinco; mientras menor sea el valor, mejor será el pronóstico para el paciente.

Determinación de colesterol-VLDL. En general, la concentración de TAG en el plasma sanguíneo proporciona un parámetro excelente de la concentración de las lipoproteínas ricas en TAG como las VLDL. Esta apreciación parte de que en condiciones normales de ayuno no se encuentran quilomicrones en el plasma y la proporción TAG/colesterol de la VLDL es invariable –de 5:1 en mg/dl o de 2.2:1 en mmol/l–, de tal modo que la cuantificación de la concentración de TAG es suficiente para calcular la concentración de la VLDL con un porcentaje de error pequeño en la estimación. Si la concentración de colesterol-VLDL es la quinta parte de la concentración de TAG cuando ésta se expresa en mg/dl, entonces:

$$\text{Colesterol- VLDL} = \frac{\text{TAG}}{5}$$

o si las concentraciones se expresan en mmol/l:

$$\text{TAG}$$

$$\text{Colesterol- VLDL} = \frac{\text{TAG}}{2.2}$$

Esta fórmula no es apropiada para muestras con una concentración de TAG mayor a 400 mg/dl (10.390 mmol/l) o en muestras que tengan quilomicrones.

Determinación del colesterol LDL. Aproximadamente las dos terceras partes del colesterol plasmático total son transportadas en las LDL de tal manera que, la concentración de este lípido proporciona una medida bastante precisa del nivel de LDL en la mayoría de las personas. Por ello es posible estimar con bastante exactitud, en casi todos los casos, la concentración de LDL sobre la base del conocimiento de la concentración de VLDL (estimada por los TAG) y la del colesterol total. No obstante, para estimar con mayor exactitud la concentración de LDL debe cuantificarse la concentración de colesterol de las HDL, lo cual es relativamente simple. Las LDL se estiman como sigue:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol-total} - (\text{colesterol-HDL} + \text{colesterol-VLDL})$$

Si se determina la concentración de lípidos en moles en lugar de en peso y se sustituye el valor estimado de VLDL a partir de la concentración de TAG, la fórmula equivalente se transforma en la expresión descrita por Friedewald (1972):

$$\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - (\text{colesterol HDL} + \text{TAG}/2.2)$$

Otra forma sencilla de determinación indirecta del colesterol-LDL es el método del polivinilsulfato (PVS). El PVS provoca la precipitación de las LDL y deja en el sobrenadante las VLDL y las HDL. El valor del colesterol-LDL se calcula restando

al valor del colesterol total (colesterol en VLDL, LDL y HDL) el valor del colesterol en el sobrenadante de la precipitación (colesterol en VLDL y HDL).

Colesterol LDL = colesterol total – colesterol en el sobrenadante (colesterol-HDL y colesterol-VLDL)

La determinación de LDL se puede hacer directamente mediante procesos inmunoquímicos que requieren una especial destreza y un equipamiento específico, por lo que resulta de difícil adaptación a fines académicos. La técnica consiste en hacer reaccionar esferas de látex revestidas con anticuerpos contra apolipoproteínas de las LDL. Estas partículas se separan del resto y se determina el colesterol.

Quilomicrones. Cuando existen quilomicrones pueden ser detectados si se deja el tubo de ensayo que contiene el plasma sanguíneo en el refrigerador durante una noche. Los quilomicrones de mayor tamaño, pero no las VLDL, se ubicarán en la superficie del tubo formando una capa cremosa que puede detectarse visualmente. La presencia de quilomicrones en el plasma en ayunas se considera anormal.

Determinación de Lp(a). La Lp(a) se determina directamente por métodos inmunoquímicos al igual que las LDL y, como ya se dijo, su concentración constituye un factor independiente de riesgo coronario. Normalmente la Lp(a) se precipita junto con las lipoproteínas que contienen apoB, por lo que la medición del colesterol de la LDL incluye la contribución de colesterol de la Lp(a).

Determinación de apoAI y apoB. La determinación de apolipoproteínas, particularmente la apoA y la apoB, es un dato complementario para la cuantificación de otros componentes

lipoproteicos y ayuda a evaluar si un individuo tiene un riesgo aumentado de cardiopatía coronaria, sobre todo en los estados hiperlipidémicos donde hay un aumento de TAG en los quilomicrones o en las VLDL, y cuando las LDL y HDL contienen menos cantidad de ésteres de colesterol y más TAG en su núcleo debido al intercambio de los componentes de éstos entre las lipoproteínas. En tales circunstancias, la cuantificación de las apoproteínas proporciona cálculos más seguros y útiles de la concentración de partículas lipoproteicas.

La mayoría de los métodos de cuantificación, todos los cuales requieren un equipamiento especial, se basan en la identificación inmunológica de las apolipoproteínas. La técnica más usada es el inmunoanálisis ligado a enzimas y de fluorescencia (ELISA).

Material

- Gradilla con 8 tubos de ensayo.
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Pipetas automáticas
- Puntas para pipetas automáticas
- Solución de enzimas para colesterol: amortiguador Tris 100 mmol/l, pH 7.7; MgCl₂ 50 mmol/l, 4-amino-antipirina 1 mmol/l, fenol 6 mmol/l; colesterol esterasa \geq 160 U/l, colesterol oxidasa \geq 100 U/l y peroxidasa \geq 2 000 U/l.
- Patrón de colesterol de 170 ó de 200 mg/dl (5.17 mmol/l) –para colesterol total.
- Solución de enzimas para TAG: amortiguador Tris 100 mmol/l, pH 6.7, ATP 0.7 mmol/l, MgCl₂ 4 mmol/l, 4-aminoantipirina 0.4 mmol/l, 3,5-dicloro-2-hidroxibencen-sulfonato 0.8 mmol/l, lipasa \geq 1 000

U/l; glicerol cinasa ≥ 1000 U/l, glicerol fosfato oxidasa 4000 U/l y peroxidasa ≥ 2000 U/l.

•Patrón de TAG (trioleína) de 250 mg/dl (2.8 mmol/l) o de 100 mg/dl.

•Reactivo precipitante para HDL: sulfato de dextrán 10g/l, $MgCl_2$ 0.5 mol/l.

•Espectrofotómetro a 520 y 540 nm.

•Jeringa, ligadura y torundas con alcohol.

•Gotero con anticoagulante.

Método

1.-Obtener plasma de un voluntario. El plasma posprandial contiene quilomicrones, lo que puede aumentar marcadamente la concentración plasmática de TAG, por ello es importante permanecer en ayunas durante 12 horas antes de la punción venosa. La estabilidad del plasma es de 3 días a 4^o C.

Proceder a determinar colesterol total, TAG y colesterol-HDL como se describe a continuación:

2.- A 50 μ l ml de plasma agregarle 20 μ l de la solución precipitante –de VLDL y LDL– para determinación de colesterol-HDL; mezclar perfectamente y dejar reposar 10 minutos. Centrifugar 10 minutos a 3 000 rpm. El sobrenadante libre de lipoproteínas, excepto HDL que continúa siendo soluble, será utilizado para determinar el colesterol.

3.-Para la determinación de colesterol total y colesterol-HDL preparar la siguiente serie de tubos:

Preparación de los tubos (volumen en ml)

Tubo	1	2	3	4
Estándar de colesterol	-	10 μ l	-	-
Plasma	-	-	10 μ l	-
Sobrenadante con HDL	-	-	-	20 μ l

Agregar a todos los tubos 1 ml de solución de enzimas para colesterol. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

4.-Leer la absorbancia (A) en el espectrofotómetro a 520 nm; calibrar a cero con el blanco.

Para determinar los TAG preparar la siguiente serie de tubos:

Preparación de los tubos (volumen en ml).

Tubo	1	2	3
Blanco	-	-	-
Estándar de TAG	-	10 μ l	-
Plasma	-	-	10 μ l

Agregar a todos los tubos 1 ml de solución de enzimas para TAG.

Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

5. Leer la absorbancia (A) en el espectrofotómetro a 520 nm; calibrar a cero con el blanco.

Resultados

1. De acuerdo al estándar de colesterol, calcular la concentración de colesterol correspondiente a los tubos 3 y 4 (tubos que contienen el plasma y el sobrenadante) de la siguiente manera:

$$[\text{Colesterol}] = \frac{C_s}{A_s} \times A_p$$

C_s = Concentración del estándar en mg/dl o mmol/l.

3.-Compare sus resultados con los valores normales del colesterol total, del colesterol-HDL y de los triacilglicéridos en el plasma.

4.-Calcular la concentración de colesterol VLDL por la fórmula: colesterol-VLDL= TAG/5.

5.-Calcular la concentración de colesterol LDL a partir de las concentraciones de colesterol total, HDL y VLDL.

6.-Estimar el cociente colesterol-HDL/colesterol-LDL y de colesterol total/colesterol-HDL (índices aterogénicos).

7.- Analizar el significado de los datos obtenidos y hacer un informe de los resultados y de las conclusiones que de éstos se deriven.

8. - A continuación se resumen dos casos clínicos:

En enero de 1997, un hombre de 38 años asistió a una evaluación médica. Pesó 93 kg, tenía presión arterial alta – 160/108–, realizaba poco ejercicio, tomaba de 5 a 10 cervezas y fumaba 2 a 3 cajetillas de cigarros a la semana. El peso y las

A_s = Absorbancia del estándar.
 A_p = Absorbancia del problema.

2. Calcular la concentración de TAG de la siguiente manera:

$$[\text{Triacilgliceroles}] = \frac{C_s}{A_s} \times A_p$$

C_s = Concentración del estándar en mg/dl o mmol/l.

A_s = Absorbancia del estándar.

A_p = Absorbancia del problema.

concentraciones de los lípidos durante los meses siguientes están resumidos en la tabla siguiente:

	Ene 97	Oct 97	Feb 98
Peso (Kg)	93	90	95
Colesterol total mg/dl	275	295	320
TAG mg/dl	490	470	550
HDL mg/dl	35	33	29
LDL directa mg/dl	-	-	259
Colesterol total/colesterol-HDL (índice aterógeno)	-	-	-

B) Una mujer de 23 años de edad solicita una determinación de lípidos debido al antecedente familiar importante de cardiopatía. La paciente no fuma y pesa 55 kg. Los resultados de la determinación de los lípidos iniciales después de un año y tres meses de haber iniciado la administración de anticonceptivos orales –desogestrel–, son los siguientes:

	Ene 97	Ene 98	Abr 98
Peso (kg)	55	56	58
Colesterol total mg/dl	285	263	315
TAG mg/dl	85	90	124
HDL mg/dl	40	37	44
Colesterol-VLDL			
LDL mg/dl			
Colesterol total/coolesterol-HDL (índice aterógeno)			

- Completar los datos que hacen falta en los cuadros anteriores (tomar en cuenta que no puede hacerse el cálculo de la concentración de VLDL si los TAG son mayores de 400 mg/dl).
- Constatar la evolución temporal de los niveles de colesterol y TAG.
- Detectar la presencia de hábitos de alto riesgo y hacer notar la importancia de las modificaciones en esos hábitos.
- Al ser iguales todos los factores de riesgo para ambas personas: ¿cuál tendría mayor riesgo de enfermedad coronaria?

- Detectar cómo dos personas con el mismo colesterol total tienen perfiles lipídicos distintos.

TRABAJOS CONSULTADOS

1. Allain CA, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974; 20: 470-475.
2. Montgomery R. Bioquímica. Casos y texto. 6a.ed. Barcelona: Editorial Harcourt-Brace; 1998: 332-389.
3. Pennachio D. Lineamientos para la detección de hipercolesterolemia. Atención Médica. 1997; 10/2: 30-43.
4. Alba Zayas EL, Pereira RG, Aguilar BA. Lipoproteína (a):estructura, metabolismo, genética y mecanismos patogénicos. Rev Cubana Invest Biomed. 2003; 22(1): 32-40.
5. Masa-aki K, Rader JD. Gene therapy for lipid disorders. Curr Control Trials Cardiovasc Med. 2000; 1:120-127
6. Russet G.W. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of HDL cholesterol. Clin Chem. 1982; 28(6): 1379-88.
7. Samaniego V, López D. Lípidos. Sinopsis del informe del panel de expertos sobre niveles de colesterol sanguíneo en niños y adolescentes. Aterosclerosis. 1999; 2(1): 22-24
8. Vogel AA. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis. Clin Cardiol. 1997; 20:426-432.
9. Velázquez CA. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la arterioesclerosis. IATREIA. 2000; 13 (3) septiembre
10. Mohammed HM, Frohlich J. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. Am J Med. 1999; 107: 588-592

Práctica 7

Integración Metabólica

Tiempo de práctica: 3 horas

Objetivos

- 1.-Que el alumno pueda integrar las vías metabólicas de los carbohidratos, de los lípidos y proteínas en (condiciones normales) en un paciente sano.
- 2.-Que el alumno reconozca los sitios denominados encrucijadas metabólicas y las enzimas de las vías reguladoras.
- 3.-Que el alumno pueda correlacionar el papel que tienen las hormonas en la regulación de las vías.
- 4.-Que el alumno sea capaz de analizar los datos de las pruebas clínicas en un sujeto normal.
- 5.-Que el alumno relacione que vías se encuentran alteradas en un paciente diabético.

Los alimentos que ingerimos deben estar constituidos por los 6 componentes básicos que son proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y agua, la cantidad que se requiere ingerir de cada uno de los componentes varía de acuerdo a la constitución y la actividad física que se realiza, tanto la falta como en el exceso de consumo de alguno de los componentes básicos conlleva a diversos trastornos metabólicos.

Aproximadamente del 40 al 45% de nuestra ingesta calórica proviene del consumo diario de carbohidratos complejos los cuales al ser digeridos dan lugar a los diferentes monosacáridos entre los que se encuentra la glucosa, la cuál se distribuye por la sangre a las células para poder captar la glucosa, siendo la principal fuente de energía. Algunos tipos celulares son dependientes de la liberación de insulina por el páncreas como es el caso de las células musculares. Si la insulina no funciona adecuadamente, la glucosa se queda en el flujo sanguíneo causando elevación de los niveles de glucosa en la sangre y a esto se le denomina hiperglucemia; una de las enfermedades que se caracteriza por la hiperglucemia en sus primeras etapas es la diabetes mellitus. La diabetes mellitus esta caracterizada por una hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada a lesiones, disfunción y fallo de varios órganos, especialmente de los ojos, los riñones, el corazón y los vasos sanguíneos.

Varios procesos patogénicos están implicados en el desarrollo de la diabetes. Estos van desde una destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas, con la consiguiente deficiencia de insulina, hasta anomalías, en las que el páncreas no produce suficiente insulina o la que produce no es eficiente. La acción deficiente de la insulina en

los tejidos diana es la responsable del metabolismo anómalo de los carbohidratos de carbono, grasas y proteínas en la diabetes.

La acción deficiente de la insulina ocasiona una respuesta inadecuada en uno o más puntos de la compleja trama metabólica en la que esta hormona tiene papel regulatorio.

Frecuentemente coexisten en el mismo paciente una inadecuada secreción de insulina así como defectos de la acción de ésta, en la actualidad no se sabe si una de estas anomalías es la consecuencia o la causa de la otra. En cualquier caso, el resultado es la hiperglucemia.

La gran mayoría de los casos de diabetes pueden incluirse en dos amplias categorías etiopatogénicas. En el primer caso (diabetes de tipo I) la causa es una deficiencia absoluta en la secreción de insulina. Los individuos con alto riesgo de desarrollar este tipo de diabetes pueden ser a menudo identificados mediante evidencias serológicas de un proceso autoinmune que se produce en los islotes pancreáticos y también mediante marcadores genéticos. En la segunda categoría (diabetes de tipo II), mucho más prevalente, la causa es una combinación de una resistencia a la acción de la insulina y de una inadecuada respuesta secretora compensadora. La diabetes tipo II se caracteriza por estar presente muchos años antes de ser detectada una hiperglucemia sin síntomas clínicos (sed, pérdida de peso), pero suficiente para ocasionar cambios patológicos y funcionales sobre los órganos blanco. Durante este período asintomático, es posible demostrar trastornos en el metabolismo de los carbohidratos midiendo la glucosa plasmática en ayunas o después de una sobrecarga de glucosa por vía oral.

El exceso en la ingesta de carbohidratos no solamente mantiene la reserva de energía en forma de glucógeno sino que también el exceso de carbohidratos es convertido en triacilgliceroles. En el hígado los triacilgliceroles se sintetizan a partir de acil CoA y glicerol 3-fosfato siendo empaquetados con apoproteínas y en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), secretados al torrente sanguíneo siendo almacenados en tejido adiposo. Para su consumo los triacilgliceroles son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos. En la dieta es importante la presencia de lípidos ya que son precursores de diferentes componentes de la célula como los fosfolípidos, uno de los lípidos que tiene una gran importancia en la célula es el colesterol, ya que proporciona rigidez a las membranas celulares y es precursor de las sales biliares así como de hormonas esteroideas. El colesterol se puede obtener por la alimentación y por síntesis del propio organismo, siendo las células hepáticas y las suprarrenales las de mayor síntesis. Para llevar a cabo la síntesis de colesterol se requiere la presencia de acetil-CoA el cual proviene de la degradación de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos por lo cual se denomina a la acetil-CoA la encrucijada metabólica.

El colesterol es insoluble en agua por lo que transportado en la sangre por tres lipoproteínas que son de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL). Los niveles normales de colesterol total en sangre en un adulto son de < 200 mg/dl y cuando estos valores se ven aumentados se asocian a la formación de placas ateroscleróticas que pueden ocluir los vasos sanguíneos y como consecuencia provocar infarto al miocardio y alteraciones cardiovasculares.

La cuantificación de las LDL representa un papel clave en la esclerosis coronaria ya que concentraciones elevadas indican desarrollo de la aterosclerosis.

En el caso de las HDL al disminuir su concentración aumenta el riesgo de desarrollar aterosclerosis.

Las proteínas constituyen la fuente primaria del metabolismo del nitrógeno en el organismo,

Los aminoácidos producto de la digestión de las proteínas que se consumen en los alimentos, son utilizados para la síntesis de proteínas y de compuestos nitrogenados o se puede oxidar para producir energía.

El hígado es el órgano principal en donde se realiza la oxidación de los aminoácidos. El nitrógeno de los aminoácidos forma amoníaco el cual es tóxico para el organismo. El amoníaco y los grupos amino se convierten en urea en el hígado, que no es tóxica y se elimina fácilmente por la orina ya que es hidrosoluble.

Otro de los componentes del metabolismo nitrogenado son los nucleótidos. Las purinas y las pirimidinas, que son esenciales para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Los nucleótidos son precursores del DNA y el RNA, así como también forman parte de la estructura de muchas coenzimas además de ser componentes del metabolismo energético.

La degradación de las purinas no genera energía y el producto de la degradación del anillo purínico es el ácido úrico, que se elimina por la orina, tiene una solubilidad limitada por lo que su exceso da como resultado la formación de cristales en regiones del organismo como pueden ser los dedos gordos del pie, trastorno que se conoce como gota.

Los valores elevados de ácido úrico se presentan en: ingestión de alimentos ricos en nucleoproteínas, insuficiencia renal, azoemias prerrenales.

Otro de los componentes del metabolismo nitrogenado es la creatinina que en el músculo en su forma fosforilada sirve como almacén de alta energía y se transforma con facilidad en ATP por la enzima creatina fosfoquinasa. La creatina fosfato es inestable y se cicla espontáneamente forma la creatinina que se elimina en la orina. La producción de creatinina es proporcional a la masa muscular corporal. La cantidad de creatinina que se elimina diariamente puede utilizarse como indicador de la normalidad de la función renal

Determinación de glucosa

Glucómetros One Touch Ultra.

Tiras reactivas One Touch Ultra [Glucosa oxidasa (*Aspergillus niger*)].

Lancetas estériles

Recipiente para material punzo cortante.

Recipiente para material biológico-infeccioso.

Jabón para manos.

Torundas de algodón con alcohol.

Determinación de colesterol y triacilglicerolos.

Dichas determinaciones solo se realizaran al tiempo 0 y a los 120 minutos.

Accutrend Roche para determinación de colesterol y triacilglicerolos.

Tiras reactivas para determinación de colesterol.

Tiras reactivas para determinación de triacilglicerolos.

Lancetas estériles

Las determinaciones de urea, creatinina y ácido úrico, se realizaran en orina.

Las muestras de orina se realizaran solo al tiempo 0 y a los 120 minutos.

La muestra de orina deberá ser del alumno a quien se le haya determinado glucosa, colesterol y triacilgliceroles para poder discutir todos los valores en conjunto y poder enlazar en un mismo individuo el efecto que tiene la dieta sobre el metabolismo.

Determinación de urea

Pipetas automáticas (10 a 200 μ l)

Puntas para micropipetas

Propipetas.

Reactivo para determinación de urea.

Estándar de urea (50 mg/dl).

Espectrofotómetro.

Celdas.

Agua destilada.

Determinación de ácido úrico

Pipetas de 5 ml.

Gradilla con 2 tubos de ensaye

Reactivo para ácido úrico

Estándar de ácido úrico (6 mg/dl)

Determinación de creatinina

Reactivo para determinación de creatinina

Estándar de creatinina (2 mg/dl).

Espectrofotómetro.

Celdas.

Método

Determinación de glucosa

Podrá participar un integrante por equipo, de manera que en todo el grupo se puedan trabajar las diferentes condiciones.

1.- Dos sujetos, uno de los cuales consumirá una dieta rica en carbohidratos y el otro una dieta rica en proteínas.

2.- A cada uno de los sujetos se les determinará la concentración de glucosa en sangre total por medio de un glucómetro en los siguientes tiempos:

0 minutos (antes de ingerir los alimentos).

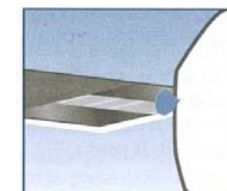
30 minutos, 60 minutos y 120 minutos, después de ingerir los alimentos.

Para realizar la determinación de glucosa en sangre total seguir los siguientes pasos:

1.- Lave sus manos y limpie con una torunda de algodón con alcohol la zona donde se realizará la punción.



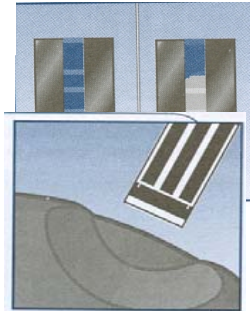
2.- Aplique un suave masaje a la punta de su dedo que le ayudará a obtener una gota de sangre adecuada. No exprima en exceso el área de punción.



3.-Acerque y mantenga la gota de sangre en el canal estrecho del borde superior de la tira reactiva.

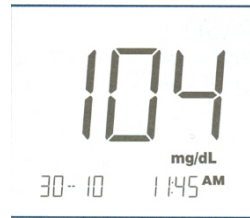
- 4 a) Muestra adecuada
- b) Muestra insuficiente

a b



5.- Inserte la tira reactiva en el puerto de análisis, con el extremo de las barras de contacto de primero y mirando hacia arriba. Empújela hasta que no avance más.

6.- Hasta que la ventana de confirmación este completamente llena de sangre, antes que el medidor comience la cuenta regresiva.



7.-Lectura el resultado de la prueba de glucosa de su sangre aparecerá después de que el medidor cuente en forma regresiva de 5 a 1.

Anotar el resultado en la tabla correspondiente
Tabla 7.1

8.-Es importante desechar con mucho cuidado la lanceta usada luego de cada uso, con el fin de evitar que se produzcan lesiones accidentales con las puntas de la lancetas.

Para el desecho de las lancetas siga los siguientes pasos:

9.-Deposite la lanceta en un recipiente para material punzo cortante.

10- Deseche las tiras reactivas en una bolsa para material biológico-infeccioso junto con las torundas de algodón empleadas en la práctica.

11.-Con los datos obtenidos completar el cuadro 10.1 y hacer una gráfica de todas las variantes en papel milimétrico.

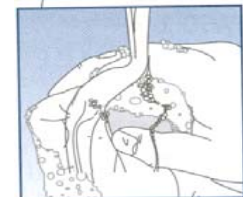
Cuadro 7.1 Resultados

Fecha: _____

Nombre:	
Edad:	Sexo:
Tiempo (min.)	[Glucosa mg/dl]
0	
30	
60	
120	

Determinación de colesterol y triacilgliceroles

1.-Lavarse las manos cuidadosamente esto es con la finalidad de retirar residuos de crema o grasa en las manos para evitar determinaciones erróneas principalmente cuando se realiza la determinación de triacilgliceroles.



2.- Con la ayuda de unas pinzas extraer una tira reactiva del envase y taparlo inmediatamente para evitar que las tiras se sequen.

3.-Con la tapa cerrada inserte en la ranura, en la dirección indicada por la flecha, la tira reactiva con el cuadrado amarillo hacia arriba hasta que encaje y deje verse la marca TG o CHOL impresa en la tira reactiva.



4.-Frote y masajee la yema del dedo para facilitar la extracción y aplicación de la sangre.



5.-Con la lanceta introduzca para hacer la punción y realice la toma de muestra.

6.-Aplicar directamente la gota de sangre a la tira reactiva



7.-Abrir la tapa y colocar la tira reactiva con la muestra de sangre



8.-Bajar la tapa



9.-Realice la lectura de la concentración de colesterol y triacilgliceroles según sea el caso.



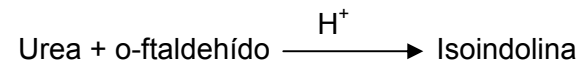
NOTA: Tener cuidado al realizar la determinación, ya que solo cuentan con una tira reactiva para cada prueba.

8.-Anote la lectura.

Para las determinaciones de Urea, creatinina y ácido úrico que se realizan en muestra de orina, estas determinaciones son al tiempo cero y a los 120 minutos.

Determinación de urea en orina

La urea presente en la muestra reacciona con el o-ftaldehído en medio ácido originando un complejo coloreado puede identificarse espectrofotométricamente.



La urea es estable 5 días a 2-8 °C.

1.-Para la determinación de urea en orina, tomar la muestra como se esquematiza en el cuadro.

Celda	1	2
Muestra	10 µl	--
Estándar	--	10 µl
Solución reactiva para urea	1 ml	1 ml

La determinación se realiza en tubos de ensaye Estándar de urea (50 mg/dl). Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

Leer la absorbancia (A) en el espectrofotómetro frente a blanco de reactivos a 520 mn.

El resultado se obtiene en mg/dl.

Determinación de creatinina en orina

1.-Para la determinación de creatinina en orina, tomar la muestra como se esquematiza en el cuadro.

Celda	1	2
Orina	100 µl	-
Estándar	-	100 µl
Solución reactiva de creatinina	1 ml	1 ml

La determinación se realiza en tubos de ensaye Estándar de urea (50 mg/dl). Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

Leer la absorbancia (A) en el espectrofotómetro frente a blanco de reactivos a 520 mn.

El resultado se obtiene en mg/dl.

Estándar de creatinina (2 mg/dl).

La determinación se realiza directamente en las celdas con la finalidad de tomar la lectura de las absorbancias exactamente a los 30 (A₁) y a los 90 (A₂) segundos.

Mezclar y poner en marcha el cronómetro, anotar las absorbancias a los 30 (A₁) y a los 90 (A₂) segundos.

Leer frente blanco de reactivos en el espectrofotómetro a 492 nm.

Calcular el incremento de la absorbancia $\Delta A = A_2 - A_1$.

Con las diferencias de absorbancias anotadas ΔA , aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Estándar}} \times [\text{Estándar}] = [\text{Creatinina}]$$

ΔA Estándar

El resultado se obtiene en mg/dl.

Determinación de ácido úrico en orina

1.-Para la determinación de ácido úrico en orina, tomar la muestra como se esquematiza en el cuadro.

La determinación se realiza en tubos de ensaye.
Estándar de ácido úrico (6 mg/dl)

Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
Leer la absorbancia (A) en el espectrofotómetro frente a blanco de reactivos a 520 mn.
Cálculo de la concentración de ácido úrico.

$\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Estándar}} \times [\text{Estándar}] = [\text{Ácido úrico}]$

El resultado se obtiene en mg/dl.

Referencias

- 1.-Koolman J, Roehm KH (2004). Bioquímica *Texto y Atlas*: 3ª Edición, Ed. Médica Panamericana, pp.: 158, 308-310
- 2.-Smith, C; Marks, A. D. & Lieberman, M. (2005). Marks' Basic Medical Biochemistry. 2ª Edición. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Pag. 24-26
- 3.-Kaplan LA, Pesce AJ. (2002). Química Clínica. Teoría, análisis y correlación. 3ª Edición. Ed. Pesce Kaplan Publicaciones, Capítulo: 32.
- 4.- NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-015-SSA2-1994, "Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria". Listado de Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud.

5.-MODIFICACIÓN a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Listado de Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud.

6.- Manual para el manejo de las insulinas 2001. 2ª Edición. Subsecretaría de Prevención y Protección de la Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica. SSA. México.

7.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Listado de Normas Oficiales Mexicanas de la Secretaría de Salud.

Tubo	1	2
Orina	100 µl	-
Estándar	-	100 µl
Solución reactiva de ácido úrico	1 ml	1 ml

Práctica 8

Huella génica

Tiempo de práctica: 3 horas

Objetivos

1. Que el estudiante conozca la aplicación de las técnicas de DNA recombinante.
2. Que el estudiante sea capaz de analizar e interpretar los datos generados a partir de una prueba de huella génica.
3. El alumno adquirirá la capacidad de manejar muestras para análisis de ácidos nucleicos.
4. El alumno desarrollará destreza en la interpretación de resultados de metodologías básicas de análisis molecular.

FUNDAMENTO

El DNA es un polímero lineal formado por desoxirribonucleótidos que contienen a las bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina, timidina. La interacción de las bases nitrogenadas por puentes de hidrógeno permite la formación de la doble cadena de DNA. Cada grupo fosfato está unido al carbono 5' de una subunidad de azúcar y al carbono 3' de la subunidad de azúcar del nucleótido contiguo.

Las cadenas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases. Las cuales son completamente lineales.

En la molécula de DNA que reside la información genética de un organismo, específicamente en la secuencia de los nucleótidos, de tal manera que cada tres bases forman un codón que corresponde a su vez a uno de los 20 aminoácidos, teniendo un total de 64 codones posibles, los cuales conforman el código genético. En el DNA se encuentran dos tipos de secuencia, la que es capaz de ser

leída para dar origen a una proteína lo que permite que una célula u organismo crezca desarrolle también la no codificante una que codifica para las funciones celulares y otra no codificante, que participa en la regulación de su expresión.

Algunas de las secuencias de nucleótidos no codificantes se caracterizan por ser cortas, están alineadas en tándem y se repiten miles de veces de manera constante a lo largo del DNA. Un ejemplo de esta secuencia puede ser la siguiente. ATTCGGTATTCGGTATTCGGT. A estas secuencias se les denomina STR por sus siglas en inglés (**S**hort **T**andem **R**epeat). El genoma eucariótico contiene muchas de estas secuencias de DNA, y se ha visto que el número de unidades repetidas presenta diferencias de individuo a individuo que con las huellas digitales. En el caso de gemelos idénticos estas secuencias son idénticas. Estas regiones pueden ser aisladas del DNA con enzimas de restricción apropiadas y separadas de acuerdo a su longitud mediante electroforesis en gel. Cuando se completa el proceso de separación el resultado se parece a un código de barras de un envase de supermercado. Este código de barras de DNA ha permitido esclarecer algunos hechos criminales y pruebas de paternidad, a la cual se denomina técnica de "Huella génica"

Es muy frecuente que en la escena de un crimen se encuentren, en pequeñas cantidades muestras de naturaleza biológica a partir de las cuales se puede extraer el DNA como son la sangre, la saliva, la piel, el músculo, el cabello, el semen, los dientes y el hueso, entre otros.

Un método que permite tomar una pequeña cantidad de DNA y en pocas horas sintetizar millones de copias de una porción, es el método de amplificación conocido como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el cual se desarrollo por K. Mullis (1990), En este método se requiere conocer la secuencia de nucleótidos de los extremos del fragmento que se desea amplificar. Estas secuencias se usan para diseñar desoxiligonucleótidos sintéticos de DNA complementarios a cada uno de estos extremos de la cadena de la doble hélice. La muestra de DNA se coloca en una solución que contiene una DNA polimerasa, grandes cantidades de desoxinucleótidos y los desoxiligonucleótidos sintetizados previamente. El método se basa en la repetición cíclica de tres reacciones sucesivas: en la primera reacción, la solución se calienta para que el molde de DNA se separe en sus dos cadenas. En la segunda reacción, la temperatura se reduce para permitir que los desoxiligonucleótidos se apareen por complementariedad de bases con el DNA molde y en la tercera reacción, la DNA polimerasa cataliza la síntesis simultánea de las dos cadenas a partir de cada desoxiligonucleótido que actúa como cebador. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones, el fragmento de DNA elegido se ha duplicado y por lo tanto, la cantidad de DNA molde disponible para el segundo ciclo es doble, lo mismo ocurre cada ciclo de duplicación.

La obtención de múltiples copias requiere 20 a 40 veces la repetición de los ciclos. El éxito de esta técnica radica en el uso de una DNA polimerasa termoestable, que no se desnaturaliza por los repetidos ciclos de calentamiento. Esta enzima se aisló originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

La base de la técnica conocida como huella génica se basa en las diferencias individuales de estas secuencias. Esto, generalmente se trata de cambios en un solo par de bases pertenecientes a diferentes individuos, que se presentan una vez cada 500 a 1,000 pares de bases, como promedio.

Referencias

Curtis, H; Barnes, N; Biología. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana.

Lewin, B; Genes VI. Editorial Oxford.

Nelson, D; Cox, M; Lehninger. Principios de Bioquímica. Tercera edición. Ediciones Omega.

Yuri Sivolap, Ph.D., G. Krivda, Ph.D., N. Kozuhova., S. Chebotar., and Mark Benecke, PH.D. A Homicide in the Ukraine. DNA-based identification of a Boiled, Skeletozined, and Varnished Human Skull, and of Bone Fragments Found in a Fireplace. The American journal of Forensic Medicine and Pathology. 22 (4): 412-414 ,2001.

Lennie Pineda Bernal. El análisis de DNA para pruebas de paternidad e identificación forense. Acta Científica Venezolana. 50: 24-28, 1999.

Andréa Carla de Souza Góes, Dayse Aparecida da Silva, Cristiane Santana Domingues, João Marreiro Sobrinho, Elizeu Fagundes de Carvalho. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. São Paulo Medical Journal. Revista Paulista de Medicina. 120 (3): 77-80, 2002.

Centre for Genetics Education. Genetic Testing and Screening II –Forensic and Other Applications. Directory of Genetics Support Groups, Services and Information. Genetics. 235-239, 2004-2005.

Jeffreys Alec Genetic Fingerprinting Naure Medicine Vol 11(10).1035-1039. 2005.

Mullis K.B the Unusual Origen of the Polymerase Chain Reaction Science Am. 262 (4) 56-65. 1990.

SESIÓN 1 DE LABORATORIO PARA LA PRÁCTICA DE HUELLA GÉNICA

ESCENA DEL CRIMEN

El crimen se lleva a cabo en la calle Lago Manitoba No. 520, Col. Ampliación Granada, Delegación Miguel Hidalgo, en el sofá de la sala se encuentra el cuerpo de la dueña de la casa, una mujer de 42 años de edad. El cadáver presenta signos de estrangulamiento pero sin marcas de sogas o cinturones; tampoco se encuentran huellas digitales en su cuello. La víctima presenta una lesión defensiva en el brazo derecho con arma punzo cortante. En el sofá se observan varias manchas de sangre, algunas de ellas secas. Las más abundantes todavía están frescas. Se ignora si la sangre pertenece a la víctima o a sus agresores.

El laboratorio forense se encarga de recopilar la información de la escena dando a conocer los siguientes aspectos: el cuerpo de la víctima se descubrió 20 minutos después del asesinato. Presentaba con un golpe en la cabeza, presenta señales de forcejeo en su brazo y debajo de las uñas se encuentran depositados restos de piel, sangre, y de cabellos. Algunos de ellos presentan folículos. Todo señala que la víctima forcejeó con su o sus agresores.

En el lugar también se halló un florero con restos de sangre, la cual no se sabe si corresponde a la de la víctima o a los agresores. En un extremo del sofá se encuentra una pieza dental y, debido a que la víctima conserva su dentadura completa, es probable que el diente sea del victimario. En el brazo izquierdo, la víctima presenta varias mordidas, algunas con sangre coagulada y otras con restos de saliva mezclados con sangre.

En el interior de la casa faltan algunas piezas de valor, lo que sugiere que el móvil fue el robo.

La policía cuenta con varios sospechosos, entre los que se encuentra el esposo, con el cual la víctima tuvo una discusión la noche anterior. Se desconoce el tema de la discusión y el paradero del esposo. Otros sospechosos son los dos

repartidores del gas que una hora antes habían proporcionado el servicio. Uno de ellos tiene problemas con la dentadura y aclara que se encuentra en tratamiento dental, ya que ha presentado sangrado y pérdida de algunas piezas dentales. Los otros sospechosos son los dos empleados de la casa, el jardinero que tiene una antigüedad de 4 años y presenta una lesión en el brazo que confiesa se hizo arreglando el jardín y la cocinera quien tiene sólo 3 meses laborando en la casa.

Con esta evidencia se compara el DNA de cada sospechoso para encontrar al culpable o culpables del crimen, por lo que debe determinar si las muestras de sangre, cabellos, pieza dental y saliva sirven para estudiar el DNA y establecer las características que permiten utilizar alguna o todas las muestras para el estudio.

Cada equipo debe escoger alguna de las evidencias previamente descritas y justificar su elección.

Para realizar la comparación entre el DNA encontrado en la escena con el DNA de los sospechosos deben contarse con muestras proporcionadas por los mismos. Mencione de dónde obtendría dicho material. En el caso del esposo debe tenerse en cuenta que no se conoce su paradero, por lo cual la muestra debe ser extraída de algún objeto de uso personal; defina cuál sería éste y justifique la elección del mismo.

SESION 2 DE LABORATORIO PARA LA PRÁCTICA HUELLA GÉNICA

MATERIAL

- DNA de la escena del crimen con amortiguador.
- DNA del sospechoso 1 con amortiguador.
- DNA del sospechoso 2 con amortiguador.
- DNA del sospechoso 3 con amortiguador.
- DNA del sospechoso 4 con Amortiguador.
- DNA del sospechoso 5 con amortiguador.
- Mezcla de enzimas de restricción *EcoRI/PstI*, 1800 U.
- Agua estéril, 2.5 ml.
- Marcador de DNA de fago lambda digerido con Hind III 0.2µg /µl, 100 µl.
 - 1.- 23,130 pb
 - 2.- 9,416 pb
 - 3.- 6,557 pb
 - 4.- 4,361 pb
 - 5.- 2,322 pb
 - 6.- 2,027 pb
- Colorante de DNA (Biorad biosafe).
- Microtubos de colores.
- Microtubos blancos.
- Geles de agarosa al 1.0%.
- Amortiguador de electroforesis TAE (Tris-Acetato-EDTA). Tris-base 39 mM, ácido acético glacial 18 mM, EDTA 10 mM.
- Gradillas para microtubos.
- Recipiente para teñir geles.
- Pipeta automática de 10-100 µl.
- Puntas para pipetas automáticas.
- Marcador indeleble.
- Fuente de poder.
- Cámara horizontal de electroforesis.
- Parrilla para baño maría.
- Vaso de precipitado de 300 ml.
- Recipiente con hielo.
- Microfuga.

PROCEDIMIENTO

1.-Marcar los microtubos de la siguiente forma:

- a) Tubo verde (muestra de la escena)
- b) Tubo azul (sospechoso 1)
- c) Tubo naranja (sospechoso 2)
- d) Tubo violeta (sospechoso 3)
- e) Tubo rojo (sospechoso 4)
- f) Tubo amarillo (sospechoso 5)

2.-Colocar los tubos marcados en la gradilla.

3.-A cada tubo adicionar 10 µl de la muestra correspondiente; utilizar una punta nueva para cada muestra.

4.-Adicionar 10 µl de la mezcla de enzimas de restricción a cada uno de los tubos que contienen la muestra de DNA. Se debe tener cuidado de no contaminar la mezcla de enzimas, por lo cual se sugiere el empleo de una punta nueva por cada tubo.

	Muestras de DNA	Enzimas de restricción <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	Volumen total de la reacción
Muestra de la escena	10 µl	10 µl	20 µl
Sospechoso 1 azul	10 µl	10 µl	20 µl
Sospechoso 2 naranja	10 µl	10 µl	20 µl
Sospechoso 3 violeta	10 µl	10 µl	20 µl
Sospechoso 4 rojo	10 µl	10 µl	20 µl
Sospechoso 5 amarillo	10 µl	10 µl	20 µl

5.-Cierre los microtubos y mezcle la muestra golpeando suavemente los tubos con los dedos. Si se cuenta con una

microfuga aplique un pulso de 2 segundos para asegurarse que toda la muestra se quede en el fondo del microtubo, permitiendo que se mezcle adecuadamente y se lleve a cabo la reacción.

6.-Coloque los tubos en la gradilla e incúbelos a 37°C por 45 minutos.

7.-Transcurrido el tiempo de incubación, adicione 10 µl del amortiguador de carga a cada tubo tápelos y agítelos suavemente con los dedos.

8.-Coloque en la cámara de electroforesis el gel de agarosa, teniendo cuidado que los pozos se encuentren orientados hacia el cátodo [polo negativo (terminal negra)].

9.-Adicione 275 ml del amortiguador de corrida o lo que se requiera para que se cubran los pozos.

10.-Coloque las muestras en el gel empleando una punta nueva para cada muestra, las cuales se depositan de izquierda a derecha amortiguador en el siguiente orden:

- a) Carril 1: marcador de peso molecular, *HindIII*, 10 µl
- b) Carril 2: escena del crimen verde, 10 µl
- c) Carril 3: sospechoso 1 azul, 10 µl
- d) Carril 4: sospechoso 2 naranja, 10 µl
- e) Carril 5: sospechoso 3 violeta, 10 µl
- f) Carril 6: sospechoso 4 rojo, 10 µl
- g) Carril 7: sospechoso 5 amarillo, 10 µl

11-Cierre la cámara de electroforesis y asegúrese que concuerden las terminales rojo con rojo y negro con negro. Conecte la cámara a la fuente de poder, manteniendo la orientación de las terminales.

12.-Encienda la fuente de poder. Ajuste el voltaje a 100 V y realice la electroforesis por 40– 60 minutos.

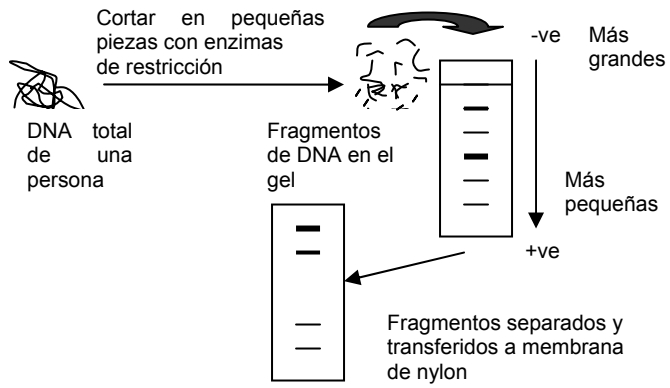
13.-Detenga la electroforesis cuando la muestra llegue a una distancia aproximada de 2 cm del final del gel. Apague la fuente de poder, remueva la tapa y retire cuidadosamente el gel.

14.-Coloque en una charola 120 ml de la solución teñidora 100X y el gel, asegurándose que se encuentre sumergido en la solución. Tíña los geles por 2 minutos.

15.- Después se deben colocar los geles en una charola que contenga 500–700 ml de agua limpia y caliente (40-55°C), agite suavemente el gel por aproximadamente 10 segundos y retire el agua, realizar los lavados que sean necesarios con agua limpia hasta la aparición de las bandas de DNA y hacer la comparación de las muestras.

Referencias

1.-Biotechnology Explorer DNA Fingerprinting Kit Instruction Manual BIORAD.



III

Casos de correlación bioquímica y práctica médica

Caso 1

Cólera

Un hombre de 38 años de edad con peso de 71 kg relata que su padecimiento actual se inició con anorexia, dolor abdominal y diarrea. Un día después siguió con náusea intensa, vómito y diarrea muy abundante y líquida. Ingresó al hospital con hipotensión postural y deshidratación. Se pudo aislar *Vibrio cholerae* toxígeno de sus heces. El paciente mejoró rápidamente al reponerle agua, electrolitos y administrarle tetraciclina por vía oral.

Preguntas de bioquímica

1. ¿Qué procesos de la membrana resultan afectados por *Vibrio cholerae* en un caso de cólera?
2. ¿Qué valores de laboratorio clínico podrían estar alterados en este paciente?
3. ¿Cuáles serían los datos de laboratorio que permitirían precisar el tratamiento hidroelectrolítico?
4. ¿Por qué en este caso hay que añadir glucosa al tratamiento hidroelectrolítico por vía oral?
5. ¿Cuáles son los signos de deshidratación?
6. ¿Cuál fue la situación ácido-base del paciente al momento de su ingreso al hospital?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Describir la composición, las propiedades y las funciones de las membranas biológicas.
2. Estudiar la base bioquímica de algunos trastornos que afectan la función de las membranas.
3. Modelos de transporte transepitelial.
4. Describir los mecanismos por los cuales los organismos enteropatógenos ocasionan pérdida intestinal de agua y electrolitos.
5. Control del agua y de la osmolaridad.
6. Equilibrio ácido-base.
7. Deshidratación y tratamiento de reposición hidroelectrolítica.

REFERENCIAS

1. Villazón SA, Cárdenas CO, Villazón DO, Sierra UA. Fluidos y electrolitos. México: JGH Editores; 2000.
2. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
3. Montgomery R. Bioquímica: Casos y texto. 6a. ed. Barcelona: Editorial Harcourt-Brace; 1998: cap. 4 y 12.

Caso 2

Oclusión intestinal. Acidosis metabólica. Deshidratación grave

Se trata de un paciente masculino de 35 años de edad quien acude al servicio de urgencias de un hospital por presentar dolor abdominal intenso acompañado de vómitos frecuentes y abundantes de contenido intestinal. El paciente presenta un cuadro de deshidratación importante.

A la exploración física se obtuvieron los siguientes datos:

Tensión arterial (TA): 80/50 mmHg

Frecuencia cardíaca (Fc): 120/min

Frecuencia respiratoria (Fr): 32/min

Temperatura (T): 36^o C

Los estudios de laboratorio mostraron lo siguiente:

Electrolitos séricos:

Na⁺ = 128 mEq/l

K⁺ = 2.8 mEq/l

Cl⁻ = 100 mEq/l

Gasometría arterial:

CO₂^t = 12

pH = 7.29

pCO₂ = 24 mmHg

pO₂ = 95 mmHg

HCO₃⁻ = 11.2 mmol/l

EB (exceso de base) = 20

Química sanguínea:

Glucosa = 5.2 mmol/l (95 mg/dl)

BUN = 15 mmol/l

El tratamiento consistió, primero, en el restablecimiento del balance de líquidos con solución salina a 0.9%, electrolitos (reposición de K⁺) y cirugía.

Preguntas de bioquímica

1. Evaluar el estado ácido-base del paciente; tomar en cuenta los valores de pH y presión parcial de bióxido de carbono (pCO₂), el valor de bicarbonato plasmático (HCO₃⁻), etcétera.
2. ¿Es normal el estado ácido-base del paciente? ¿Qué tipo de desequilibrio presenta? ¿Cuál podría ser la causa de ese desequilibrio?
3. ¿Qué relación existe entre el metabolismo de los electrolitos y el agua y entre los trastornos ácido-base y los electrolitos?
4. ¿Qué tipos de alteraciones de líquidos y electrolitos corporales existen?
5. Calcule la osmolaridad sérica (tome en cuenta la concentración de las sustancias que mayormente contribuyen a establecerla) como aparecen en las pags. 98 y 113.
6. ¿Cuáles son los signos de deshidratación?

7. ¿Qué terapéutica recomendaría a este paciente para equilibrar sus líquidos y electrolitos?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Propiedades fisicoquímicas del agua.
2. Concepto de pH.
3. Explicar el significado de las variaciones de los valores normales de pH y de la composición electrolítica de la sangre.
4. Sistemas amortiguadores del plasma, líquido intersticial y células. La aplicación de la ecuación de Henderson y Hasselbalch al cálculo del pH y de la concentración de bióxido de carbono y bicarbonato.
5. Equilibrio ácido-base y su mantenimiento.
6. Equilibrio hidroelectrolítico y su mantenimiento.

REFERENCIAS

1. Harrison. Principios de medicina interna. 15a. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2001; cap: *Líquidos y electrolitos* y *Obstrucción intestinal aguda*. p. 184.
2. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
3. Montgomery R. Bioquímica: Casos y texto. 6a. ed. Barcelona: Editorial Harcourt-Brace, 1998; cap. 4.
4. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 5a.ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2002: 41-76.
5. Villazón SA, Cárdenas CO, Villazón DO, Sierra UA. Fluidos y electrolitos. México: JGH Editores; 2000.

Caso 3

Hipoglucemia secundaria a intoxicación alcohólica

Se trata de un paciente de 58 años, alcohólico crónico, cuyos familiares relatan que ha ingerido una gran cantidad de alcohol en los dos últimos días con un consumo muy escaso de alimentos. Inició su padecimiento con náusea, vómito, mareo, sudación, cefalea, visión borrosa y confusión; presentó, en una sola ocasión, una convulsión, por lo que es llevado al servicio de urgencias. A la exploración se encuentra semiconsciente con aliento alcohólico e hipotermia.

Se procede a un lavado gástrico para remover el alcohol aún no absorbido; se mantienen permeables las vías respiratorias; se instala oxígeno terapia y se le administra solución glucosada por vía endovenosa.

Los resultados de laboratorio muestran:

Alcohol	300 mg/dl
Glucosa	2.0 mmol/l
Lactato	9.0 mmol/l
pH	7.2

Preguntas de bioquímica

1. ¿Cuáles son los síntomas de la hipoglucemia?
2. ¿De qué forma el etanol produce acidosis láctica e hipoglucemia?
¿Cómo se encuentra la relación intracelular de NADH/NAD*?
¿Qué procesos metabólicos se favorecen con los niveles altos de NADH?

3. El alcoholismo es la base de muchas deficiencias vitamínicas. ¿Qué implicaciones metabólicas tienen estas deficiencias (complejo B)?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Hipoglucemia. Regulación de la glucemia.
2. Acidosis láctica.
3. Metabolismo de carbohidratos.
4. Trastornos del metabolismo de vitaminas.
5. Metabolismo del etanol.

REFERENCIAS

1. Murray KR, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica de Harper. 16a. ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2004. p. 980-981
2. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
3. Harrison. Principios de medicina interna. 15a. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2001. Capítulos: Acidosis láctica, hipoglucemia, alcohol y alcoholismo, deficiencia y exceso de vitaminas.
4. Academia Nacional de Medicina. Tratado de medicina interna. 2a. ed. México: Editorial El Manual Moderno; 1994. Capítulos: Acidosis láctica e intoxicación aguda por alcohol etílico.

Caso 4

Cetosis por inanición Obesidad

Una mujer de 27 años llega al servicio de urgencias médicas después de haber sufrido un desmayo. Al interrogarla, relata que lleva 15 días a dieta de agua, té y verduras cocidas para bajar de peso, sin ningún control médico. Se detectó aliento con olor a manzana, cetonuria, cetonemia, ácidos grasos libres elevados, triacilgliceroles elevados, hipoglucemia y presión arterial baja; su peso al iniciar la dieta era de 78 kg y su estatura de 1.59 m. Se diagnostica cetoacidosis por inanición y obesidad exógena.

El estudio de su dieta mostró que gran parte de su ingesta calórica era en forma de carbohidratos (galletas, chocolates, pasteles, refrescos, dulces, etcétera).

El tratamiento consistió en administrar parenteralmente solución glucosada y continuar con una dieta normocalórica.

Preguntas de bioquímica

1. En esta mujer de 27 años: ¿corresponde el peso a su talla? Determinar su índice de masa corporal, grado de obesidad y el porcentaje de sobrepeso.
2. ¿Cómo es posible que se formen grandes almacenes de energía en forma de grasas, si la dieta contiene predominantemente carbohidratos?

3. ¿Cuáles son las interrelaciones metabólicas de los principales tejidos (hígado, tejido adiposo, cerebro, músculo, etcétera) en la obesidad?
4. ¿Cuáles son las interrelaciones metabólicas de los principales tejidos en el estado de ayuno temprano y en la inanición?
5. ¿Cuál es el papel de los cuerpos cetónicos en el metabolismo?
6. ¿Qué régimen dietético recomendaría a esta persona para bajar de peso?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Describir las principales rutas de biosíntesis, catabolismo y almacenamiento de lípidos.
2. Conocer la estructura y función de los triacilgliceroles, ácidos grasos y cuerpos cetónicos.
3. Establecer las bases bioquímicas de la cetosis y obesidad producidas por anomalías en el metabolismo de los lípidos.
4. Describir las alteraciones del equilibrio ácido-base que se producen en la cetosis.
5. Conocer las interrelaciones metabólicas de los principales tejidos corporales en los estados de buena nutrición, de ayuno temprano, de inanición, de renutrición, de homeostasis calórica, etcétera.

REFERENCIAS

1. Harrison. Principios de medicina interna. 15a. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2001.
2. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
3. Montgomery R. Bioquímica: Casos y texto. 6a. ed. Harcourt-Brace; 1998.
4. Casanova E. Nutriología médica. Editorial Médica Panamericana; 1995.

Caso 5

Hipercolesterolemia y aterosclerosis

Un hombre de 56 años acudió al médico por presentar dolor precordial en reposo que se incrementaba con el esfuerzo. Se le detectó hipercolesterolemia que, al análisis de los lípidos plasmáticos, mostró que la mayoría del colesterol plasmático elevado se encontraba en la fracción de lipoproteína de baja densidad (LDL). Se le realizó una arteriografía coronaria la cual mostró un estrechamiento de las arterias. La evaluación de la dieta indicó que consumía gran cantidad de alimentos ricos en colesterol, aunque en los últimos meses había seguido una dieta baja en grasas.

Fue diagnosticado de aterosclerosis en las arterias coronarias.

El tratamiento consistió en una dieta sin colesterol y en administrar preparados de lovastatina, un inhibidor de la HMGCoA reductasa.

Fue tratado también con colestiramina, una resina que capta las sales biliares. La resina no se absorbe y permanece en la luz intestinal donde se une a las sales y aumenta la cantidad de las mismas que se excreta con las heces.

Preguntas de bioquímica

1. ¿Cuáles son algunos alimentos ricos en colesterol?
2. ¿Cuál es el destino del colesterol de la dieta?

3. ¿Cuál es la función de la bilis en la digestión?
4. ¿Qué conexión metabólica existe entre el colesterol y las sales biliares?
5. ¿Cómo disminuye la resina de colestiramina la concentración plasmática de colesterol?
6. ¿Por qué se le ha llamado al colesterol-LDL: “colesterol malo” y al colesterol-HDL: “colesterol bueno”?
7. ¿Cómo puede la hipercolesterolemia producir aterosclerosis, infarto del miocardio, xantomatosis, etcétera?
8. ¿Por qué el hecho de disminuir la concentración plasmática de colesterol puede ser útil para la salud de este paciente?
9. ¿Qué papel desempeña la HMG-CoA reductasa en la biosíntesis del colesterol?
10. ¿Cuál es la razón del uso de la lovastatina para el tratamiento del paciente?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Estructura del colesterol y otros esteroides importantes.
2. Biosíntesis, metabolismo y excreción del colesterol y de los ácidos biliares.
3. Describir la función de la bilis y su relación con el colesterol.

4. Considerar el papel del colesterol en el desarrollo de la aterosclerosis y de la relación entre hipercolesterolemia e ingesta dietética de lípidos en esta enfermedad.
5. Comentar los principios del transporte de lípidos en el sistema circulatorio.
6. Describir la composición, estructura, metabolismo y función de los principales tipos de lipoproteínas plasmáticas.
7. Describir los defectos del metabolismo lipídico que tienen relevancia clínica en relación con la hipercolesterolemia.

REFERENCIAS

1. PLM. Diccionario de especialidades farmacológicas. 49 ed. 2004.
2. Montgomery R. Bioquímica. Casos y texto. 6a. ed. Barcelona: Editorial Harcourt-Brace, 1998: cap. 10 y 11.
3. Harrison. Principios de medicina interna. 15a. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2001: Capítulos: *Aterosclerosis y otras formas de arteriosclerosis e hiperlipoproteinemias y otros trastornos del metabolismo lipídico.*
4. Pennachio D. Lineamientos para la detección de hipercolesterolemia. *Atención Médica* 1997;10/2:30-43.
5. Vogel RA. Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis. *Clin Cardiol* 1997; 20:426-432.
6. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. McGraw-Hill Interamericana Editores; 2002.
7. Mecanismo de acción de los hipercolesterolemiantes. *Rev Médico General*. 1997; 2(7): 71-74.

Caso 6

GOTA

Un hombre de 53 años relata que su padecimiento actual se inició con una inflamación aguda del orjejo mayor del pie derecho e intenso dolor, el cual se intensificaba con el frío y el movimiento. Además, asegura que poco antes de presentar este episodio agudo el paciente había incrementado el consumo de carne, vísceras, leguminosas y vino de mesa en abundancia.

Fue tratado con fenilbutazona, pero presentó daño gástrico, por lo que se cambió el medicamento por alopurinol y naproxén.

Preguntas de bioquímica

1. ¿Qué alteraciones metabólicas pueden traer como consecuencia un aumento en los niveles séricos de ácido úrico?
2. ¿Son necesarias las purinas y las pirimidinas en la dieta?
3. ¿Qué alimentos son ricos en purinas y pirimidinas?
4. ¿Qué valores de laboratorio podrían estar alterados en este paciente?
5. ¿Son importantes los antecedentes familiares de este paciente?
6. ¿Cuál es la base bioquímica para sospechar que una dieta rica en proteínas puede provocar ataques de gota en pacientes susceptibles?
7. ¿Cómo se relaciona la ingestión de etanol con el incremento de la concentración plasmática de ácido úrico?
8. ¿Qué régimen dietético le recomendaría a esta persona para mejorar sus niveles de ácido úrico?
9. ¿Cuál es la base bioquímica para la acción de los medicamentos utilizados en la gota?

Conceptos y áreas de aprendizaje

1. Características estructurales de los ácidos nucleicos.
2. Biosíntesis y catabolismo de purinas y pirimidinas.
3. Explicar cómo interfieren algunos medicamentos utilizados en el tratamiento de la gota con el metabolismo de los nucleótidos.

REFERENCIAS

1. Harrison. Principios de medicina interna. 15a. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2001.
2. Devlin TM. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. 4a. ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2004.
3. Montgomery R. Bioquímica: Casos y texto. 6a. ed. Barcelona: Editorial Harcourt-Brace; 1998: Cap. 13.
4. Rodríguez Carranza R y col. Vademécum académico de medicamentos. 4a. ed. México: Facultad de Medicina, UNAM y McGraw-Hill Interamericana Editores; 2004.

IV Casos clínicos (ABP)

CASO 1

“Vi morado y rojo en poco tiempo”

Carolina, secretaria de 32 años con historia familiar de fibrosis quística, fumadora a razón de 5 cigarrillos al día, alcoholismo cada mes llegando a la embriaguez; cuenta con historial personal de cefalea holocraneana, pulsátil, de intensidad 8/10, de predominio matutino, con disminución a lo largo del día, fatiga, falta de concentración y problemas con la memoria, ya que ha olvidado el camino de regreso a casa en varias ocasiones. Hace dos horas comienza con dolor precordio irradiado hacia brazo izquierdo, disnea, sensación de muerte inminente y diaforesis. Es traída por familiar quien refiere que otra persona presento la misma sintomatología hace un año y falleció de la misma forma. A la exploración física se encuentra paciente femenina, con facies álgica, rubicundez de tegumentos, desorientada en tiempo, lugar y espacio. Ligera cianosis peribucal resto de exploración física sin alteraciones.

Gasometria arterial: pH: 7.45; pCO₂ 38 mmHg, pO₂ 40 mmHg, SO₂% 87%, Hto 38

- 1.-Pistas/ datos orientadores
- 2.-Problemas
- 3.-Hipótesis/ explicaciones/ diagnósticos presuntivos
- 4.-Áreas objetivos de aprendizaje
- 5.-Fuentes de información

CASO 2

“Sin aire, me ahogo”

Lizeth, ama de casa de 43 años es llevada a la unidad de urgencias por su hermana quien la encontró en el baño de su hogar con pérdida del estado de alerta; comenta que el mismo día por la mañana la paciente había discutido con su marido y que esta lo había amenazado con quitarse la vida. Al interrogatorio dirigido e indirecto, la paciente cuenta con antecedentes de padecer trastorno por ansiedad generalizada, tabaquismo positivo desde hace tres años a razón de dos cajetillas al día, dolor poliarticular que controla con aspirina y cuenta con el antecedente de cirugía de cuello por presentar un padecimiento de la glándula tiroides no especificado. A la exploración física, paciente inconsciente, Glasgow 9, con presencia de bradipnea, ruidos cardiacos disminuidos tono e intensidad, con presencia de hiperreflexia ++. Se indica lavado gástrico en donde se encuentran numerosas pastillas de color blanco y restos de alimentos. Se solicita gasometría arterial con el

siguiente resultado: pH 7.22, pCO₂ 67 mm Hg, pO₂ 85 mm Hg, SO₂ % 94, lactato 0.6 mmol/L.

1. PISTAS/DATOS ORIENTADORES
2. PROBLEMAS
3. HIPÓTESIS/EXPLICACIONES/DIAGNÓSTICOS PRESUNTIVOS
4. ÁREAS/OBJETIVOS DE APRENDIZAJE
5. FUENTES DE INFORMACIÓN

CASO 3

“Todo gira a mi alrededor”

Georgina es una estudiante de la carrera de derecho, desde hace un mes ha presentado mareo que cede al acostarse por unos minutos, tiene carga genética para diabetes mellitus tipo 2, ya que su padre presenta este padecimiento desde hace 6 años. No cuenta con otros antecedentes de importancia. Hace una semana el mareo se agravó y presentó sudor frío, nerviosismo, taquicardia y ansiedad, que revirtió con el consumo de un vaso de jugo; posteriormente en los días siguientes presentó la misma sintomatología después de consumir alimentos ricos en grasas y carbohidratos. Acude con su médico quién indica estudios de laboratorio y los cuales se presentan a continuación:

Biometría hemática: Leucocitos 8 mil, neutrófilos 6 mil, linfocitos mil, monocitos 500, eritrocitos 4 mil doscientos, hemoglobina 12.3 g/dL, hematocrito 41%, volumen corpuscular medio 90.7 fL, hemoglobina corpuscular media 31 pg, plaquetas 312 mil.

Bioquímica clínica: glucosa 98 mg/dL, urea 40.7, creatinina 0.7 mg/dL, ácido úrico 6.3 mg/dL,

Pruebas de funcionamiento hepático: albúmina 4 g/dL, aspartato aminotransferasa 34 U/L, alanina aminotransferasa 56 U/L, fosfatasa alcalina U/L, bilirrubina total 1.2 mg/dL.

El médico, después de hacer un análisis exhaustivo ordena realizar más estudios, entre los que incluyen una tomografía axial computarizada, y posteriormente comenta a Georgina que tendrán que intervenirla quirúrgicamente.

1. PISTAS/DATOS ORIENTADORES
2. PROBLEMAS
3. HIPÓTESIS/EXPLICACIONES/DIAGNÓSTICOS PRESUNTIVOS
4. ÁREAS/OBJETIVOS DE APRENDIZAJE
5. FUENTES DE INFORMACIÓN

CASO 3

“SÓLO CON SOMBRERO SALGO AL SOL”

Aldo es un niño de 14 años, que acude a la consulta de medicina general por presentar una mancha en su brazo izquierdo de color negro-azulado-café, con bordes asimétricos y que ha notado que se ha vuelto más grande. No cuenta con antecedentes de importancia, su madre refiere que hace 10 años fue llevado al dermatólogo para evaluar una sensibilidad al sol y presencia de pecas en casi todas las zonas expuestas, se recomendó que no se expusiera a la radiación solar por mucho tiempo y se aplicará filtros y pantallas solares, además se realizó una biopsia de piel, pero no regresó por el resultado. A la exploración física dirigida, se observa una mancha de color negro-azulado, con bordes asimétricos, de tamaño aproximado de 10 mm, además se muestra adenopatía axilar izquierda, se detecta fotofobia, conjuntivitis e hiperpigmentación en las zonas expuestas al sol.

1. PISTAS/DATOS ORIENTADORES
2. PROBLEMAS
3. HIPÓTESIS/EXPLICACIONES/DIAGNÓSTICOS PRESUNTIVOS
4. ÁREAS/OBJETIVOS DE APRENDIZAJE
5. FUENTES DE INFORMACIÓN

V

CASOS Anexos

Siendo las 17:30hrs, usted llega a su consultorio para brindar asesoría clínica. Ya en la sala de espera, usted observa a seis pacientes sentados aguardando su turno:

- 1) Uno de ellos es un escolar de 9 años de edad acompañado por su madre. De primera impresión, parece tener sobrepeso y se encuentra comiendo gomitas de azúcar.
 - 2) Otra es una adolescente de 19 años quien luce delgada en extremo. Aunque también viene en compañía de su madre, la chica parece permanecer en su lugar a regañadientes.
 - 3) La tercera es una mujer de 27 años de edad en compañía de su esposo, quien la trae el día de hoy a su tercera consulta prenatal.
 - 4) Una mujer de 23 años ocupa el cuarto asiento. Con una complexión robusta y fascies circular, se trata, en realidad, de una paciente ya conocida por usted.
 - 5) Un varón de 45 años, somnoliento, con mal aliño y aliento alcohólico, yace en el penúltimo asiento. Un muchacho, probablemente su hijo adolescente, permanecía de pie a su lado.
 - 6) Por último, en la sexta banca hay un adulto mayor de 71 años acompañado por una mujer algunos años más joven que él. En su última cita, usted lo envió a gestionar algunos estudios de laboratorio (química sanguínea y perfil lipídico).
-

La joven madre y su hijo son los primeros en entrar al consultorio. Ella dice estar interesada en iniciar un control de niño sano, ya que la maestra la había mandado a llamar para platicar con ella acerca de la apatía que mostraba el infante ante el desarrollo de actividad física y por el alto consumo de carbohidratos simples y complejos que tenía durante el recreo. En la exploración física se observó que el muchachito presentaba un aspecto de tipología claramente pícnica, con la presencia de áreas hiperpigmentadas de aspecto “aterciopelado” en los pliegues del cuello y ambas axilas. Asimismo, los panículos adiposos abdominal, mamarios y suprailiaeos resultaron ser voluminosos cuando se evaluaron mediante la palpación. Al ubicar el peso del escolar en la tabla de percentiles de peso para la edad, el valor cayó por encima del percentil 95.

✓ Diagnóstico: Obesidad infantil.

La mamá tomó entonces la iniciativa de abordarlo con las siguientes preguntas:

- ¿Por qué razón un aumento de la glucemia provoca la secreción de insulina por las células β pancreáticas?
- ¿Cómo son reguladas la glucólisis y la gluconeogénesis por la insulina?
- ¿Cómo son reguladas la β -oxidación y la β -reducción por la insulina?
- ¿Cómo son reguladas la lipólisis y la lipogénesis por la insulina?

- ¿Cómo puede usted fundamentar, bioquímicamente, el hecho de que el contenido de triacilglicéridos en el tejido adiposo aumente con el consumo de una dieta que consiste básicamente en carbohidratos?
- ¿Cuál es la relación existente entre las somatomedinas y la insulina?
- ¿Qué explicación puede dar usted para que hayan aparecido las áreas de hiperpigmentación descritas en el infante?
- ¿Qué es la leptina y en dónde se produce?
- ¿Cuál es el efecto de la leptina sobre las neuronas del núcleo arqueado?
- ¿Qué es la ghrelina y en dónde se produce?
- ¿Cuál es el efecto de la ghrelina sobre las neuronas del núcleo arqueado?

La adolescente y su madre fueron las segundas en entrar a consulta. Casi de inmediato la madre comenzó a quejarse acerca de la falta de ingesta de alimentos de su hija, al grado de que solamente había consumido té negro en los últimos cinco días.

- ¿Qué son las metilxantinas?
- ¿Cuál es su mecanismo de acción?
- ¿Qué vías metabólicas son favorecidas con el consumo de metilxantinas?

La hija, tratando de desmentir el argumento de su madre, afirmó que también había estado consumiendo, por día, una lata de atún en agua. Por otra parte, la mamá comentó que también le preocupaba el hecho de que, desde hace tres meses, su hija tuviese un retraso en la presentación del sangrado menstrual. En la toma de signos vitales, se cuantificó una temperatura corporal de 36.5°C y una frecuencia cardiaca de 57 latidos/min. La exploración física evidenció a una adolescente con palidez tegumentaria, cianosis acral y con una marcada disminución del tejido adiposo subcutáneo. Además, los ritmos cardiaco y peristáltico se escucharon disminuidos tanto en frecuencia como en intensidad. Finalmente, la conducta principal que regía el cuadro clínico era el marcado rechazo hacia la ingesta de comestibles y el miedo irracional al aumento de peso.

✓ Diagnóstico: Anorexia nerviosa.

- ¿Qué vías metabólicas proveen combustible para el organismo antes de 12 horas de ayuno?
- ¿Qué vías metabólicas proveen combustible para el organismo después de 36 horas de ayuno?
- ¿Qué aminoácidos son gluconeogénicos?
- ¿Qué aminoácidos son cetogénicos?
- ¿Cuál es la razón de que pertenezcan a uno u otro grupo?
- ¿Qué son los estrógenos y en dónde se producen?
- ¿Qué función tiene la enzima denominada “aromatasa” en el metabolismo de los estrógenos?

- ¿En qué tejidos se localiza dicha enzima?
- ¿Cómo podría explicar usted, en este caso, la aparición de amenorrea secundaria?

Con pasos lánguidos y el apoyo de su esposo, la mujer del tercer asiento entró al consultorio. Durante la tribuna libre no manifestó cursar con algún tipo de molestia, sin embargo, expresó que últimamente sentía un apetito voraz por los alimentos dulces y que había notado un aumento en el número de micciones durante el día. Al encontrarse la paciente en ayunas, usted consideró oportuno efectuar una prueba de glucemia en sangre periférica, obteniéndose un valor de 212mg/dL. Ella también traía consigo un estudio de química sanguínea realizado hace 5 días, mismo que reportaba hiperglucemia cuantificada en 196mg/dL.

Por otra parte, el cálculo de la edad gestacional, de acuerdo a la fecha de última menstruación (FUM), resultó de 28 semanas. El resto de la exploración física se abocó a identificar las diversas características obstétricas tanto de la madre como del producto.

- ✓ Diagnóstico: Diabetes mellitus gestacional.
- ¿Qué hormonas se sintetizan en el tejido placentario?
- ¿Cuál es el efecto de la somatotrofina coriónica humana sobre el metabolismo lipídico?
- ¿Cuál es el efecto de la somatotrofina coriónica humana sobre el metabolismo de los carbohidratos?

- ¿Por qué razón es necesaria la aparición de un estado de resistencia a la acción de la insulina, por parte de la madre, durante el embarazo?

La mujer robusta pasó a consulta. Su habitus exterior se caracterizaba por una complexión endomórfica muy particular: obesidad central, cifosis torácica (a modo de “joroba de búfalo”), aumento de volumen de los panículos adiposos del rostro (adoptando una apariencia de “cara de luna llena”), extremidades delgadas y presencia de equimosis y estrías en diversas partes del cuerpo.

Usted tomó el expediente y al leerlo recordó que la paciente se encontraba en tratamiento con prednisona (un glucocorticoide) debido a un diagnóstico, hecho hace tres meses, de lupus eritematoso sistémico (LES). Una de las principales preocupaciones de la mujer era la pérdida progresiva y paulatina de su figura pues, anteriormente, había trabajado como modelo y, debido a los cambios experimentados, no había recibido ninguna oferta de trabajo recientemente. Salvo el cotejo de los rasgos físicos ya descritos, la exploración física no aportó mayores datos al respecto.

- ✓ Diagnóstico: Síndrome de Cushing iatrogénico.
- ¿Cuál es el efecto de los glucocorticoides en el metabolismo de proteínas?

- ¿Cuál es el efecto de los glucocorticoides en el metabolismo lipídico?
- ¿Por qué razones los glucocorticoides favorecen la vía gluconeogénica?
- ¿Por qué razones los glucocorticoides favorecen la vía glucogenogénica?
- ¿Qué efecto tienen los glucocorticoides sobre la acción de la insulina?
- Con base en las preguntas previas ¿cómo podría usted fundamentar la aparición de estrías y equimosis?
- Con base en las preguntas previas ¿podría usted explicar la redistribución de la grasa corporal que ocurre en este trastorno?

Al llamar al siguiente paciente, el muchacho entró cargando con cierta dificultad a su padre. El interrogatorio indirecto reveló que el paciente era un alcohólico crónico quien había iniciado el consumo de etanol desde los 15 años de edad. No obstante, el consumo del mismo se había acentuado en el último mes debido a problemas laborales y económicos, de tal forma que en los últimos días había comenzado a experimentar cambios conductuales y en el estado de alerta.

La exploración física dio cuenta de un individuo de edad aparentemente mayor a la cronológica, somnoliento, con mal arreglo personal y con un aroma a etanol fácilmente perceptible a distancia. A nivel del tórax llamó la atención la presencia de

ginecomastia, en tanto que su abdomen fue globoso a expensas de la presencia de líquido de ascitis. Asimismo, se pudo observar la dilatación de venas colaterales periumbilicales adoptando una morfología de “*caput medusae*”. Por otro lado, la hipotrofia muscular de las cuatro extremidades era evidente.

✓ Diagnóstico: Insuficiencia hepática secundaria a cirrosis hepática.

- ¿Qué enzimas intervienen en el metabolismo hepático del etanol?
- ¿Cómo puede explicar la aparición de cirrosis en una situación de consumo crónico de etanol?
- ¿Cuál es la importancia del hígado en el metabolismo de los aminoácidos?
- ¿Cómo podría explicar la aparición de una sintomatología neurológica con base en una alteración del ciclo de la urea?
- ¿Qué alteración en el metabolismo de los esteroides sexuales podría explicar la aparición de ginecomastia en un individuo con enfermedad hepática?

Si se efectuara un corte histológico en donde se demuestre la acumulación de gotas de triacilglicéridos dentro de los hepatocitos (esteatosis).

- ¿Cómo podría explicar usted la aparición este fenómeno?
-

El hombre mayor había esperado pacientemente su turno. Entró al consultorio apoyado del brazo de su hija menor y ambos

tomaron asiento de nueva cuenta. En su última cita, usted le había solicitado el trámite de algunos estudios de control, los cuales le mostró a usted con prontitud:

➤ Química sanguínea:

Variable	Valor cuantificado	Intervalo de normalidad
Glucosa (mg/dL)	116	70 - 126
Na ⁺ (mEq/L)	140	136 - 145
K ⁺ (mEq/L)	4.6	3.5 - 5
Cl ⁻ (mEq/L)	103	98 - 106
Ácido úrico (g/dL)	9	6 - 8

➤ Perfil lipídico:

Variable	Valor cuantificado	Intervalo de normalidad
Triacilglicéridos (mg/dL)	201	< 150
Colesterol Total (mg/dL)	290	< 200
Colesterol HDL (mg/dL)	29.1	>35
Colesterol LDL (mg/dL)	202	<150

Como antecedente de importancia, el señor proviene de una familia con predisposición al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, sin embargo, los valores de glucemia determinados en varias pruebas previas casi siempre han caído en el intervalo entre los 110 y 126 mg/dL. Además, cursaba también con dislipidemia a expensas de la elevación tanto de triacilgliceroles como de colesterol, y los niveles de ácido úrico en el plasma siempre habían estado por encima del límite de referencia superior. La tensión arterial también ha sido refractaria al tratamiento con enalapril, siendo el valor promedio de 140/90mmHg.

✓ Diagnóstico: Síndrome metabólico.

- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la insulina?

- ¿Qué hormonas son secretadas por el tejido adiposo?
- ¿Cómo afectan estas hormonas la sensibilidad hacia la insulina?
- ¿Qué son las lipoproteínas?
- ¿Cuántos tipos hay?
- ¿Qué diferencias existen entre LDL y HDL?
- ¿A partir de qué compuestos se obtiene el ácido úrico?
- ¿Cuál es la razón de que un alto consumo de proteínas conduzca a la elevación del nivel plasmático de ácido úrico?

Bibliografía

- Nelson DL, Cox MM. "Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism". In: Nelson DL, Cox MM. "Lehninger Principles of Biochemistry". 5th Edition W.H. Freeman and Company 2008. Chapter 23; Pp 901-944.
 - Marks AD, Lieberman M. Marks AD. "The Fed or Absorptive State". In: Lieberman M. "Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach". 3rd Edition Lippincott Williams & Wilkins 2009. Chapter 2; Pp 22-30.
 - Marks AD, Lieberman M. Marks AD. "Fasting". In: Lieberman M. "Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach". 3rd Edition Lippincott Williams & Wilkins 2009. Chapter 3; Pp 31-39.
 - Marks AD, Lieberman M. Marks AD. "Actions of Hormones That Regulate Fuel Metabolism". In: Lieberman M. "Marks' Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach". 3rd Edition Lippincott Williams & Wilkins 2009. Chapter 43; Pp 805-830.
 - Harris RA, Crabb DW. "Interrelaciones metabólicas". En: Devlin TM "Bioquímica. Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas". 4^a Edición en Español Editorial Reverté 2004. Capítulo 20; Pp 861-902.
 - Ganong WF. "Funciones endocrinas del páncreas y regulación del metabolismo de carbohidratos". En: Ganong WF. "Fisiología Médica". 20^a Edición en Español El Manual Moderno 2006. Capítulo 19; Pp 313-333.
 - Ganong WF. "Médula y corteza suprarrenales". En: Ganong WF. "Fisiología Médica". 20^a Edición en Español El Manual Moderno 2006. Capítulo 20; Pp 335-358.
 - Ganong WF. "Hipófisis". En: Ganong WF. "Fisiología Médica". 20^a Edición en Español El Manual Moderno 2006. Capítulo 22; Pp 373-385.
 - Ganong WF. "Gónadas: desarrollo y función del sistema reproductor". En: Ganong WF. "Fisiología Médica". 20^a Edición en Español El Manual Moderno 2006. Capítulo 23; Pp 387-425.
- Guión y preguntas elaborados por Salazar Morales Miguel Fdo.
MPSS Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina UNAM.
Revisión y coedición por M. en C. María Alicia del Sagrado Corazón Cea Bonilla.
Coordinadora de Enseñanza. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina UNAM.
Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Kahlúa es profesora de matemáticas de 5to grado de preparatoria. Tiene 23 años de edad y es originaria de Chiapas. Hace tres días enfermó de faringoamigdalitis, sin embargo, al no haber mejoría, optó por consumir trimetoprim con sulfametoxazol (TMP-SMZ). A la mañana siguiente, tras iniciar la administración del fármaco, se miró al espejo y notó la aparición de un leve tinte amarillento en su piel, por lo que pensó que se trataba de una reacción alérgica y acudió al hospital.

Uno de los estudios paraclínicos gestionados fue la citometría hemática, cuyos resultados se muestran a continuación:

Variable	Valor cuantificado	Intervalo de normalidad
GR ($10^6/\square L$)	3.7	4.0 - 5.5
Hb (g/dL)	10.8	12 - 16
Hto (%)	33.3	35 - 50
VCM (fL)	90	83 - 97
HCM (pg)	29.1	27 - 33
CmHb (g/dL)	32.4	33 - 37
CV-VCM (%)	15	13 - 14
Serie blanca (Leu/ $\square L$)	9,100	4,000 - 12,000

Con el fin de complementar el estudio anterior, se incluyó una solicitud para realizar un frotis de sangre periférica, el cual reportó la observación de esquistocitos y cuerpos de Heinz.

- 1) ¿Qué son los cuerpos de Heinz?
- 2) ¿Qué es la hemoglobina?
- 3) ¿Qué es la metahemoglobina?
- 4) ¿Qué es la sulfahemoglobina?

Otro estudio tramitado, y que se justificó con base en la aparición de ictericia, fue la batería de pruebas de función hepática, cuyos resultados también se despliegan:

Variable	Valor cuantificado	Intervalo de normalidad
Bilirrubina total (mg/dL)	2.75	0.10 - 1.00
Bilirrubina indirecta (mg/dL)	2.6	0.10 - 0.75
Bilirrubina directa (mg/dL)	0.15	0.10 - 0.25
AST (UI/L)	21	15 - 40
ALT (UI/L)	21	10 - 40
Fosfatasa alcalina (UI/L)	96	44 - 155
□-glutamyl transferasa (UI/L)	15	9 - 40
Lactato deshidrogenasa (UI/L)	930	313 - 618

Proteínas totales (mg/dL)	7	6 - 8
Albúmina (mg/dL)	4	3.5 - 5
Globulinas (mg/dL)	3	2.3 - 3.5
Cociente A/G	1.33	1 - 1.5

Así, tras el análisis de los resultados previos, se llegó a la conclusión de la posible existencia de un defecto enzimático a nivel de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, razón por la cual se cambió el medicamento por un □-lactámico y se le dieron instrucciones de presentarse en la consulta externa del servicio de hematología para la apertura del expediente clínico.

- 5) ¿Cuántas y cuáles son las fases de la vía de las pentosas?
- 6) ¿Cuáles son los metabolitos de mayor importancia de esta vía?
- 7) ¿Para qué se emplean dichos metabolitos?
- 8) ¿En qué reacciones de la vía se obtiene poder reductor como producto?
- 9) ¿Cuál es el paso limitante de la velocidad de la vía del fosfogluconato?
- 10) ¿Cómo se encuentra regulada la enzima que cataliza dicho paso?
- 11) ¿Qué vías metabólicas, que utilizan glucosa como sustrato, se llevan a cabo dentro del eritrocito?
- 12) ¿Por qué razones son importantes estas rutas metabólicas para el hematíe?

- 13) En alusión a las preguntas 1 a 4 ¿Por qué se ve afectada la estructura de la hemoglobina en esta patología?
- 14) ¿Qué otros factores pueden afectar negativamente a un individuo con esta deficiencia enzimática?

➤ Sinopsis

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es un padecimiento con un patrón de herencia recesivo ligado a X que representa la primera causa de anemia hemolítica por deficiencias enzimáticas, seguida por la deficiencia de piruvato cinasa y por la deficiencia de fosfohexosa isomerasa.

La vía de las pentosas (también conocida como vía del fosfogluconato o derivación de las hexosas monofosfato) es una vía paralela a la ruta glucolítica, sin embargo, a diferencia de ésta, no utiliza la molécula de glucosa como una fuente para la obtención de ATP sino como un sustrato para la generación tanto de poder reductor ($\text{NADPH}+\text{H}^+$) como de ribosa-5-fosfato. El $\text{NADPH}+\text{H}^+$, al encontrarse en mayor concentración que su contraparte no fosforilada, el $\text{NADH}+\text{H}^+$, se emplea como donador de electrones en distintas biosíntesis reductivas, al igual que en procesos implicados en la defensa en contra de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por otra parte, la ribosa-5-fosfato es una molécula que se utiliza para la síntesis de nucleótidos y que se puede obtener a partir de la isomerización de ribulosa-5-fosfato, la cual es el producto de las reacciones oxidativas de la ruta.

La vía cuenta con dos fases: una que es oxidativa y dependiente de NADP^+ , y otra no oxidativa que también recibe el nombre de fase de interconversión de azúcares. Durante la fase oxidativa se obtienen dos moléculas de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ en las reacciones catalizadas por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y por la fosfogluconato deshidrogenasa, respectivamente, sin embargo también se obtiene ribulosa 5-fosfato a partir de la descarboxilación del fosfogluconato. La fase de interconversión de azúcares es una serie de reacciones fácilmente reversibles que tiene por objetivo la obtención de intermediarios que contienen entre tres y siete átomos carbonos. El paso limitante de la velocidad de la vía se encuentra a nivel de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual se regula a través de modulación alostérica positiva o negativa dependiendo de las concentraciones relativas de NADP^+ y $\text{NADPH}+\text{H}^+$. De esta manera, cuando las necesidades celulares de poder reductor son altas, hay suficiente NADP^+ para derivar a la glucosa-6-fosfato hacia la vía de las pentosas, por el contrario, si hay un exceso de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, la hexosa se metaboliza por la vía glucolítica.

Los hematíes son una estirpe celular que, debido a su función transportadora de oxígeno, perdieron sus organelos durante el proceso de diferenciación. Esta es la razón fundamental de que dos rutas metabólicas cobren una particular importancia para los mismos: la glucólisis (para la obtención de ATP, pues no pueden realizar fosforilación oxidativa) y la vía de las pentosas (para la

producción de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ que sirva para la reconversión de glutatión a su forma reducida y proteger así su integridad propia frente al daño oxidativo). La acción de las especies reactivas derivadas del oxígeno ocasiona la oxidación de los grupos sulfhidrilo presentes en las cadenas de globina y la consecutiva formación de puentes disulfuro, lo cual deriva en la desnaturalización de la proteína. Esto da por resultado la agregación y precipitación de la hemoglobina, la cual se puede visualizar mediante el empleo de tinciones supravitales como el naranja de acridina o el cloruro de tilrosanilina (violeta de cristal). Estos corpúsculos reciben la denominación de cuerpos de Heinz. Además, durante su paso por los cordones esplénicos, los eritrocitos con hemoglobina precipitada en su interior tienen mayor probabilidad de ser fagocitados por los macrófagos, razón por la cual pueden perder fragmentos de su membrana y observarse como esquistocitos en el frotis de sangre periférica. El glutatión es un tripéptido (Glut-Cys-Gly) que protege indirectamente a los eritrocitos de la acción del radical hidroxilo al evitar su generación en la reacción de Fenton:



A través de la reducción del peróxido de hidrógeno hasta agua por el glutatión, se evita que se lleve a cabo la reacción anterior al transformar al reactivo en un producto inerte.



El glutatión en su forma reducida es un monómero (GSH), en tanto que su forma oxidada es un homodímero unido por un enlace disulfuro (GSSG). La enzima glutatión peroxidasa es la responsable de acoplar la oxidación del glutatión con la reducción del peróxido de hidrógeno en agua. Por otra parte, la enzima glutatión reductasa permite la reconversión del glutatión oxidado a glutatión reducido. Así pues, dentro del eritrocito, este conjunto de reacciones de óxido-reducción mantienen reducidos a los grupos sulfhidrilo de las globinas (al impedir la producción de radical hidroxilo) y al hierro del grupo hem en estado ferroso (al consumir peróxido de hidrógeno).

El cuadro clínico es variable y depende del grado de deficiencia de la enzima, yendo desde la simple ictericia hasta la insuficiencia renal aguda por necrosis tubular. Lo más común es que ocurra hemólisis tras la exposición a algún agente oxidante, como algunos medicamentos (por ejemplo sulfonamidas y antipalúdicos), ciertas leguminosas (como *Vicia fava*, cuyos α -glucósidos producen especies reactivas de oxígeno) o durante procesos mórbidos (en los cuales los leucocitos producen radicales libres durante el estallido respiratorio). Generalmente los episodios hemolíticos se autolimitan.

- Abreviaturas comúnmente empleadas para expresar los parámetros de la serie roja en la citometría hemática:
- GR.-Cuenta de glóbulos rojos. Es la cantidad de hematíes expresada en millones por microlitro o en millones por milímetro cúbico.
- Hb.-Hemoglobina. Es la cantidad de hemoglobina expresada en gramos por decilitro.
- Hto.-Hematocrito. Es la proporción de eritrocitos en el total de sangre.
- VCM.-Volumen corpuscular medio. También se suele acotar como VGM (volumen globular medio). Se trata del promedio del volumen eritrocitario
- HCM.-Hemoglobina corpuscular media. Es la cantidad promedio de hemoglobina dentro de cada eritrocito.
- CmHb.-Concentración media de hemoglobina corpuscular (globular). También se suele acotar como CCMH (concentración corpuscular media de hemoglobina).
- CV-VCM.-Coeficiente de variación del volumen corpuscular (globular) medio. Es frecuente encontrar este mismo índice con su abreviatura en inglés RDW (red cell distribution width o anchura de la distribución eritrocitaria). Corresponde al producto de la desviación estándar por el volumen corpuscular medio.

Bibliografía

- Lisker R. "Hemólisis asociada a deficiencias de enzimas de la vía de las pentosas". En: Ruiz Argüelles GJ. "Fundamentos de

Hematología". 4ª Edición Panamericana 2009. Capítulo 8 Anemias Hemolíticas por Alteraciones de Enzimas Eritrocitarias; Pp 97-105.

- Ruiz Argüelles GJ, Ruiz Reyes G, Ruiz Delgado GJ. "Interpretación de la citometría hemática. Índices y parámetros eritrocíticos. Definición de anemia". En: Ruiz Argüelles GJ. "Fundamentos de Hematología". 4ª Edición Panamericana 2009. Capítulo 2; Pp 13-24.
- Quaranta JF, Pesce A, Cassuto JP. "ABC de El Hemograma. De la lectura al diagnóstico". Editorial Masson 1989.
- Bunn HF, Rosse W. "Anemias hemolíticas y por pérdida aguda de sangre". En: Kasper DL, Braunwald E, et.al. Harrison Principios de Medicina Interna. 16ª Edición McGraw Hill 2006. Volumen 1, Parte V, Sección 2 Trastornos hematopoyéticos; Pg 685.
- Nelson DL, Cox MM. "Pentose phosphate pathway of glucose oxidation". In: Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th Edition Freeman 2008. Chapter 14 Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. Pp 558-563.
- Marks AD, Lieberman M. "Pathways of sugar metabolism: pentose phosphate pathway, fructose and galactose metabolism". In: Marks AD, Lieberman M. "Mark's basic medical biochemistry: a clinical approach". 3rd edition Lippincott Williams & Wilkins 2009. Section 5 Chapter 29; Pp 536-549.

- Davidson VL “Pentose phosphate pathway (hexose monophosphate shunt)”. In: Davidson VL. “The National Series for Independent Study. Biochemistry”. 3rd Edition Harwal Publishing 1994. Chapter 20 Alternative Pathways of Carbohydrate Metabolism. Pp 353-355.
- Davidson VL “Biosynthesis of aminoacid-derived compounds. Glutathione”. In: Davidson VL. “The National Series for Independent Study. Biochemistry”. 3rd Edition Harwal Publishing 1994. Chapter 29 Biosynthesis of Aminoacids and Aminoacid-Derived Compounds. Pg 480.
- Aster JC. “Hemolytic disease due to red cell enzyme defects: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency”. In: Kumar V, Abbas AK. Robbins & Cotran: Pathological Basis of Disease. 7th edition; 2005. Chapter 13 Red Blood Cell and Bleeding Disorders. Pp 627-628.
- Fonseca D, Mateus H. “Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Aspectos generales de la enzimopatía más frecuente en el mundo”. Acta Médica Colombiana Vol. 30 N°2 ~Abril-Junio~ 2005. Pp 59-64.
- Michel HO. “A study of sulfhemoglobin”. Proc. Am. Soc. Biol. Chem., J. Biol. Chem., 123, p. lxxxv (1938).
- Harris JS, Michel HO. “The formation of methemoglobin and sulfhemoglobin during sulfanilamide therapy”. J. Clin. Invest., 1939.
- Park CM, Nagel RL, Blumberg WE, et.al. “Sulfhemoglobin. Properties of partially sulfurated tetramers”. J. Biol. Chem. Vol. 161, No. 19, July 5 1986; Pp 8805-88010.
- Wu C, Kenny MA. “A case of sulfhemoglobinemia and emergency measurement of sulfhemoglobin with OSM3 CO-oximeter”. Clinical Chemistry 43:1. 162-166 (1997).
- Hill AS, Haut A, Cartwright GE, Wintrobe MM. “The role of nonhemoglobin proteins and reduced glutathione in the protection of hemoglobin from oxidation in vitro”. Journal of Clinical Investigation Vol. 43, No. 1, 1964.
- Todd AS, Barnetson WK. “Laboratory Techniques. Use of dark ground microscopy in haematology”. J Clin Pathol 1988; 41:786-792.
- Dye J. “Explaining pythagorean abstinence from beans”. 1999. In: <http://users.ucom.net/~vegan/beans.html>

Guión elaborado por Salazar Morales Miguel Fdo.

MPSS Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina UNAM.

Revisión y coedición por M. en C. María Alicia del Sagrado Corazón Cea Bonilla.

Coordinadora de Enseñanza. Departamento de Bioquímica F