

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

2018 - 2019

Conceptos teóricos iniciales		Práctica 1	Soluciones	46
I				
El método científico	05	Práctica 2	Regulación del equilibrio ácido-base después de ejercicio muscular intenso y de la ingestión de bicarbonato de sodio	53
El Sistema Internacional de Unidades (SI)	08			
Matemáticas para el laboratorio	12	Práctica 3	Cinética enzimática. Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de la reacción enzimática	59
Notación científica o exponencial	12	Práctica 4	Estudio del bombeo de protones por levaduras; efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones de los desacoplantes.	64
El método del factor unitario en los cálculos	13	Práctica 5	Determinación de glucosa en sangre total	68
Logaritmos	14	Práctica 6	Determinación de colesterol y lipoproteínas plasmáticas	74
Gráficas	16	Práctica 7	Integración metabólica	84
Algunos métodos utilizados en bioquímica	18			
Centrifugación	18	Práctica 8	Examen General de Orina (EGO)	95
Potenciometría	19			
Electroforesis	22	Práctica 9	Pipeteo	100
Soluciones	25			
Manejo de material biológico	32	Práctica 10	Huella génica	104
Medidas de seguridad	34			

III	Apéndice	111
	Soluciones	112
	Concentración normal de electrolitos	112
	Instrucciones para el uso del microscopio Marca Leica	113
	Instrucciones para la operación del fotocolorímetro Klett-Summerson	115
	Uso del Glucómetro	116
	Uso del Accutrend	118
	Valores de referencia	120

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 profesional 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 valedera 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 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

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 nombres de ciencia que han hecho contribuciones notables al conocimiento del tema de estudio correspondiente (cuadro I.3).

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.3. Unidades SI derivadas con nombres especiales

<i>Magnitud</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Definición</i>
Fuerza	Newton	N	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	a

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:

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

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 $\mu\text{mol/l}$.

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.

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 enzimas que se necesita para transformar un mol de sustrato por segundo.

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

$$2.05 \times 10^{-4}$$

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 sí 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:

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

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

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

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 ($5 \times 10^{-5} \text{ L}$)?

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

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

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

En este método las unidades se acarrean 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 unabase 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 y 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:

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

El antilogaritmo es el número que corresponde a un logaritmo dado, es decir:

Si x es el logaritmo de y, entonces y es el antilogaritmo de x. Por ejemplo, si 2 es el logaritmo de 100, entonces 100 es el antilogaritmo de 2.

*If x is the logarithm of y, then y is the **antilogarithm** of x.*

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:

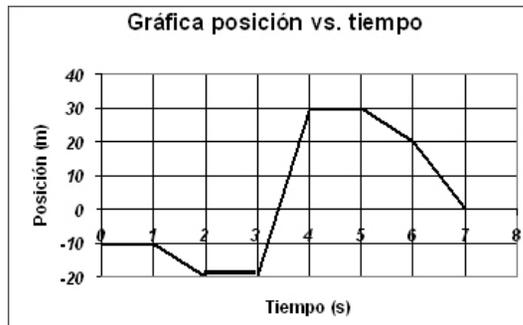
Gráfica poligonal. Consiste en expresar las variaciones de un fenómeno continuo por medio de puntos y de representar la marcha de dicho fenómeno por medio de una línea que une esos puntos.

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. 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.

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, los valores negativos.

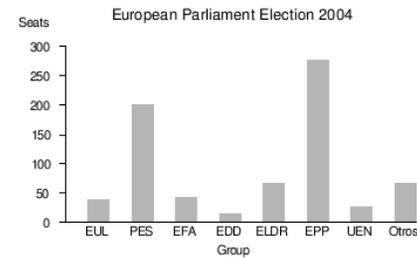
Después se trazan los puntos cuyas distancias a uno de los ejes sean proporcionales a la magnitud que se va a representar y, finalmente, al unir estos puntos por medio de segmentos de recta, se tiene la gráfica poligonal.



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

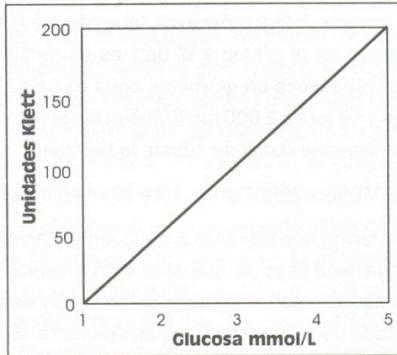


Fig. I.1. Curva patrón de glucosa.

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 da como resultado que las partículas pesadas se sedimenten rápido que las partículas ligeras.

La fuerza centrífuga depende de la masa (m), de las revoluciones por minuto (n) y de la 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:

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

Una masa de un gramo de agua (que corresponde a un mililitro) es atraído al centro de la Tierra con una fuerza de 980 dinas, de acuerdo con la ley de la gravitación de Newton. En la Tierra ese mililitro de agua pesa 1 gramo. Si se saca el cociente de las dos fuerzas:

$$\frac{F_{\text{rpm}}}{F_{\text{reposito}}} = \frac{701\,440 \text{ dinas}}{980 \text{ dinas}} = 716$$

Es decir, sobre ese mililitro de agua, a esas revoluciones por minuto, se ejerce una fuerza que corresponde a 716 veces la de la gravedad, por lo que pesaría, en el fondo del tubo, 716 veces más que en el tubo en reposo, es decir, 716 g. Ese mismo mililitro pesaría en la Luna 0.16 g, porque la fuerza de gravedad de la Luna es 0.16 veces la de la Tierra. Recordar que masa (cantidad de materia) y peso (fuerza) son dos conceptos diferentes.

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). En cambio, las ultracentrifugas operan en cámaras refrigeradas, evacuadas de aire, y 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 picosegundos (ps) o 100 femtosegundos (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 centrifuga hasta alcanzar la velocidad requerida.
3. Nunca se frene una centrifuga; 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 centrifuga 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 MgSO_4 y CdSO_4 se colocan magnesio y cadmio 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 magnesio

al electrodo de cadmio, el cual puede ser medido por medio de un voltímetro. Cuando el magnesio cede los electrones se convierte en ion soluble, mientras que el cadmio disuelto, al aceptar los electrones, se convierte en cadmio 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 negativo (cátodo, que en este caso es el electrodo de magnesio) al polo positivo (ánodo, que en este caso es el electrodo de cadmio), 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 negativas 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 mol/L y una presión del gas de una atmósfera. Sin embargo, en la práctica es inconveniente porque se trata de un electrodo gaseoso.

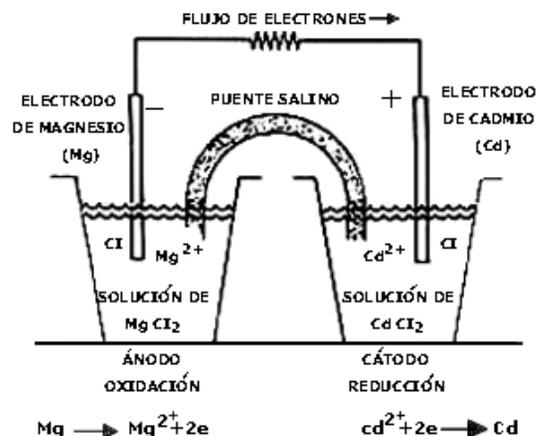


Fig. 1.2 Celda de Daniell

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 dependen 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^+).

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 $25^{\circ}C$, 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. 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 en el interior del electrodo 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).. El medidor se calibra antes de usarlo, primero con una solución reguladora de pH 7; se lava el electrodo con agua destilada o desionizada y se calibra con una segunda solución reguladora de pH 4 ó 10. Luego se determina el pH de la solución problema.

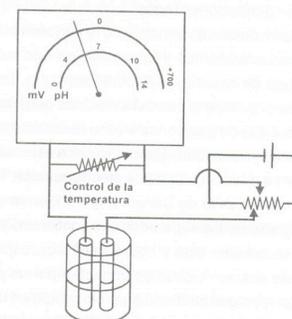


Fig. 1.3. Esquema de un potenciómetro.

Electroforesis

Una partícula coloidal o un ion provistos de carga eléctrica migran 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 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 eléctrico se alcanza una velocidad constante de migración de las partículas, ya que la fuerza impulsora dada por el campo eléctrico se iguala con la fuerza friccional. 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.

Tipos de electroforesis

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 colocan las muestras en los pocillos y se aplica el campo eléctrico. 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 el poro del gel 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 sistemas electroforéticos que se usan pueden ser continuos, en los que se utiliza el mismo amortiguador en los tanques de los electrodos y en el gel, y discontinuos, en los que se utiliza un amortiguador en los tanques de los electrodos y otro diferente para el gel. En uno de los sistemas discontinuos más utilizado se utiliza un gel concentrador de poro abierto (para concentrar en una sola banda los componentes de una mezcla) y un gel separador de poro cerrado, en donde se resuelven los componentes de la mezcla. A los geles se les puede incorporar sustancias disociantes como la urea y el SDS. También pueden emplearse agentes reductores como el 2 mercaptoetanol o ditiotreitól 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.

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, la cantidad del soluto y del solvente; los métodos cuantitativos más comunes, que sirven para expresar la concentración (la medida numérica de la cantidad 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 molecular o 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.

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

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.

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

Solución porcentual v/v. Se utiliza cuando el soluto y el solvente son líquidos. El v/v indica los mililitros de soluto por 100 mililitros de solución. Por ejemplo, una solución de etanol al 30% v/v tiene 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.

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

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 al 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 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 L de solución de alcohol a 96% y completar a 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

Soluciones normales

Una solución 1 Normal es la que contiene el peso equivalente de una sustancia en gramos por litro de solución:

$$1 \text{ N} = \frac{\text{peso equivalente}}{\text{litro de solución}}$$

donde el peso equivalente corresponde a los gramos de una sustancia que se combina con un gramo de hidrógeno.

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

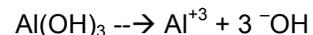
n = número de hidrógenos sustituibles o valencia o # de carga positiva dada por los cationes

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 la molécula (valencia de 2); por lo tanto, su peso equivalente es: $98/2 = 49 \text{ g}$.



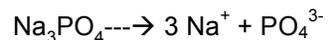
dos hidrógenos con carga positivas por lo tanto valencia = 2

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 (valencia de 3) y su peso molecular es de 78; por lo tanto, su peso equivalente es $78/3 = 26 \text{ g}$.



Tres cargas positivas del Al por lo tanto valencia = 3

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_3PO_4 tiene un peso molecular de 163.9 y tres iones de sodio en cada molécula (valencia de 3); por lo tanto, el peso equivalente del fosfato de sodio será $163.9/3 = 54.6 \text{ g}$.



Tres cargas positivas de los 3 sodios por lo tanto valencia = 3

El *peso equivalente de un oxidante (reductor)* se calcula dividiendo el peso molecular entre el número de electrones que puede ganar o perder la molécula (valencia).

Si se disuelve un peso equivalente de un compuesto hasta un volumen de un litro se obtiene una solución 1 normal (1 N). Por ejemplo, si quisieramos preparar una solución 1 N de NaCl, tendríamos que calcular primero su peso equivalente. Para esto hay que considerar el peso molecular ($\text{Na}^+ : 23 + \text{Cl}^- : 35.5 = 58.5$ g) y su valencia (1).



una carga positiva de Na^+ por lo tanto valencia 1

$$\text{Peso equivalente} = \frac{\text{Peso molecular}}{\text{Valencia}}$$

$$= \frac{58.5}{1} = 58.5 \text{ g}$$

y estos gramos se disuelven en agua hasta completar un litro.

Ahora bien, si se nos piden 150 mL de una solución 0.5 N NaCl ¿Cuántos gramos de NaCl deben pesarse?

1) Sabemos que una solución 1N de NaCl tiene un peso equivalente de 58.5 g en un litro.

2) Hacemos el siguiente planteamiento:

una solución 1N tiene 58.5 g de NaCl

una solución 0.5 N tiene X g de NaCl

$$X = (0.5 \text{ N})(58.5) = 29.25 \text{ g}$$

3) De acuerdo con la definición de solución Normal, los 29.25 g de NaCl los consideramos en un litro de solución, pero como nos piden preparar 150 mL hacemos el siguiente planteamiento:

En 1000 ml de solución hay 29.25 g de NaCl

En 150 ml de solución hay X g de NaCl

$$X = \frac{(150)(29.25)}{1000} = 4.38 \text{ g}$$

Resultado: se necesita pesar 4.38 g de NaCl y disolverlos hasta completar un volumen de 150 mL para obtener una solución 0.5 N.

Soluciones osmolares

El fenómeno de la ósmosis se presenta cuando una solución está separada de su solvente o de una solución con una diferente concentración de soluto 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 dissociables) del soluto, por lo que una solución osmolar es aquella que contiene un mol de la sustancia 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 1 molar contiene un mol de catión de Na^+ y otro mol de anión de Cl^- por litro, o sea:

$$1 \text{ mol NaCl} = 58.5 \text{ g}$$

$$1 \text{ M NaCl} = \frac{1 \text{ mol Na}^+}{1 \text{ litro}} + \frac{1 \text{ mol Cl}^-}{1 \text{ litro}} = \underline{2 \text{ mol de partículas}}$$

1 litro

1 litro

$$= \frac{2 \text{ osmol}}{1 \text{ litro}} = 2 \text{ Osmolar}$$

1 litro

Por ejemplo, supongamos que se quiere preparar 300 mL de una solución de NaCl 0.2 Osmolar.

Sabemos que una solución 2 osmolar contiene 58.5 g de NaCl en 1 L de solución. Por tanto se hace el siguiente planteamiento:

Una solución 2 osmolar tiene 58.5 g de NaCl en 1 litro

una solución 0.2 osmol tiene X g de NaCl en 1 litro.

$$X = \frac{(0.2 \text{ osm})(58.1)}{2} = 5.85 \text{ g}$$

2 osm

Estos 5.85 g se encuentran en un litro de solución, pero como nos piden preparar 300 ml, hacemos el siguiente planteamiento para una solución 0.2 osmolar:

En 1000 mL de solución hay 5.85 g

En 200 mL de solución hay X g

$$X = \frac{(5.85)(300 \text{ mL})}{1000} = 1.75 \text{ g}$$

1000 mL

Necesitamos 1.75 g de NaCl y disolverlos hasta completar un volumen de 300 mL y la solución sería 0.2 Osmolar.

En cambio, la glucosa en solución no se disocia y para esta sustancia una solución 1 osmolar contiene un mol por litro:

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

La mayoría de los líquidos corporales tiene una osmolaridad 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

Dos soluciones isotónicas 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 osmolaridad que el plasma sanguíneo, que es aproximadamente de 0.3 osmolar (300 miliosmoles/L). 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 cuando no ocurre ganancia ni pérdida neta de agua en la célula, y por tanto no hay un cambio en el volumen de la célula cuando ésta 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 cambio de volumen. Por ejemplo, una solución de ácido bórico que es isosmótica con la sangre (porque tiene la misma osmolaridad que la sangre), pero es hipotónica ocasiona hemólisis de los eritrocitos porque las moléculas de ácido bórico atraviesan libremente la membrana del eritrocito a favor de su gradiente de concentración. En consecuencia, isotonicidad connota compatibilidad fisiológica (no hay cambio de volumen), mientras que isoosmotividad, no necesariamente. 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:

$$\frac{(300 \text{ mg})}{100 \text{ mL}} \left(\frac{1}{10}\right) = 30 \text{ mg} / 100 \text{ mL}.$$

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: $300 \times 1/10 \times 1/100 = 0.3 \text{ mg}/100 \text{ mL}$.

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 y 1:16, 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 (**tubo 1**) y agregarle 0.5 ml de diluyente (dilución 1:2, tubo 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.

Paso 3: transferir a otro tubo 0.5 mL del tubo 2 y agregarle 0.5 mL del diluyente (dilución $1/2$, tubo 3) La dilución final sería : $1/2 \times 1/2 \times 1/2 = 1/8$. Los pasos siguientes se hacen igual que para los pasos 2 o 3.

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

-
- (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 demostrarse 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 centrifuga 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 desechar 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 desechar 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)

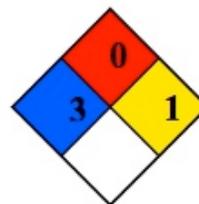
El símbolo de la N.F.P.A. es un sistema de identificación de riesgos de un producto químico, en tres categorías principales: "salud", "inflamabilidad" y "reactividad" indicando el grado de severidad por medio de una escala numérica desde (4) que indica el riesgo mayor, (3) riesgo severo, (2) riesgo moderado, (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.7 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 1.8 Hoja de seguridad para el ácido Clorhídrico

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. Que conozca algunas de las 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, solución normal, solución osmolar?
- 4.- ¿Qué significan: v/v, p/v, p/p?
- 5.- ¿Cuáles son los tipos de soluciones que existen *in vivo*? Mencionar ejemplos.
- 6.- ¿Qué es una solución isotónica?
- 7.- ¿Cómo se calcula la osmolaridad de una solución?

8.- ¿Qué les pasa a los eritrocitos cuando se ponen en contacto con soluciones salinas de diferente osmolaridad?

9.- ¿Qué se entiende por dilución y dilución seriada de las soluciones?

INTRODUCCION

Las soluciones son mezclas homogéneas de dos o más sustancias. La sustancia que se disuelve se llama soluto (la cual se encuentra en menor cantidad) y el medio en que se disuelve es el solvente o disolvente, presente en mayor cantidad (en muchas ocasiones, una solución consta de varios solutos). En el ser humano los solutos están representados por iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+}) y moléculas orgánicas de mayor peso molecular (glucosa, urea, proteínas). El solvente universal en los sistemas biológicos es el agua, que en el caso de la especie humana representa aproximadamente el 60% del peso corporal total en un individuo adulto promedio. Estos componentes se distribuyen en dos compartimientos principales, intracelular y extracelular, como se muestra en la figura 1.

El cuerpo se mantiene en un **equilibrio hídrico**, lo que significa que cada uno de los compartimientos tiene las

cantidades necesarias de agua y solutos. Sin embargo, cabe recordar que el intercambio de agua y solutos entre los diferentes compartimentos es continuo a través de la filtración, la osmosis y otros procesos físicos; el volumen de líquido en cada compartimento permanece casi constante sin que se altere el equilibrio hidroelectrolítico.

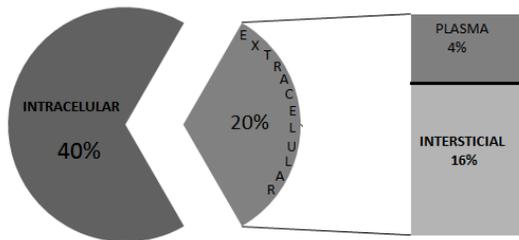


Figura1. Distribución del agua corporal en el ser humano. El agua corporal total es el 60%, que equivale a 42 L. El líquido intracelular (LIC) 28L (40% del peso corporal) el líquido extracelular(LEC) 14L (20 % peso corporal) del LEC el plasma es 2.8L (4% del LEC) y el líquido intersticial 11.2L (16% del LEC)

La ósmosis constituye el medio primario para el desplazamiento del agua entre el líquido intracelular y el intersticial, y la concentración de solutos en ellos – dada como osmolaridad - determina la dirección en la cual se va a desplazar el agua.

La osmolaridad de las soluciones refleja la concentración total de los solutos osmóticamente activos disueltos en el solvente, definiendo osmolaridad como el número de moles de soluto por litro de solución (un osmol

representa un mol de partículas osmóticamente activas, independientemente de su naturaleza química).

La osmolaridad del plasma sanguíneo humano es de 290-310 mOsm/L (1 Osmol = 1000 mOsmoles), y se puede medir con un osmómetro o calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mOsm/L} = \text{Na}^+ \times 2 + \frac{\text{Glucosa}}{18} + \frac{\text{Nitrógeno ureico}}{6}$$

En esta ecuación, el factor de 2 que multiplica a la concentración de sodio considera la concentración de los aniones (principalmente los iones cloruro y bicarbonato) que contrarrestan la carga positiva de los cationes y que también son osmóticamente activos. Las concentraciones de glucosa y nitrógeno ureico están dadas en mg/dL, y los números 18 y 6 que aparecen en el denominador respectivo representan el resultado final de los factores de conversión para transformar de mg/dL a mOsm/L.

Para mantener o restablecer el equilibrio hídrico y electrolítico en un paciente se necesitan determinadas soluciones, las cuales se han de calcular y preparar con precisión; éstas van desde el simple suministro de agua y sal (en el caso de pacientes con deshidratación o quemadura mayor a 2º grado), hasta la corrección de posibles deficiencias de otros iones - por ejemplo potasio - o bien aporte de aminoácidos o calorías en forma de solución glucosada (para pacientes en terapia intensiva o falla orgánica múltiple). Algunas de estas soluciones requieren además un compuesto amortiguador para tratar estados de acidosis o alcalosis. Para

poder realizar un cálculo adecuado de las soluciones que se necesita se deben considerar los siguientes aspectos:

1.- Existen compartimientos celulares (intracelular y extracelular) en los que se lleva a cabo el intercambio de sustancias entre ellos para mantener un equilibrio integral (homeostasis).

2.-El agua corporal total (TBW) de un individuo depende del porcentaje de masa muscular y del tejido graso, como se muestra en la tabla 1.

AGUA CORPORAL TOTAL (%)			
COMPLEXION	LACTANTE	HOMBRE	MUJER
Delgado	80	65	55
Promedio	70	60	50
Obeso	65	55	45

Tabla 1. Porcentaje de agua corporal total por género y complexión

INGRESOS	PERDIDA
Líquido ingerido 2100 ml	Insensible: piel 350 mL
Del metabolismo 200 mñ	Insensible: pulmones 350 mL
	Sudor 100 mL
	Heces 100 mL
	Orina 1400 mL
Total de ingresos 2300 ml	Total de pérdidas 2300

Tabla 2. Ingresos y pérdida de agua diarios (mL/día) (Gayton y Hall Tratado de Fisiología médica 2011 Elsevier)

Con base en las consideraciones anteriores, para un individuo masculino de 70 kg de peso de complexión promedio:

$$TBW = (\text{peso Kg}) (\% \text{ agua corporal total})$$

$$TBW = (70\text{Kg}) (0.60) = 42 \text{ litros}$$

Si se tienen 42 litros de agua corporal total y el volumen de líquido extracelular (LEC) corresponde al 40%, entonces:

$$42 \text{ litros} \text{-----} 100\% \text{ del agua corporal total}$$

$$x \text{-----} 40\% \text{ del LEC} \qquad \qquad \qquad x = 16.8 \text{ litros de LEC}$$

3.- En cada compartimento los electrolitos se distribuyen de manera diferente; esto se debe a la permeabilidad selectiva de las membranas celulares, la presencia de transportadores y canales que permiten su difusión. La concentración de solutos determina la distribución del agua y la osmolaridad de la solución. Por ejemplo, en el líquido extracelular el sodio representa un porcentaje importante de las partículas osmóticamente activas, por lo que si hay cambios en su concentración cambiara la osmolaridad debido al desplazamiento del solvente hacia otros compartimentos.

4.- Necesidades de mantenimiento: para que se metabolice una caloría se necesita 1 mL de agua, por lo que las necesidades calóricas – y por lo tanto de agua - son proporcionales al peso corporal. Los datos que se mencionan a continuación pueden servir de guía para el cálculo de los requerimientos de agua:

- 0 a 10 Kg de peso corporal → 100 cal/Kg
- 11 a 20 Kg de peso corporal → 50 cal/Kg adicionales por cada Kg después de los 10 Kg

Más de 20 kg de peso corporal: 20 cal/Kg adicionales por cada Kg después de los 20 Kg

De acuerdo con lo anterior, las necesidades diarias de agua se calcularían así:

1 a 10 Kg de peso corporal: 100 mL/Kg día (= 4 mL /Kg h)

11 a 20 Kg de peso corporal: 1000 mL + 50 mL/Kg día (= 2 mL /Kg h adicional)

>20 Kg de peso corporal: 1500 mL + 20 mL /Kg día (= 1 mL /Kg h adicional)

3mEq/Kg/día

5.- Existen factores que modifican las necesidades basales de agua, tales como:

Fiebre: por cada grado centígrado que aumente la temperatura por arriba del valor basal, se incrementa en un 12% las necesidades de agua.

En estados hipometabólicos - como en el estado de coma - las necesidades de agua disminuyen aproximadamente 20%.

6. La osmolaridad de los distintos compartimentos depende principalmente de los electrolitos más abundantes disueltos en ellos. Así, la osmolaridad extracelular depende de la $[Na^+]$, y la osmolaridad intracelular de la $[K^+]$; por lo que es necesario mantener los requerimientos basales de tales electrolitos, de acuerdo con el siguiente esquema:

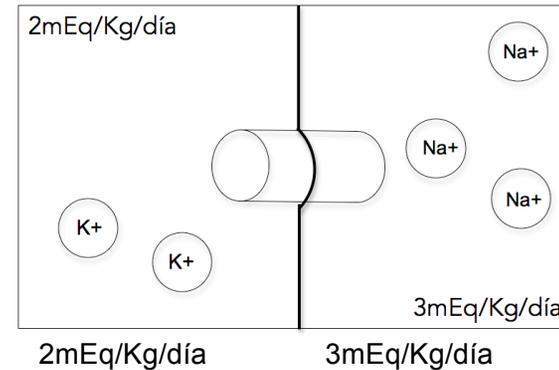


Figura 2. Requerimientos basales de sodio y potasio.

Para ilustrar lo anterior, tomemos como ejemplo un individuo que pesa 60 Kg; en este caso, sus requerimientos serán:

- 1) Necesidades diarias de líquido:
 $1000 \text{ mL} + 500 \text{ mL} + 40 \text{ Kg} \times 20 \text{ mL/Kg/día} = 2300 \text{ mL}$
- 2) Necesidades de sodio
 $3 \text{ mEq /Kg/ día} \times 60 \text{ Kg de peso} = 180 \text{ mEq/L}$
- 3) Necesidades de potasio:
 $2 \text{ mEq/Kg/ día} \times 6 \text{ Kg de peso} = 120 \text{ mEq /L}$

Con base en esta información, será mas facil poder decidir que solucion se requerirá.

Material

Por equipo:

- 3 vasos de precipitado de 10 mL
- 1 vaso de precipitado de 50 mL
- 1 pipeta de 1.0 mL
- 1 pipeta de 5.0 mL
- 1 pipeta de 10.0 mL
- Cloruro de sodio en cristales (NaCl)
- Balanza granataria
- 1 Portaobjetos y 3 cubreobjetos
- Lanceta

Por grupo:

- 1 Microscopio marca Leica.

Procedimiento

1. Hacer los cálculos correspondientes para comprobar que la solución de NaCl al 0.9% es isotónica con respecto al plasma

Considerar que:

a) El cloruro de sodio se disocia completamente en solución acuosa en los iones sodio y cloruro, por lo que su concentración osmolar será el doble de su concentración molar ($1 \text{ mol/L} = 2 \text{ osmol/L}$).

b) La presión osmótica normal del plasma es de 290-310 mosm/L.

2. Preparar 20 mL de una solución de NaCl al 4.5% (etiquetar como solución 1).

3. A partir de la solución 1, preparar 25 mL al 0.9% (solución 2) y 50 mL al 0.045% (solución 3).

4. De las 3 soluciones preparadas colocar una gota por separado en un porta-objetos, adicionar a cada gota de solución una de sangre (la cual se tomará de la punción de la yema del dedo con una lanceta) y observarlas al microscopio para valorar el efecto de la osmolaridad de las soluciones sobre los eritrocitos, como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Distribución de las gotas de sangre en el porta-objetos.

Resultados

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

2. Deducir el movimiento neto del solvente – en caso de que lo haya – cuando se ponen en contacto eritrocitos con soluciones hipo, hiper e isoosmóticas.

Problemas adicionales.

- 1.- Preparar 250 mL de una solución de Na_2CO_3 0.20 M
- 2.- Preparar 150 mL de una solución de NaCl al 4.5%.
- 3.- Preparar 250 mL de una solución de NaOH al 35%.
- 4.- Preparar 1.5 litros de H_3PO_4 0.75 M
- 5.-Preparar 150 mL de una solución 0.6 M de KMnO_4
- 6.-Preparar 400 mL de una solución de histidina al 0.03M (PM = 155.15/mol).
- 7.-Preparar 25 mL de una solución 0.25 M de KOH a partir de una solución de KOH 0.4 M. ¿Cuántos mL de esta solución concentrada deberá utilizar?
- 8.-Cuántos miliequivalentes están presentes en una solución de Ca^{2+} al 0.1%.

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.

7. Lieberman Allan. D. Marks. Bioquímica Básica de Marks, un enfoque clínico. 4 edición España. Lippincott Williams and Wilkins 2013 Página 116 y 120.

8. Mota Hernández Felipe; Velásquez Jones Luis. Trastornos clínicos de agua y electrolitos. Vol. 1. pag. 04. Mc Graw Hill. 2004.

Práctica 2

Regulación del equilibrio ácido-base por los riñones 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 el papel de los riñones en el mantenimiento del equilibrio ácido-base en una situación de alcalosis metabólica y en una de acidosis metabólica.
2. Mediante la determinación del pH en la orina, observará la variación de la concentración de hidrogeniones en un individuo que ha realizado ejercicio muscular intenso y en otro que ha ingerido una carga de bicarbonato.
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 el pH del organismo se mantenga constante dentro de un intervalo estrecho?
2. ¿Cuáles son las fuentes de iones H^+ en el organismo?
3. ¿Cuáles son los sistemas reguladores que intervienen en la eliminación del H^+ producido en el organismo con el fin de mantener constante el pH sanguíneo?

4. Escriba 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.

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 Hasselbach aplicada al sistema HCO_3^-/CO_2 y, con base en ella, conteste la siguiente pregunta:

¿Cómo participan el aparato respiratorio y los riñones en el control del pH sanguíneo?

INTRODUCCIÓN

Entre 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) que se disocia 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 considerable en ausencia de mecanismos reguladores. En el hombre, la intervención de los pulmones y los riñones evita que ocurra tal acidificación, lo que permite mantener en un nivel constante la concentración de H^+ y, por consiguiente, el 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 de 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 concentración 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 1.2 mEq/L. Si se incluye además al ácido carbónico y el bicarbonato, el CO_2 total disuelto es de 25.2 mEq/L. Al considerar el pH sanguíneo normal en sangre venosa (7,4) y el pKa del sistema bicarbonato-ácido carbónico (6.1), la ecuación de Henderson-Hasselbalch da un cociente $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$ igual a 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 consecuente 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 o incluso días. 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, por lo que su valor dependerá de diversos factores, pudiendo alcanzar un mínimo de 4.5. 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 intervalo compatible con el funcionamiento adecuado del organismo.

HIPÓTESIS

Si los riñones contribuyen al mantenimiento del equilibrio ácido-base del cuerpo excretando iones hidrógeno (H^+) en la orina y modulando la reabsorción de bicarbonato, entonces el pH de la orina cambiará en respuesta a procesos que generan un aumento en la concentración sanguínea de iones hidrógeno o bicarbonato.

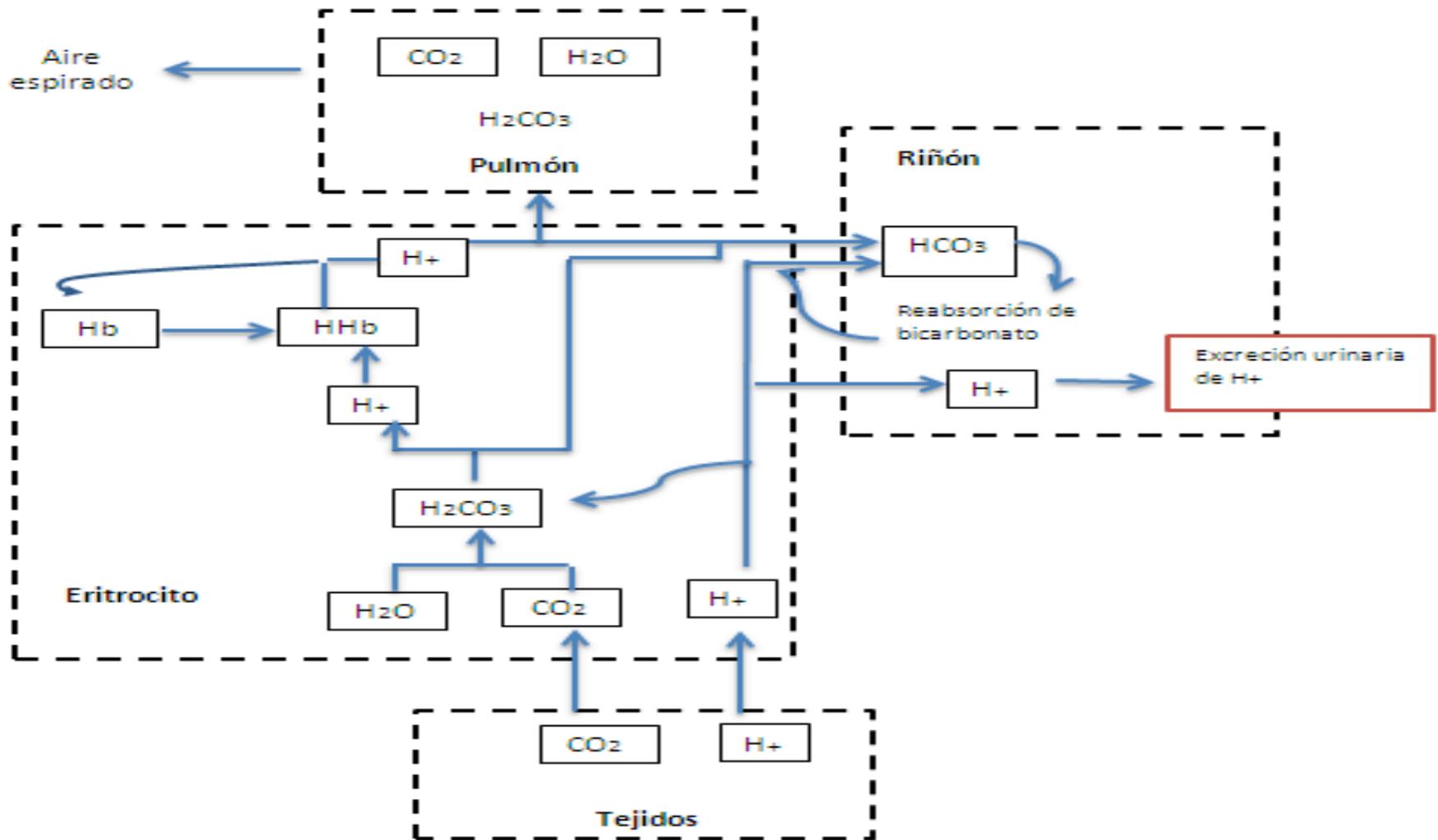


Figura 5 Equilibrio ácido base. Los pulmones, los riñones y los eritrocitos contribuyen a mantener el equilibrio ácido base. Los pulmones controlan el intercambio gaseoso con el aire atmosférico. El dióxido de carbono que se genera en los tejidos, se transporta en el plasma como bicarbonato; la hemoglobina (Hb) del eritrocito contribuye también al transporte del CO_2 . La hemoglobina amortigua el ion hidrógeno derivado del ácido carbónico. Los riñones reabsorben el bicarbonato en los túbulos distales, donde hay una secreción neta del ion hidrógeno

Material

- Vasos de precipitado.
- Orina.
- Potenciómetro.
- Frasco para muestra.

Método

Un alumno por equipo desayunará o comerá normalmente (evitar ingestión de jugos ácidos y bebidas alcohólicas); 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. Recolectar aproximadamente 25 mL de orina en el frasco para muestra
4. Realizar ejercicio muscular intenso, como subir y bajar varias veces las escaleras de tres o cuatro pisos u otro ejercicio sugerido por el profesor.
5. Obtener muestras de orina cada 15 minutos, hasta completar por lo menos cinco muestras.
6. A cada muestra se le determinará el pH inmediatamente después de haber sido obtenida, ya que con el tiempo su valor 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

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 de los riñones en el mantenimiento del equilibrio ácido-base en una situación de alcalosis metabólica (provocada por la ingestión de bicarbonato de sodio) y en una de acidosis metabólica (debida al ejercicio intenso)

Material

- Vasos de precipitados
- 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. Recolectar aproximadamente 25 mL de orina en el frasco para muestra
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.

Análisis de resultados

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. Baynes W. Jhon PhD. Bioquímica médica. 3 ed. Editorial ELSEVIER; 2011 cap 24.
4. Villazón SA, Cárdenas CO, Villazón DO, Sierra UA. Fluidos y electrolitos. México: JGH Editores; 2000.

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 del 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 enzimáticos que existen y estudiará su efecto sobre la K_m y la $V_{máx}$.*

Para lograr los objetivos de esta práctica deberá 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 enzimática?
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?

INTRODUCCIÓN

Las enzimas desempeñan un papel central en los procesos biológicos, ya que son las responsables de degradar y sintetizar las moléculas que nos forman así como de extraer, transformar y utilizar la energía relacionada con estos procesos. 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 sin consumirse en el proceso. El poder catalítico de las enzimas es mucho mayor que el de los catalizadores inorgánicos; en los casos más notables, su actividad solo está limitada por la velocidad con que colisionan con sus sustratos.

Aunque muchas de las reacciones que ocurren en la célula son termodinámicamente favorables, la velocidad a la cual transcurre la mayoría de ellas – en ausencia de un

catalizador - 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 ser reguladas en su actividad en respuesta a las concentraciones de sustrato, así como frente a diversos compuestos que actúan como inhibidores, activadores, reguladores alostéricos, etc. 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 – es decir, aquellas en las cuales 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. Para el caso más simple de una enzima que cataliza una reacción irreversible y que actúa sobre un único sustrato, el modelo postula la idea central de que la enzima y el sustrato libres forman rápidamente un complejo enzima-sustrato; en un segundo paso más lento, este complejo se rompe liberando el producto y regenerando la enzima libre. Lo anterior puede resumirse en la siguiente reacción:



La ecuación de Michaelis-Menten da la relación entre

la velocidad de la reacción catalizada por una enzima y la concentración del sustrato a través de los dos parámetros de la ecuación, V_{max} y K_m (puesta en forma gráfica, la ecuación describe un segmento de hipérbola que parte del origen). La ecuación de Michaelis-Menten puede ser re-arreglada matemáticamente para obtener su forma lineal (ec. de Lineweaver-Burk), lo que permite determinar de manera sencilla los parámetros cinéticos de una enzima. Esta última ecuación es de gran utilidad en el análisis de las diferentes formas de inhibición enzimática.

Dentro de las ciencias médicas, el estudio de las enzimas es de suma importancia, ya que 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. La actividad anormalmente elevada de una enzima particular en el torrente sanguíneo ayuda a diagnosticar el daño específico de un cierto tejido; tal es el caso de la amilasa y lipasa en las patologías pancreáticas y de las transaminasas en las enfermedades hepáticas. Por otra parte, las enzimas también son el blanco de una gran cantidad de fármacos. Se estima que alrededor de un 50% de los medicamentos disponibles comercialmente ejercen su efecto terapéutico actuando sobre una enzima particular (por ejemplo, la aspirina inhibe a la ciclooxigenasa, el omeprazol a la ATPasa de protones y el captopril a la enzima convertidora de angiotensina). 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

hubieran sido posibles sin el conocimiento previo de la estructura y función de estas moléculas fascinantes.

Hipótesis

Si la velocidad de una reacción enzimática depende de la formación de un complejo activo entre la enzima y el sustrato, entonces la velocidad de la reacción variará en función de la concentración del sustrato, alcanzando un valor máximo cuando toda la enzima se sature, es decir, cuando se encuentre en la forma de complejo enzima-sustrato.

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

Fundamento

Para la práctica se utilizará un ensayo acoplado que implica el uso de dos enzimas: aquella cuya actividad se quiere estudiar pero que no es posible monitorear directamente, y una enzima que servirá como auxiliar para poner de manifiesto la actividad de la primera. En el presente caso se utilizarán las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, fungiendo esta última como enzima auxiliar.

La glucosa oxidasa (β -D-glucosa:oxígeno óxido-reductasa, EC1.1.2.4) es una proteína dimérica con un peso molecular de 160 000 y que 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 la glucosa. El ciclo catalítico de la enzima consiste de dos pasos



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



El peróxido de hidrógeno que se forma en el curso de la reacción se descompone mediante la peroxidasa. Esta última cataliza la transferencia de oxígeno del peróxido a un aceptor que es cromógeno, como por ejemplo la ortotoluidina, la ortodiansidina, la 2,2-azino-bis (3-etilbencetiazolin-6-sulfónico) o la 4-amino-antipirina (y fenol), que se colorean al oxidarse, por lo que la intensidad de la coloración del cromógeno oxidado será proporcional a la cantidad de glucosa transformada por la glucosa oxidasa.

Tabla 3.1. Preparación de tubos

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

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 del experimento.
- 2 frascos con solución de enzimas: 41.6 U mL⁻¹ de glucosa oxidasa, 4.6 U mL⁻¹ de peroxidasa, ortodiansidina 0.21 mmol/L .
- Solución de azida de sodio 400 mmol/L (inhibidor).
- Gotero con HCl.

Método I (sin inhibidor)

- 1.- Preparar una serie de tubos como lo indica la tabla 1.
- 2.- Considerar un intervalo de 30 segundos entre cada tubo antes de agregar la enzima.
- 3.- Agitar cada tubo e incubar a temperatura ambiente y **el tiempo de incubación para la reacción enzimática se indicará al inicio de la práctica** * de inmediato detener la reacción agregando 3 gotas de HCl concentrado. Considerar un intervalo de 30 segundos para cada tubo al agregar el HCl.

Leer ambas series de tubos en el fotocolorímetro; utilizar como blanco el tubo 1. **Todos los tubos en la gradilla son tubos Klett.**

Método II (con azida de sodio)

1. Preincubar 20 minutos la solución de enzimas con 0.5 mL del inhibidor.
2. Preparar una segunda serie de tubos tal como se preparó para el experimento en ausencia de inhibidor (tabla 1).
- 3.- Considerar un intervalo de 30 segundos entre cada tubo al agregar la enzima.
- 4.- Agitar cada tubo e incubar a temperatura ambiente y **el tiempo de incubación para la reacción enzimática se indicará al inicio de la práctica, transcurrido el tiempo de incubación** detener la reacción agregando 3 gotas de HCl concentrado. Considerar un intervalo de 30 segundos para cada tubo al agregar el HCl.

***NOTA: El tiempo de incubación para la reacción enzimática se indicara al inicio de la práctica**

Resultados (cuadro 5.2)

1. Calcular la concentración micromolar inicial de sustrato en cada tubo; tomar en cuenta que la solución concentrada de glucosa contiene 40 $\mu\text{mol/L}$.
2. La velocidad será igual a las unidades Klett divididas entre el tiempo de incubación (UK min^{-1})
3. Con los datos obtenidos completar el cuadro 5.2 y hacer las dos gráficas en papel milimétrico.

4. Elaborar una segunda gráfica con los valores de $1/v$ vs $1/[S]$ (gráfico de Lineweaver-Burk).
5. A partir del gráfico doble recíproco calcular el valor de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) 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 estan de acuerdo con la hipotesis planteada.

Tabla 3.2 . Resultados

Tubo	Concentracion de sustrato (μmol de glucosa L^{-1}) ABCISAS (X)	Velocidad de la reaccion (unidades Klett/min) ORDENADAS (Y)	Velocidad de la reaccion con el inhibidor (unidades Klett/min)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Práctica 4

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

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 los sitios I, II y III de la cadena respiratoria? 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.

INTRODUCCION

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. Desde un punto de vista estructural y funcional, esta proteína es

semejante 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^+ de la levadura 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 la ATP sintasa convencional localizada en la membrana interna de la mitocondria, que se encarga de la síntesis del ATP. En contraste con la enzima de la 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. En ambos casos, el factor común es un flujo de protones a través de la membrana.

Hipótesis

Si las levaduras consumen glucosa para metabolizarla y producir ATP, y un porcentaje importante de este último es utilizado por la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, entonces se observará una disminución progresiva en la concentración de glucosa en el medio de cultivo, así como 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 35 mL de agua destilada.
2. Determinar el pH de la solución y repetir la lectura dos veces más con intervalos de 3 minutos para obtener la línea basal.
3. Adicionar 5 mL de glucosa al 10 %, agitar y medir el pH.
4. Determinar el pH de la solución 4 veces con intervalos de 5 minutos, y luego cada 10 minutos 2 veces más.

EXPERIMENTO 2 (DINITROFENOL)

1. Diluir 5 mL de la levadura con 35 mL de agua destilada.
2. Añadir por decantación (no pipetear) 0.2 mL de la solución de dinitrofenol 40 mmol/L para obtener una concentración final de 200 $\mu\text{mol/L}$.
3. Determinar el pH de la solución y repetir la lectura dos veces más con intervalos de 3 minutos para obtener la línea basal.
4. Esperar 5 minutos.
5. Adicionar 5 mL de glucosa al 10 %, agitar y medir el pH.
6. Determinar el pH de la solución 4 veces con intervalos de 5 minutos, y luego cada 10 minutos 2 veces más.

EXPERIMENTO 3 (AZIDA)

1. Diluir 5 mL de la levadura con 35 mL de agua destilada.
2. Añadir por decantación (no pipetear) 0.5 mL de la solución de azida de sodio 400 mmol/L para obtener una concentración final de 5 mmol/L. Agitar con cuidado.
3. Determinar el pH de la solución y repetir la lectura 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 tabla 1

Análisis de resultados

1. Hacer una gráfica de cada uno de los experimentos, utilizando 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).

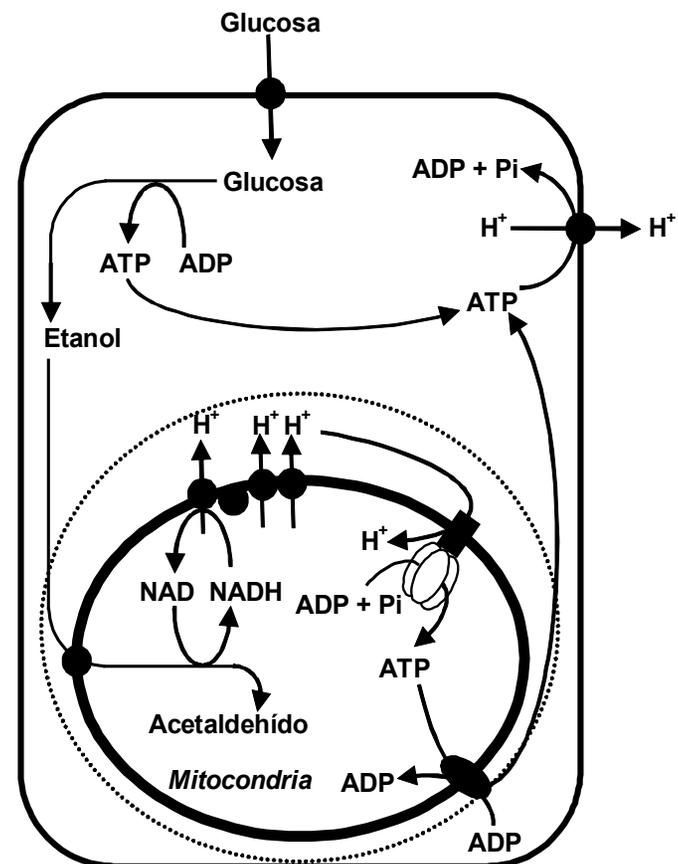


Fig. 7.1

Tiempo (min)	pH		
	Control	Dinitrofenol	Azida de sodio
0 (basal)			
3 (basal)			
6 (basal)			
Agregar 5 mL de glucosa			
0			
5			
10			
15			
20			
30			
40			

Tabla 7.1.- Resultados

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 la glucosa y la insulina después de la ingesta de alimentos y en condiciones de ayuno.*
- 3. Que el alumno sea capaz de entender las curvas de índice glicémico obtenidas con glucosa de diferentes fuentes.*

INTRODUCCIÓN

La glucosa representa una fuente de energía importante en el humano; el funcionamiento adecuado de órganos como el cerebro y células como los eritrocitos depende de un aporte continuo de dicho carbohidrato. Por consiguiente, la concentración de glucosa en sangre debe mantenerse dentro de un intervalo adecuado para satisfacer los requerimientos energéticos del organismo.

En la práctica clínica, la determinación de la concentración de glucosa sanguínea – en condiciones de

ayuno – le permite al médico realizar un diagnóstico adecuado acerca de la homeostasis de la glucosa en un individuo, ayudándole a detectar alteraciones potenciales en dicha homeostasis (p. ej. diabetes).

La concentración de glucosa en sangre está determinada por factores como el estado de alimentación del individuo, situaciones que generen estrés, los niveles de hormonas e incluso la edad.

Algunos minutos después de la ingesta de una comida, aumentan los niveles de insulina sanguínea. La glucosa y algunos aminoácidos de la dieta – tales como la leucina, la isoleucina y la lisina – son estimulantes potentes de las células beta del páncreas, haciendo que éstas secreten insulina. La mayor parte de las células del cuerpo responden al aumento en la concentración de la glucosa sanguínea con un incremento en la velocidad de transporte de la misma hacia el interior de las células. De esta manera, los niveles de glucosa sanguínea aumentan solamente de un 20% a un 40% en los individuos no diabéticos. Es importante señalar que aproximadamente el 80% de la captación de glucosa por los tejidos no depende de la insulina (p. ej. el cerebro, los glóbulos rojos, el hígado y los intestinos) El músculo y el tejido adiposo son los tejidos más importantes que dependen de insulina (ver Tabla anexa). Por otra parte, los niveles crecientes de insulina y glucosa sanguíneas inhiben la lipólisis, así como

aproximadamente el 60% de la liberación normal de glucosa producida por la gluconeogénesis hepática.

La velocidad con la que aumenta la concentración de glucosa en sangre depende notablemente de la fuente del azúcar en la dieta, así como de su abundancia. Así, la ingesta de una solución de glucosa se manifestará más rápidamente en el nivel de glucosa en sangre en comparación con la ingesta de una comida sólida rica en carbohidratos. Ello se debe a que la glucosa contenida en los alimentos no se encuentra en forma libre, sino que está unida en forma covalente a otras moléculas, ya sea a otros monosacáridos como la galactosa o la fructosa – como en la lactosa y la sacarosa, respectivamente – o a otras moléculas de glucosa – como en el almidón – y los enlaces correspondientes deben ser hidrolizados por enzimas específicas en el intestino delgado antes de quedar disponible para su absorción.

En el estado de postabsorción (ayuno temprano) de los individuos normales, disminuye la concentración de insulina en sangre y se incrementa la concentración de glucagón, por lo que baja la relación insulina/glucagón sanguínea, favoreciendo que el glucógeno muscular y hepático sea degradado como una fuente de glucosa. Si el ayuno es de largo plazo, entonces ocurre la degradación de las proteínas a aminoácidos en el

músculo esquelético, y la lipólisis de los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol en el tejido adiposo. El aminoácido alanina y el glicerol son usados para sintetizar glucosa por medio de la gluconeogénesis estimulada por glucagón. Por otra parte, los ácidos grasos libres pueden ser usados como combustible por el corazón, los músculos esqueléticos y el hígado.

Transportador	Órgano o Tejido	Propiedades
GLUT 1	Eritrocitos, barrera hematoencefálica, placenta, retina, riñón y cerebro.	Ingreso basal de glucosa. Km 1.6 mM.
GLUT 2	Hígado, páncreas e intestino delgado	Transportador de glucosa, galactosa y fructosa. Sensor de glucosa en páncreas. Km de 15 mM o más.
GLUT 3	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón.	Ingreso basal de glucosa. Km 2 mM. Transportador de glucosa y galactosa.
GLUT 4	Tejido adiposo, corazón y músculo esquelético.	Dependiente de insulina. Km de 5 mM.
GLUT 5	Yeyuno, espermatozoides, riñón, cerebro.	Transportador de fructosa.

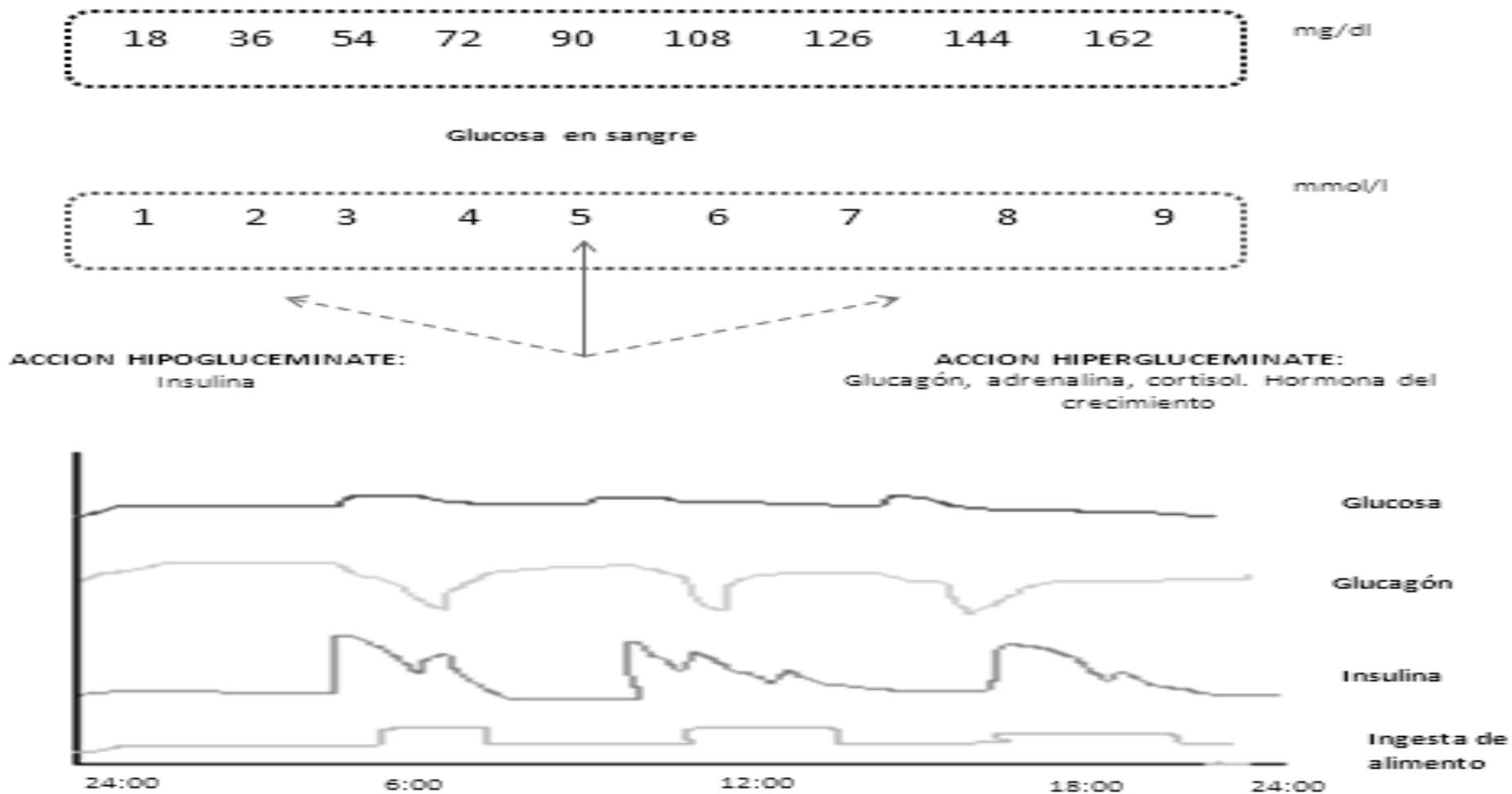


Figura 8. CONTROL HORMONAL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA. La concentración de glucosa plasmática refleja el equilibrio entre la acción hipoglucemiante (disminución de la glucosa) de la insulina y la acción hiperglucemiante (aumento de glucosa) de las hormonas antiinsulínicas. En el gráfico inferior se muestra el patrón diario de secreción de la insulina y del glucagón, así como las variaciones correspondientes en la concentración de glucosa plasmática como resultado de la ingesta de alimentos. La concentración de glucosa se mantiene dentro de un margen relativamente estrecho durante el día.

Determinación de glucosa.

Requisito para la práctica: ayuno de 6-8 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.

Tres voluntarios que hayan ingerido alguna de la siguientes fuentes de glucosa:

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

Método.

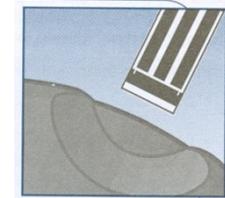
Determinación de glucosa.

A cada uno de los sujetos se le determinará la concentración de glucosa en sangre total – por medio de un glucómetro – en los siguientes tiempos:

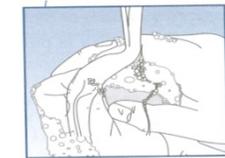
0 minutos (antes de ingerir la carga de los diferentes carbohidratos) y a los 30 minutos, 60 minutos y 90 minutos, después de la ingesta.

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

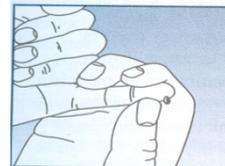
1.- Inserte la tira reactiva en el puerto de análisis, con el extremo de las barras de contacto al frente y mirando hacia arriba. Empújela hasta que no avance más.



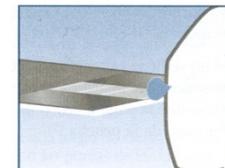
2.- Los estudiantes voluntarios deben lavar sus manos con agua y jabón y desinfectar la zona donde se realizará la punción utilizando una torunda con alcohol.



3.- Puncione el dedo con una lanceta y aplique un masaje suave a la punta de su dedo, lo que le ayudará a obtener una gota de sangre adecuada; no exprima en exceso el área de punción.

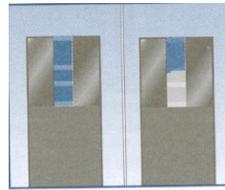


4. Acerque y mantenga la gota de sangre en el canal estrecho del borde superior de la tira reactiva.



Para asegurarse de que la cantidad de sangre es adecuada, utilice como guía los esquemas adjuntos:

a) Muestra adecuada



a)

b)

5.- Llene el capilar del glucómetro, lo que inicia la cuenta regresiva para dar la concentración de glucosa



Con los datos obtenidos completar el cuadro anexo y hacer una gráfica en papel milimétrico de todas las variantes usadas en la práctica

Nombre:	
Edad:	Sexo:
Tiempo (min)	Glucosa (mg/dL)
0	
30	
60	
90	

b) Muestra insuficiente

Es importante desechar con mucho cuidado la lanceta usada, con el fin de evitar que se produzcan lesiones accidentales con la punta de las mismas.

Para el desecho de las lancetas y del material contaminado con sangre siga los siguientes pasos:

- Deposite la lanceta en un recipiente para material punzo cortante.
- Deseche las tiras reactivas, junto con las torundas de algodón empleadas en la práctica, en una bolsa para
- Materialbiológico-infeccioso.

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.

5. BaynesW Jhon, Dominiczak.(2011)Bioquímica médica 3
Edición ELSEVIER MOSBY, España. Capítulo 21

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 gran 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

monocapa de fosfolípidos, colesterol y proteínas o polipéptidos que rodean al núcleo y estabilizan la partícula para que permanezca en solución dentro del plasma. Las principales lipoproteínas 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). La cantidad de colesterol y triacilglicerol presentes en cada tipo de lipoproteína es variable.

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

aterogenicidad (mientras menor sea dicho cociente, mayor es el riesgo de enfermedad cardíaca aterosclerótica). En general, se cree que las lipoproteínas que contienen apoB 100 – un tipo de proteína asociado con las LDL y las VLDL – son potencialmente aterogénicas.

ALTERACIONES DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS Y ATEROGÉNESIS

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 en los sitios de producción o en los de utilización de las lipoproteínas del plasma y provocan varios tipos de hipo e hiperlipoproteinemias; es decir, 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 – p. ej. hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia familiares, deficiencia familiar de lipoproteína lipasa o apoproteína CII, etc – y es de gran valor para describir la alteración lipoproteica subyacente a otros trastornos clínicos, 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 de una elevación en 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 aterogénesis.

Según la hipótesis más aceptada sobre la patogénesis de la aterosclerosis (hipótesis de respuesta a la lesión), cualquier lesión en el endotelio o en el músculo liso de la pared vascular – causada por diversos factores tales como la hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, el estrés mecánico de la hipertensión arterial, agresiones químicas como el tabaquismo, etc. – produce una alteración en 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, que implica 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 – que es un proceso que ocurre normalmente – causan lesión al endotelio, lo que puede ser aterógeno. La formación de anticuerpos contra las LDL oxidadas también puede ser un factor importante en la formación de la placa. Por lo tanto, hay un interés clínico cada vez mayor en la función de los compuestos 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

reportado que las lipoproteínas HDL tienen efectos antioxidantes *in vitro*.

Tradicionalmente, las anomalías en la concentración 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 hiperlipidemia, 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 determinación de colesterol total y TAG, así como de una o más lipoproteínas. Adicionalmente, 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.

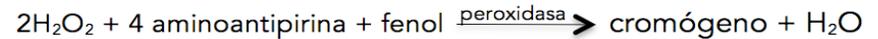
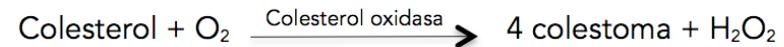
Determinación del colesterol plasmático total. El colesterol total en plasma es igual a la suma del colesterol contenido en las tres lipoproteínas que lo transportan:

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

Además, el colesterol existe en el organismo en dos fracciones: una en estado libre y otra esterificado – esta última representa del 60 al 75%– por lo que, para la determinación del colesterol total, se utiliza una serie de reacciones enzimáticas que comienza con una hidrólisis para dejar libre el grupo 3-OH del colesterol. En la segunda reacción dicho grupo se oxida y se obtiene, como uno de los productos, 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

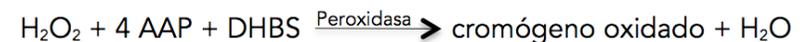
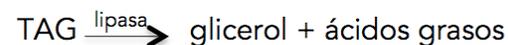
proporcional a la concentración de colesterol. Las reacciones correspondientes, así como las enzimas involucradas, son:

Ésteres de colesterol



Determinación de triacilglicérol. El método utilizado se basa en la hidrólisis completa de los TAG por una lipasa, seguido de la determinación del glicerol liberado en la reacción. Esta última etapa implica la fosforilación del compuesto por la glicerol cinasa, formando glicerol-3-fosfato, el cual es oxidado por la glicerolfosfato oxidasa a fosfato de dihidroxiacetona, generando en la reacción peróxido de hidrógeno. Finalmente, la peroxidasa cataliza la transferencia de oxígeno del peróxido a un aceptor que es cromógeno – como la 4-aminoantipirina (4-AAP) o el 3,5-dicloro-2-hidroxibencensulfonato (DHBS) – que se colorea al oxidarse. La absorbencia del cromógeno oxidado a 520 nm es proporcional a la concentración de TAG.

La secuencia completa de reacciones es:



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

diferentes clases de lipoproteínas, seguido de la determinación de la lipoproteína o del componente lipoproteico de interés.

La determinación es relativamente simple si se precipitan con un polianión (p. ej. heparina, dextran o fosfotungstato acomplejados con Mn^{2+} o Mg^{2+}) todas las lipoproteínas que contienen apoB100 – es decir, VLDL, IDL, LDL y Lp(a) – 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 es un indicador excelente de la concentración de las lipoproteínas ricas en TAG como las VLDL. Esta apreciación parte de que en condiciones de ayuno no se encuentran quilomicrones en el plasma, y la relación TAG/colesterol de las 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 las 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:

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

Es importante enfatizar que estas relaciones no son apropiadas para muestras con una concentración de TAG mayor a 400 mg/dL (10.390 mmol/L) o en muestras que contengan 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 dicho esteroide proporciona una estimación bastante precisa del nivel sanguíneo de las LDL en la mayoría de las personas. Por ello es posible evaluar, con bastante exactitud, la concentración de las LDL sobre la base de la cuantificación de la concentración de las VLDL – estimada por los TAG – y la del colesterol total. No obstante, para determinar con mayor exactitud la concentración de las LDL, debe cuantificarse la concentración de colesterol contenido en las HDL, lo cual es relativamente simple. La concentración de las LDL se estima como sigue:

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

Si se determina la concentración de lípidos en moles/L en lugar de en masa/dL y se sustituye el valor estimado de las VLDL – a partir de la concentración de TAG – la fórmula equivalente se transforma en la expresión descrita por Friedewald (1972):

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

Otra forma sencilla de determinación del colesterol-LDL, aunque indirecta, es el método que utiliza 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 obtenido por la precipitación (colesterol contenido en las VLDL y las HDL).

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

La determinación de las LDL se puede hacer directamente mediante procesos inmunoquímicos que requieren una destreza especial y un equipo específico, por lo que resulta de difícil adaptación para su uso en docencia. La técnica consiste en hacer reaccionar esferas de látex revestidas de 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 el tubo de ensayo que contiene el plasma sanguíneo se almacena en el refrigerador durante una noche. Los quilomicrones, de mayor tamaño y menor densidad – 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 de un individuo en ayunas se considera anormal.

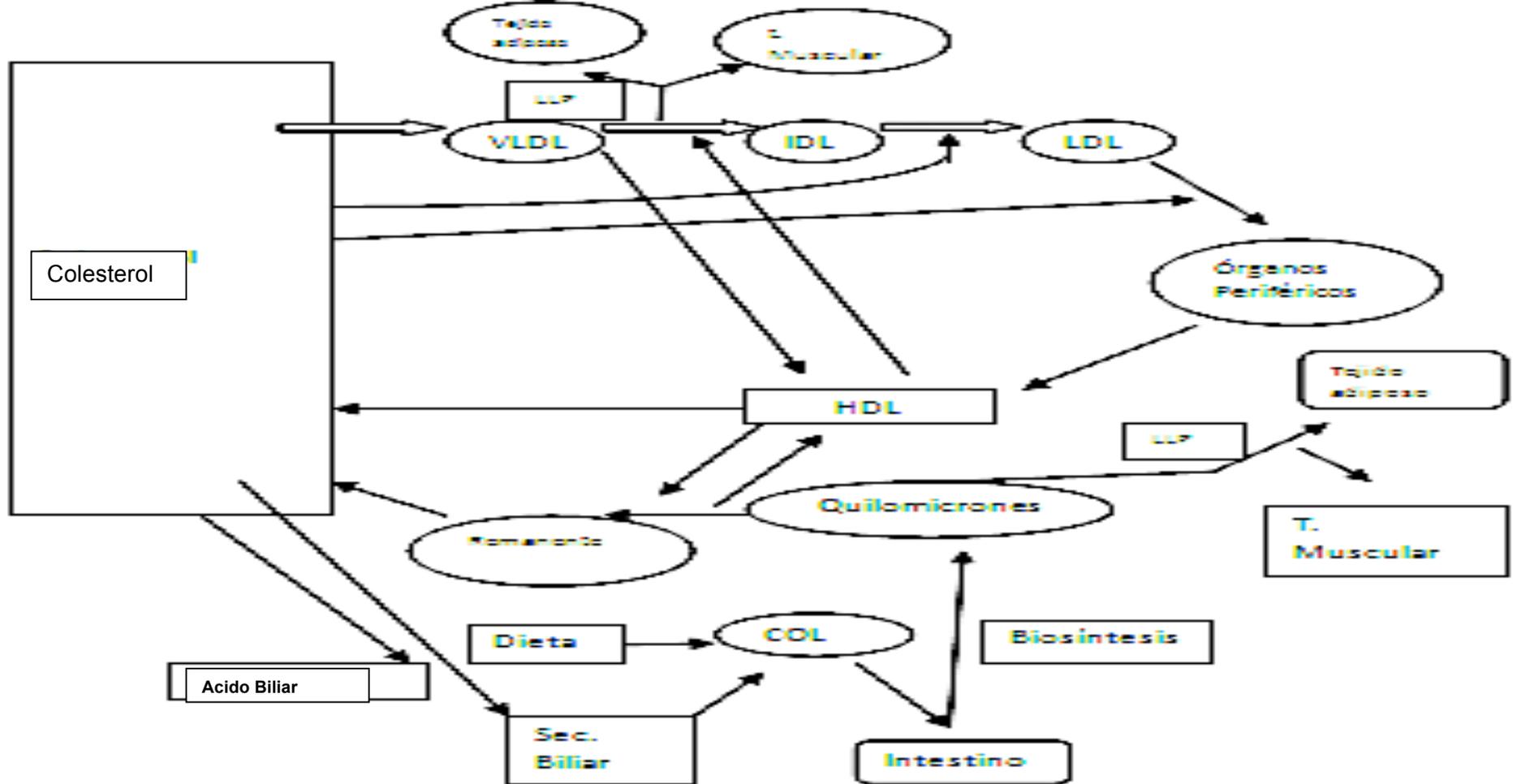
Determinación de Lp(a). Al igual que las LDL, la cuantificación de la Lp(a) se realiza directamente por métodos inmunoquímicos y, como ya se dijo, su evaluación constituye un factor independiente de riesgo coronario. Normalmente, la Lp(a) se precipita junto con las lipoproteínas que contienen apoB, por lo que la determinación

del colesterol de las 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 que 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, así como cuando las LDL y las HDL contienen menor cantidad de ésteres de colesterol y más TAG en su núcleo debido al intercambio de dichos componentes 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 equipo especial, se basan en la identificación inmunológica de las apolipoproteínas. La técnica más usada es el inmunoanálisis ligado a enzimas y a compuestos fluorescentes (ELIHDL).

Figura 9. Metabolismo de lípidos.



Material

- Gradilla con 6 tubos de ensayo.
- Pipetas de 5 y 10 mL.
- Pipetas automáticas
- Puntas para pipetas automáticas
- Solución de enzimas para la determinación de colesterol, que contiene: amortiguador Tris 100 mmol/L (pH 7.7); $MgCl_2$ 50 mmol/L; 4-amino-antipirina 1 mmol/L; fenol 6 mmol/L; colesterol esterasa ≥ 160 U/L; colesterol oxidasa ≥ 100 U/L y peroxidasa ≥ 2000 U/L.
- Solución patrón de colesterol para la determinación de colesterol total (200 mg/dL = 5.17 mmol/L).
- Solución de enzimas para la determinación de TAG, que contiene: amortiguador Tris 100 mmol/L (pH 6.7); ATP 0.7 mmol/L; $MgCl_2$ 4 mmol/L; 4-aminoantipirina 0.4 mmol/L; 3,5-dicloro-2-hidroxibencen-sulfonato 0.8 mmol/L; lipasa ≥ 1000 U/L; glicerol cinasa ≥ 1000 U/L, glicerol fosfato oxidasa 4000U/L y peroxidasa ≥ 2000 U/L.
- Solución patrón de TAG (trioleína) (200 mg/dL = 2.8 mmol/L)
- Reactivo precipitante para la determinación de HDL: sulfato de dextrán 10g/l, $MgCl_2$ 0.5 mol/L.
- Espectrofotómetro para leer densidad óptica.

Método

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

1.- A un tubo eppendorf que ya contiene 20 μ L de la solución precipitante agregarle 50 μ L de plasma; mezclar perfectamente y dejar reposar 10 minutos. Transcurrido dicho lapso, centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante que contiene solamente a las HDL será utilizado para determinar el colesterol-HDL.

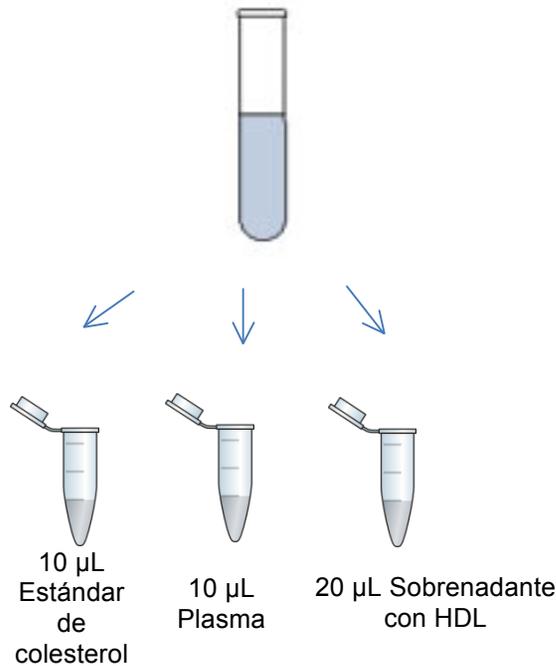
2.- Para la determinación de colesterol total y colesterol-HDL preparar la siguiente serie de tubos:

Preparación de los tubos (volumen en μ L)

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

3.- Agregar a todos los tubos 1 mL de la solución de enzimas para la determinación de colesterol. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

1 mL de solución de enzimas para colesterol



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

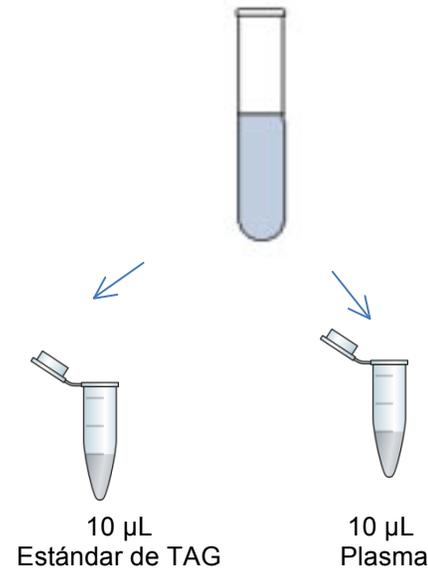
Para determinar los TAG preparar la siguiente serie de tubos:

Preparación de los tubos (volumen en µL).

Tubo	1	2
Estándar de TAG	10 µL	-
Plasma	-	10 µL

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

1 mL de solución de enzimas para TAG



Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

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

Resultados

1. Utilizando la concentración de colesterol de la solución estándar, calcule la concentración de colesterol correspondiente a los tubos 2 y 3 (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.

A_s = Absorbancia del estándar.

A_p = Absorbancia del problema.

2.-Para el cálculo de la concentración de triacilgliceroles se procede de un modo similar:

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

C_s = Concentración del estándar en mg/dL o mmol/L.

A_s = Absorbancia del estándar.

A_p = Absorbancia del problema

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

4.-Calcule la concentración de colesterol-VLDL mediante la fórmula:

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

5.-Calcule la concentración de colesterol-LDL a partir de las concentraciones de colesterol total, HDL y VLDL utilizando la fórmula correspondiente incluida en la introducción de la práctica.

6.-Con los datos obtenidos, estime los cocientes colesterol-HDL/colesterol-LDL y colesterol total/colesterol-HDL (índices aterogénicos).

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

Referencias

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 una persona sana.
- 2.-Que el alumno reconozca los sitios denominados encrucijadas metabólicas y las enzimas reguladoras de las distintas vías.
- 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 conozca las vías que están alteradas en un paciente diabético.

INTRODUCION

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 con la constitución, la edad y la actividad física que se realiza; tanto la falta como el exceso de consumo de alguno – o algunos – de los componentes básicos lleva a diversos trastornos metabólicos.

Metabolismo de los carbohidratos

Aproximadamente entre el 40 y el 45% de nuestra ingesta calórica diaria proviene del consumo de carbohidratos complejos los cuales, al ser digeridos, dan lugar a los diferentes monosacáridos entre los que sobresale la glucosa. Esta última se distribuye por la sangre a las células, siendo la principal fuente de energía. Algunos tipos celulares dependen de la insulina liberada por el páncreas para captar la glucosa, como es el caso de las células musculares. Si el nivel de insulina no es el adecuado, la glucosa permanece en la sangre causando un aumento en su concentración; a esto se le denomina hiperglucemia. Una de las enfermedades que se caracteriza por la hiperglucemia es la diabetes mellitus, la cual se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas. La hiperglucemia crónica de la diabetes puede conducir a lesiones, así como disfunción y fallo de varios órganos (especialmente de los ojos, los riñones, el corazón y los vasos sanguíneos).

En el desarrollo de la diabetes están implicados varios procesos patogénicos; estos van desde una destrucción autoinmune de las células β del páncreas – con la consiguiente deficiencia de insulina – hasta anomalías en las que el páncreas produce suficiente insulina pero los tejidos dependientes no responden a ella. La acción deficiente de la insulina en los tejidos diana es la responsable del metabolismo

anómalo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas en la diabetes. Frecuentemente coexisten en el mismo paciente una secreción inadecuada de insulina así como defectos de la acción de ésta.

A nivel celular, la acción deficiente de la insulina ocasiona una respuesta inadecuada en uno o más puntos de la compleja red de señalización en la que esta hormona tiene un papel esencial.

La mayoría de los casos de diabetes pueden incluirse en dos amplias categorías etiopatogénicas. En el primer caso (diabetes tipo I) la causa es una deficiencia absoluta en la secreción de insulina debido a la destrucción de las células β de los islotes de Langerhans. Los individuos con alto riesgo de desarrollar este tipo de diabetes pueden ser 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 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 que aparezcan los 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 determinando la glucosa plasmática en ayunas o después de una sobrecarga de glucosa por vía oral.

Metabolismo de los lípidos

El exceso en la ingesta de carbohidratos no solamente mantiene la reserva de energía en forma de glucógeno, sino que una parte importante de dicho exceso es convertido en triacilgliceroles. En el hígado, los triacilgliceroles se sintetizan a partir de acil CoA y glicerol 3-fosfato, son empaquetados para su exportación en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y secretados al torrente sanguíneo. Cuando las VLDL llegan al tejido adiposo, los triacilgliceroles son degradados y los ácidos grasos que se liberan se incorporan nuevamente en triacilgliceroles para su almacenamiento. Para su utilización, los triacilgliceroles son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos. En la dieta es crucial la presencia de lípidos, ya que son precursores de diferentes componentes de la célula (p.ej. los fosfolípidos). Un lípido particularmente importante 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 mediante la alimentación y por la síntesis de *novo* en el propio organismo, siendo las células hepáticas y las suprarrenales las de mayor actividad biosintética. Para llevar a cabo la síntesis de colesterol se requiere de acetil-CoA, el cual proviene de la degradación de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. Debido a que el acetil-CoA puede tener diferentes destinos en su metabolismo, se le denomina un metabolito de encrucijada metabólica.

El colesterol es insoluble en agua, por lo que su transporte en la sangre requiere de tres tipos de lipoproteínas, que son las de muy baja densidad (VLDL), las de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL). En un individuo

adulto, los niveles normales de colesterol total en sangre en un adulto son de < 200 mg/dL; cuando estos valores se ven aumentados se asocian a la formación de placas ateroscleróticas, que pueden ocluir los vasos sanguíneos y provocar alteraciones cardiovasculares e incluso infarto al miocardio.

Por lo anterior, es importante la cuantificación de las LDL en sangre, ya que concentraciones elevadas indican el desarrollo de la aterosclerosis.

En el caso de las HDL se presenta una situación inversa, ya que al disminuir su concentración aumenta el riesgo de desarrollar aterosclerosis.

Metabolismo de los compuestos nitrogenados

Las proteínas constituyen la fuente primaria del nitrógeno en el organismo. Los aminoácidos producidos por la digestión de las proteínas que se consumen en los alimentos son utilizados por el cuerpo para la síntesis de sus propias proteínas y de compuestos nitrogenados, o bien pueden ser oxidados para producir energía.

El hígado es el órgano principal en donde se realiza la oxidación de los aminoácidos. El nitrógeno de los aminoácidos forma amoniaco, el cual es tóxico para el organismo. El amoniaco y los grupos amino se convierten en urea en el hígado, molécula 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, que contienen purinas y pirimidinas.

Los nucleótidos son precursores del DNA y el RNA, forman parte de la estructura de muchas coenzimas, y participan en el metabolismo energético, como el ATP.

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. Debido a que tiene una solubilidad limitada, su exceso da como resultado la formación de cristales en regiones del organismo como 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 creatina 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 fosforinasa. La creatina es inestable y se cicla espontáneamente para formar 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.

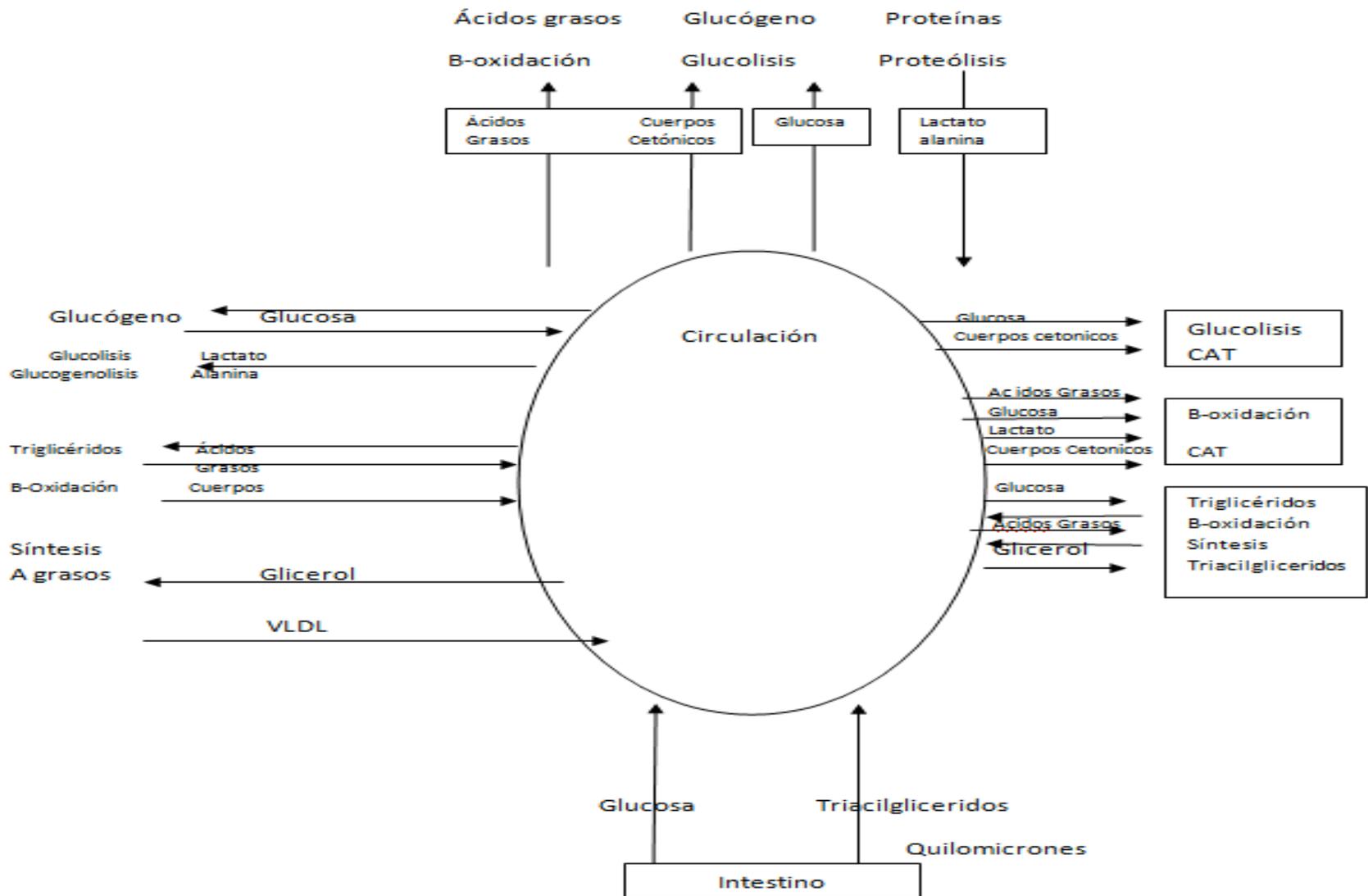


Figura 10. Figura que explica las diferentes vías de manera general y como estas se convergen.

MATERIALES

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 triacilgliceroles.

Dichas determinaciones solo se realizaran al tiempo 0

- Accutrend Roche para determinación de colesterol y triacilgliceroles.
- Tiras reactivas para determinación de colesterol.
- Tiras reactivas para determinación de triacilgliceroles.
- 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.

Nota: La muestra de orina del tiempo 0 es a la que se le realizará el EGO

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 200µL)
- 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)

METODO

Determinación de glucosa

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

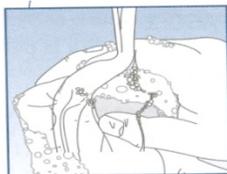
1.-Dos sujetos, uno de los cuales consumirá una dieta rica en carbohidratos y el otro una dieta rica en proteínas.

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:

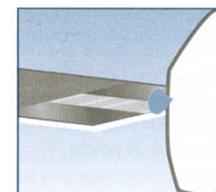
1.- Lave sus manos y limpie con una torunda de algodón con alcohol la zona donde se realizará la punción.



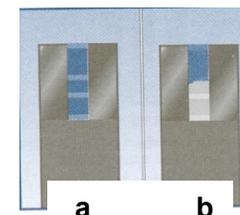
2.- Aplique un suave masaje a la punta de su dedo que le ayudará a obtener una gota de sangre adecuada. No exprima en exceso el área de punción.



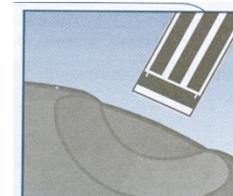
3.-Acerque y mantenga la gota de sangre en el canal estrecho del borde superior de la tira reactiva.



- 4 a) Muestra adecuada
b) Muestra insuficiente



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

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, colóquelas en un recipiente para material punzo cortante.

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

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

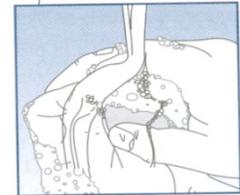
Cuadro 7.1 Resultados

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.



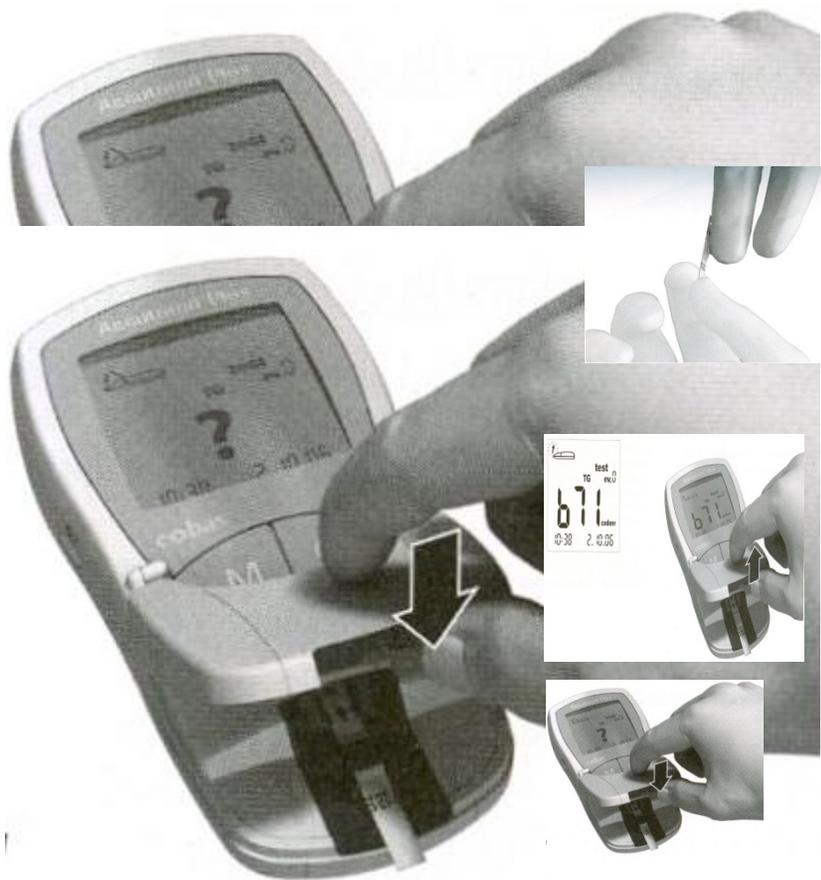
2.- Con la ayuda de unas pinzas extraer una tira reactiva del envase y taparlo inmediatamente para evitar que las tiras se sequen.

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.





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

8.-Anote la lectura

Determinación de urea en orina

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

Tubo	1	2
Muestra	10 µL	--
Estándar	--	10 µL
Solución reactiva para urea	1 mL	1 mL

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



La determinación se realiza en tubos de ensaye Estándar de urea (50 mg/dIL).

Mezclar e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

Tubo	1	2
Orina	100 µL	-
Estándar	-	100 µL
Solución reactiva de ácido úrico	1 mL	1 mL

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.

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

Abs Estándar

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.

Práctica 8

Examen general de orina (EGO)

Objetivos

- 1.-Que el estudiante sea capaz de interpretar o analizar los resultados de un examen general de orina (EGO).*
- 2.-Que el estudiante sea capaz de correlacionar los resultados del examen general de orina (EGO) en un sujeto sano.*
- 3.- Que el estudiante conozca la utilidad del empleo de las tiras reactivas para un diagnóstico presuntivo de las diversas patologías.*

INTRODUCCIÓN

Los riñones excretan de 0.5 a 10 l aproximadamente de orina al día, siendo 0.5 l el mínimo necesario para eliminar los productos del metabolismo, en condiciones fisiológicas normales la orina no presenta glucosa, así como tampoco aminoácidos y pueden presentarse mayores cantidades de aminoácidos debido a diversas fisiopatologías el riñón permite la salida de diferentes compuestos como proteínas.

El análisis de orina se puede llevar a cabo con tiras reactivas, éstas contienen los reactivos y las enzimas en un soporte de plástico que al interaccionar con la orina se desencadena una reacción que se manifiesta con un producto coloreado.

En una tira reactiva se llevan a cabo las siguientes determinaciones:

Urobilinógeno, glucosa, cuerpos cetónicos, bilirrubina, proteínas, nitritos, leucocitos, indicios de sangre, pH y densidad.

La realización del Examen General de Orina (EGO), proporciona información que puede ser útil en el diagnóstico diferencial de enfermedades que se pueden presentar no solo a nivel renal, sino también a nivel hepático, la diabetes así como la preeclampsia.

Examen Físico

El examen comprende la evaluación de color, olor, volumen y densidad.

Color: el color normal de la orina es amarilla y transparente, la presencia de otros colores sugieren una patología.

A continuación se presentan una serie de colores que puede presentar la orina y su posible causa

	leucocituria, bacteriuria, y contaminación fecal.
Blanquecino	Leucocituria, lipiduria y quiluria
Amarillo-naranja	Orina concentrada o la presencia de bilirrubina
Amarillo verdoso	Presencia de bilirrubina-biliverdina
Rojizo	Hemoglobina, eritrocituria, mioglobinuria, porfiria, contaminación menstrual, así como ingestión de betabel o tratamiento con rifampicina
Café-negruzco	Metahemoglobina y melanina

El olor de la orina en condiciones normales es característico, sin embargo algunos padecimientos pueden alterarlo

Olor amoniacal	Infección urinaria
Olor a rancio	Tirosinemia
Olor a ratón	Fenilcetonuria
Jarabe de arce	Enfermedad de jarabe de arce
Olor a pies	Acidemia glutárica

El volumen de la orina solo es influido por la ingesta de agua. Un adulto puede presentar un volumen urinario de 600 a 2,000 ml al día, sin embargo algunas patologías pueden aumentar el volumen de orina como es el caso de la diabetes, también la diuresis osmótica, por el contrario en algunos casos el volumen de excreción puede ser menor y esto como consecuencia de la obstrucción del tracto urinario o la disminución del volumen plasmático.

Color	Posible causa
Pálido	Orina diluida
Obscuro	Fosfatos, uratos, oxalatos,

Gravedad o densidad específica: Indica la cantidad relativa de solutos que contiene un volumen definido de orina, del 70 al 80 % de estos solutos corresponde a la urea.

Electrolitos como el sodio, cloro, urea, fosfatos y sulfatos intervienen de manera importante en la densidad de la orina.

El examen químico comprende: pH, proteínas, glucosa, cetonas, hematuria, bilirrubina, urobilinógeno, nitritos y leucocitos.

pH: Riñones y pulmones trabajan de manera equilibrada para mantener un equilibrio ácido-base en todos los líquidos corporales.

La orina es normalmente ácida, los valores de pH oscilan entre 4.5 a 8.5

Alteraciones del pH urinario

Disminución en el pH	Aumento en el pH
Acidosis metabólicas	Ingestión de bicarbonato
Dietas ricas en proteínas	Utilización de acetazolamida
Cetoacidosis diabética	Neomicina kanamicina
Alcalosis hipokalémica	Kanamicina

Proteínas: Las proteínas circulantes acceden a las células renales y no deben de excretarse más de 150 mg de proteína en la orina de 24 horas, de esta cantidad

aproximadamente la tercera parte es albúmina y el resto se refiere a α , β y γ -globulinas.

La proteína de Tamm-Horsfall (uromucoide) se investiga para confirmar si el sitio de sangrado se localiza a nivel renal.

La presencia en la orina de un exceso de albúmina es un indicador de lesión glomerular o tubular.

Por la cantidad de proteína excretada se puede clasificar en:

Proteinuria leve: menos de 1 gr/día

Proteinuria moderada: entre 1 y 4 gr/ día

Proteinuria grave: mayor de 4 gr por día

Patologías que presentan proteinuria

- Glomerulonefritis
- Enfermedad renal poliquística
- Fiebre
- Diabetes mellitus
- Lupus eritematoso generalizado
- Síndrome nefrótico
- Intoxicación con mercurio, opiáceos
- Obstrucción crónica de las vías urinarias
- Trombosis de la vena renal

Glucosa: Se presentan cantidades detectables de glucosa en la orina, cuando los valores de glucosa sérica se encuentran por arriba de los 180 mg/dl, debido a que superan la capacidad de reabsorción tubular.

Cetonas: La presencia de cuerpos cetónicos como el acetato y el hidroxibutirato productos del metabolismo de ácidos grasos, refieren algún defecto en la utilización de los

carbohidratos de la dieta, por lo que se asocia a diabetes mellitus descontrolada.

Sangre: La tira reactiva positiva indica tres posibilidades

- **Hematuria:** La presencia de células sanguíneas en orina y puede presentarse en traumatismos de los órganos urinarios, lesiones neoplásicas, hemofilia, glomerulopatías, cálculos, lupus eritematoso generalizado, así como en padecimientos hematológicos y pacientes que utilizan anticoagulantes.
- **Mioglobinuria:** Indica la presencia de mioglobina en orina y es una proteína que se libera de las células musculares y la patología asociada es el daño muscular severo que puede ser causado por convulsiones, ejercicio prolongado, shock eléctrico.
- **Hemoglobinuria:** Es secundaria a crisis hemolíticas de cualquier etiología

Bilirrubina: Una reacción positiva indica enfermedades hepáticas. La presencia de trazas refiere realizar una investigación con enzimas hepáticas.

Este metabolito proviene de la hemoglobina de los eritrocitos que son destruidos en el sistema retículo endotelial distribuido en todo el organismo, la Hb es transportada al hígado donde se lleva a cabo su conjugación, misma que le permite ser filtrada a través del glomérulo renal. Por el contrario la bilirrubina no conjugada o indirecta no es capaz de pasar a la orina.

Urobilinógeno: Éste deriva principalmente de la bilirrubina transformada por acción de bacterias intestinales, parte del urobilinógeno es excretada por las heces y una mínima fracción es removida por el hígado, llevado al riñón para ser excretada y finalmente dar color a la orina.

Se encuentra en la orina cuando hay un aumento de bilirrubina no conjugada en sangre, por ejemplo en anemias hemolíticas.

Alteraciones del urobilinógeno y la bilirrubina

	Color	Enfermedad hemolítica	Enfermedad hepática	Enfermedad obstructiva
Urobilinógeno urinario	Normal	Incrementado	Incrementado	Bajo o ausente
Bilirrubina urinaria	Negativa	Negativa	Positiva o negativa	Positiva

Nitritos: Su presencia en orina sugiere la posibilidad de infección urinaria, incluso en pacientes asintomáticos. El ácido ascórbico puede dar resultados falsos negativos y esto no indica ausencia de infección, ya que algunos gérmenes no producen nitritos. La enzima reductasa bacteriana metaboliza los nitratos urinarios en nitritos, lo que indica presencia de bacterias.

Leucocitos y bacteriuria: Se aceptan 5 células por campo y cuando esta cifra es superada se sugiere infección, la presencia de leucocitos en orina, se denomina piuria.

Las tiras reactivas detectan a estas células por la presencia de esterasas producidas por los neutrófilos. La leucocituria es muy valiosa para detectar infección.

Material

Vaso con tapa para la muestra de orina
Muestra de orina
Tira reactiva para examen general de orina
Recipiente para desechos biológicos

Método

1.-Para la toma de muestra: El alumno deberá recolectar del chorro intermedio de la orina y deberá ser la primera orina de la mañana

2.-Una vez obtenida la muestra, observar el color y la claridad de la muestra.

3.-Tomar con una pinza la tira reactiva.

4.-Poner en contacto la tira reactiva con la orina evitando el exceso de la misma. Leer los resultados de acuerdo con la etiqueta de colores del frasco.

5.-Anotar los datos en la tabla de resultados.

NOTA: Debido a los horarios en que se realizan las prácticas y considerando que en la práctica de integración se requiere de una muestra de orina, la determinación de EGO se realizara en dicha práctica con la muestra del tiempo cero, sin olvidar las condiciones en que debe ser tomada la muestra, sin embargo por fines prácticos no se podrá cumplir con este requisito para todos los grupos.

Referencias

1. Diana Nicoll; Stephen McPhee; Michael Pignone. Manual de pruebas diagnosticas. Manual Moderno. 4ª. Edición.

2. Jacques Wallich. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. Masson. 4ª. Edición

3. G. Ruíz reyes; A. Ruíz Argüelles Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio., 2010, Editorial Panamericana. 2ª. Edición.

4. John W Baynes y Marek H Dominiczak. Bioquímica Médica. Elsevier Mosby. 3ª Edición.

Prueba	Valores de referencia	Resultados
Densidad	1.016 a 1.0035	
pH	4.5 a 8.5	
Sangre	Ausencia	
Leucocitos (esterasa)	Ausencia	
Nitritos	Ausencia	
Proteína	Ausencia	
Bilirrubina	Ausencia	
Glucosa	Ausencia	
Cuerpo cetónicos	Ausencia	
Urobilinógeno	Ausencia	

Tabla de resultados



Práctica 9

Pipeteo

Tiempo de práctica: 1 hora

Objetivos

1. Que el estudiante adquiera la habilidad de pipetear cantidades de volúmenes pequeños, del orden de microlitros (μl).
2. Que el estudiante adquiera la destreza para colocar la muestra en los pozos del gel de agarosa.
3. Que el estudiante considere la importancia de seguir correctamente la metodología para obtener los resultados deseados.

JUSTIFICACIÓN

Para realizar la práctica de pipeteo es importante que los alumnos consideren las cantidades de volúmenes que van a manejar, por lo que la siguiente práctica les proporcionará un ensayo previo de la original, con la idea de tomen en cuenta pequeños detalles que pueden modificar el resultado deseado.

NOTA: Todo el material que se proporcione será una simulación del original.

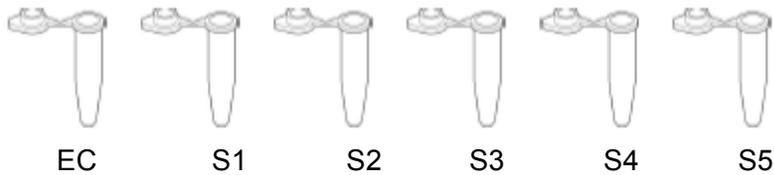
MATERIAL

- Tubo verde con 10 μl de DNA de la escena del crimen
- Tubo azul con 10 μl DNA del sospechoso 1
- Tubo naranja con 10 μl DNA del sospechoso 2
- Tubo violeta con 10 μl DNA del sospechoso 3
- Tubo rojo con 10 μl DNA del sospechoso 4
- Tubo amarillo con 10 μl DNA del sospechoso 5
- Mezcla de enzimas de restricción *EcoRI/PstI*, 1800 U, con 80 μl
- Marcador de DNA de fago lambda digerido con Hind III 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 12 μL
- 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.
- Cámara horizontal de electroforesis.
- Microcentrífuga

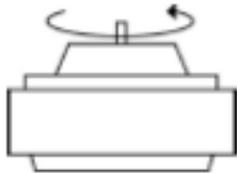
PROCEDIMIENTO

- 1.-Se le proporcionará a cada equipo una gradilla con cada uno de los tubos conteniendo los 10 μl de la muestra. Rotular cada uno de los microtubos de la siguiente forma:

Verde EC= Escena del crimen
 Azul S1= Sospechoso 1
 Naranja S2= Sospechoso 2
 Violeta S3= Sospechoso 3
 Rojo S4= Sospechoso 4
 Amarillo S5= Sospechoso 5



2.-Observar cuidadosamente que los 10 µl de la muestra se encuentren en el fondo del tubo, si se encuentra dispersa en la paredes del mismo, con la ayuda de una centrifuga, dar un pulso para que todo el líquido quede en el fondo del tubo.



Microcentrifuga

3.-Pipetear 10 µL de la mezcla de enzimas en el fondo de cada tubo. Tener cuidado de cambiar la punta para cada muestra, para evitar contaminación.



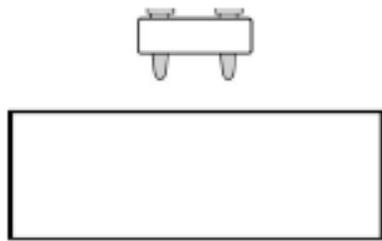
4.-Tapar los tubos y mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo, posterior a la agitación, proceder como lo indica el punto 2.



Golpear con el dedo

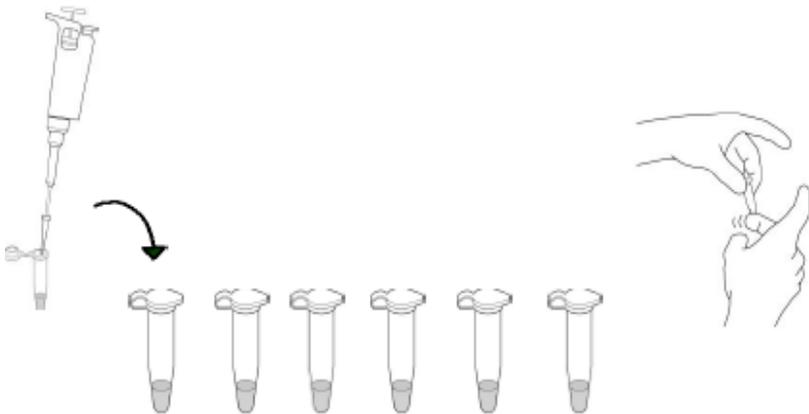
5.-Colocar los tubos en una gradilla e incubar a 37 ° C por 45 minutos.

Nota: en este caso no se realizará pero si considerarlo para la práctica original, ya que en este caso es solo una simulación



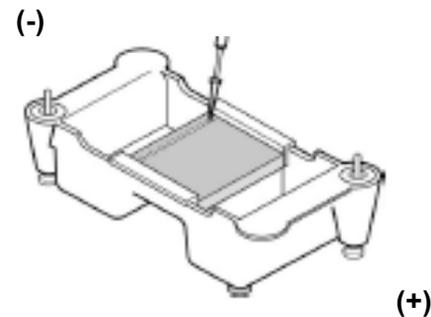
Baño

6.-Utilizando una pipeta diferente para cada muestra, añadir 10 μ L del amortiguador de carga en cada tubo. Cerrar los tubos y mezclar los componentes golpeando suavemente con los dedos y repetir lo indicado en el punto 2.



7.-Colocar un gel de agarosa en la cámara de electroforesis. Llenar la cámara con buffer de corrida hasta cubrir el gel, compruebe que los pozos del gel están del lado del electrodo

negro (-) y que la base del gel está del lado del electrodo rojo (+).

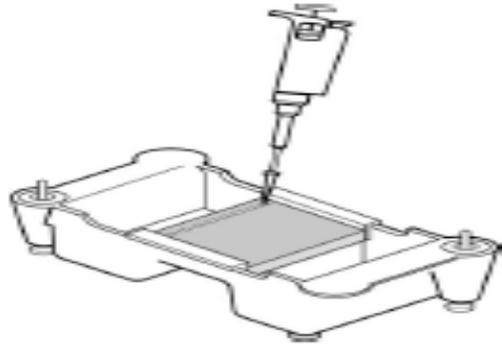


8.-Utilizando una punta de pipeta diferente para cada muestra, cargar el gel de la siguiente manera:

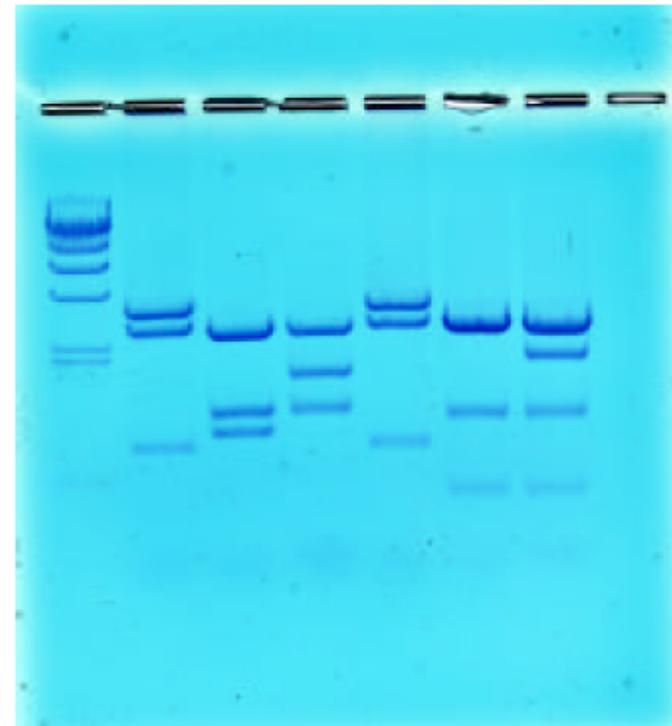
- Pozo 1: Marcador de peso molecular (PM)
- Pozo 2: Sin muestra
- Pozo 3: Verde EC= Escena del crimen
- Pozo 4: Azul S1= Sospechoso 1
- Pozo 5: Naranja S2= Sospechoso 2
- Pozo 6: Violeta S3= Sospechoso 3
- Pozo 7: Rojo S4= Sospechoso 4
- Pozo 8: Amarillo S5= Sospechoso 5

Nota: En el momento de depositar la muestra en el pozo, tomar la micropipeta de manera normal (con la mano derecha) y apoyar con la mano izquierda la punta de la micropipeta para obtener mayor equilibrio, introducir la punta de la micropipeta en el pozo de forma que no se rompa el gel, ya que de esta manera el pozo se quedaría vacío.

Otra indicación es que cuando la punta de la micropipeta se encuentre en el pozo irla subiendo poco a poco y al mismo tiempo dejar caer la muestra lentamente para que el espacio que ocupa la punta no obstruya el espacio del pozo y la muestra no salga del mismo. Tratar de no contaminar los pozos con las otras muestras a la hora de cargar el gel.



Hasta este paso se considera la simulación de la práctica con el objetivo de obtener los siguientes resultados



PM EC S1 S2 S3 S4 S5

Nota: Considerar que el patrón puede ser modificado.

Referencias

1. Biotechnology Explorer DNA Fingerprinting Kit Instruction Manual BIORAD.

Práctica 10

Huella génica

Tiempo de práctica: 3 hora

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.*

INTRODUCCIÓN

El DNA es un polímero lineal formado por desoxirribonucleótidos que contienen a las bases nitrogenadas adenina, guanina, citosina y 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 desoxirribosa y al carbono 3' de la otra desoxirribosa del nucleótido contiguo.

Las cadenas se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases.

En la molécula de DNA 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. Hay un total de 64 codones, los cuales conforman el código

genético. En ciertas regiones del DNA una de las hebras tiene la misma secuencia del RNA mensajero y se le llama hebra sentido o codificante y a la complementaria hebra antisentido o molde. La hebra que se transcribe para dar al RNAm es la antisentido o hebra molde.

Algunas de las secuencias de nucleótidos no codificantes se caracterizan por ser cortas, estar alineadas en tándem y repetirse 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 (Short Tandem Repeat). 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, por lo que se consideran como 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 "huella génica", 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 como son la sangre, la saliva, la piel, el músculo, el cabello, el semen, los dientes y el hueso, entre otros, a partir de las cuales se puede extraer el DNA.

Un método que permite tomar una pequeña cantidad de DNA y en pocas horas sintetizar millones de copias de una región del mismo, es el conocido como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el cual fue desarrollado 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 (CEBADOR). La muestra de DNA se coloca en una solución que contiene una DNA polimerasa, grandes cantidades de los cuatro y los dos desoxiligonucleótidos sintetizados previamente. El método se basa en un ciclo 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.

La obtención de múltiples copias requiere 20 a 40 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. 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

1. Curtis, H; Barnes, N; Biología. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana.
2. Lewin, B; Genes VI. Editorial Oxford.
Nelson, D; Cox, M; Lehninger. Principios de Bioquímica. Tercera edición. Ediciones Omega.
3. Yuri Sivolap, Ph.D., G. Krivda, Ph.D., N. Kozhuhova., 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.
4. Lennie Pineda Bernal. El análisis de DNA para pruebas de paternidad e identificación forense. Acta Científica Venezolana. 50: 24-28, 1999.
5. 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.

6. 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.

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

8. Mullis K.B the Unusual Origin 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 un golpe en la cabeza, y había señales de forcejeo en su brazo; 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 es de la víctima o de 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 fué 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 permitan 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.
- Amortiguador de carga
- 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.
- Microcentrifuga

PROCEDIMIENTO

1.- Cada uno de los microtubos de colores que se les proporcionen ya contienen los 10 µL de la muestra:

- 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 microtubos marcados en la gradilla.

3.-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

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

5.-Coloque los microtubos en la gradilla e incúbelos a 37°C por 30 minutos.

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

7.-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)**].

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

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

- a) Carril 1: marcador de peso molecular, *Hind*III, 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

10.-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.

11.-Encienda la fuente de poder. Ajuste el voltaje a 120 V y realice la electroforesis por 40– 60 minutos.

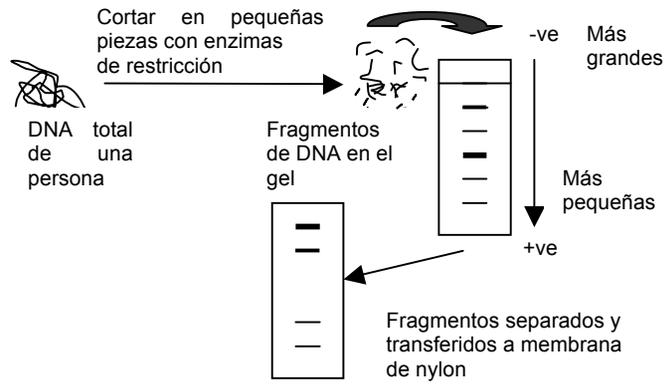
12.-Detenga la electroforesis cuando el colorante muestra llegue a una distancia aproximada de 2 cm del final del gel. Apague la fuente de poder, remueva la tapa y retire cuidadosamente el gel.

13.-Coloque en una charola 120 mL de la solución teñidora 100X y el gel, asegurándose que se encuentre sumergido en la solución. Tiña los geles por 2 minutos y recupere el colorante en el envase original.

14.- 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 para poder hacer la comparación de las muestras.

Referencias

1. Biotechnology Explorer DNA Fingerprinting Kit Instruction Manual BIORAD.



APENDICE

SOLUCIONES

Para el tratamiento de los pacientes en la clínica se utilizan básicamente 2 familias o grupos de soluciones: cristaloides y coloides. En el grupo de cristaloides se encuentran soluciones con base en dextrosa, soluciones con base en el contenido de cloruro de sodio y otros líquidos incluyendo Lactato de Ringer. La concentración de electrolitos, tonicidad y osmolaridad pueden variar según cada formulación (Tabla 1). En la familia de los coloides se encuentran la albumina, almidones, dextranses y gelatinas.

Solución	Na ⁺ mEq/L	Cl ⁻ mEq/L	K ⁺ mEq/L	Ca ⁺⁺ mEq/L	Lactato	pH	Tonicidad con Plasma	Osmolaridad (mOsm/L)
Glucosada 5%	0	0	0	0	0	5.0	Isotónico	253
Salina 0.9%	154	154	0	0	0	5.7	Isotónico	308
Ringer Lactato	130	109	4	3	28	6.7	Isotónico	273
Hartman	130	109	4	3	28	6.5	Isotonico	274

Tabla 1. Composición de soluciones parenterales comerciales

Pero no solamente el manejo de soluciones se encuentra dentro de la clínica sino que en el laboratorio, el trabajo con órganos aislados también exige la preparación de un medio artificial (solución fisiológica) que reúna en el aspecto osmótico y en la

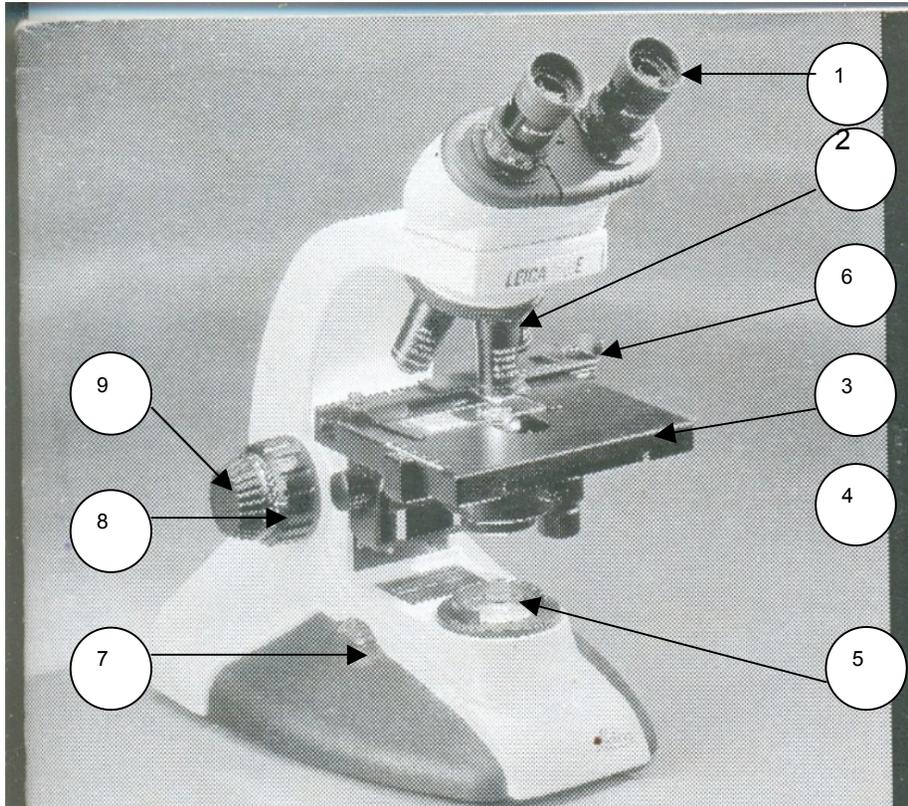
concentración individual de cada ión, las condiciones próximas a la normalidad fisiológica.

Concentración normal de electrolitos

Electrolito	Plasma		Líquido intersticial
	mg/dL	meq/L	meq/L
Cationes			
Sodio	326.0	142.0	144.0
Potasio	16.0	4.0	4.0
Calcio	10.0	2.5	2.5
Magnesio	2.5	1.5	1.5
Aniones			
Cloro	362.0	103.0	114.0
Bicarbonato	60.0	25.0	30.0
Fosfato	3.5	2.0	2.0
Sulfato	1.5	1.0	1.0
Ácidos orgánicos	15.0	5.0	5.0
Proteínas	7000.0	14.0	0.0

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. (pág. 50)
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:

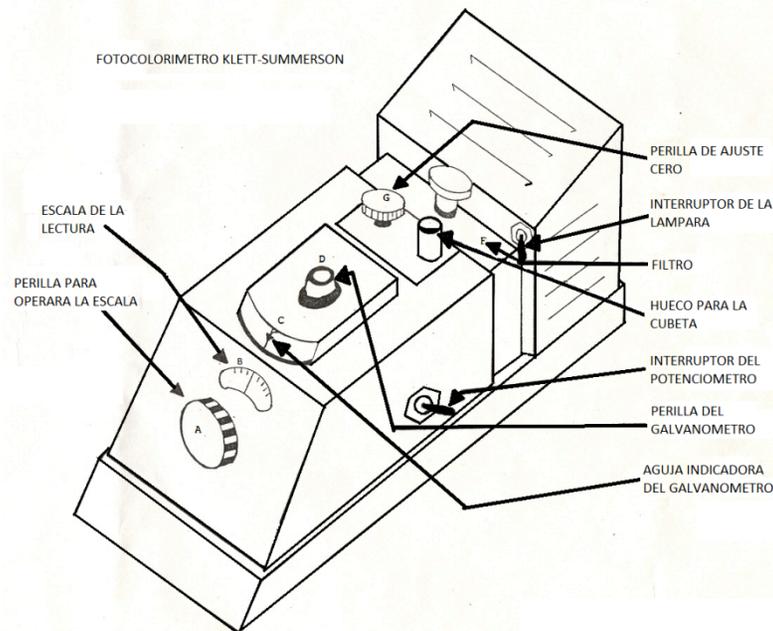
- 1) Oculares.
- 2) Revolver con 4 objetivos 4X, 10X, 40X y 100X.
- 3) Platina.
- 4) Diafragma.
- 5) Lámpara.
- 6) Tornillo de la platina para desplazar la muestra.
- 7) Interruptor de control de la iluminación.
- 8) Tornillo macrométrico.
- 9) Tornillo micrométrico.

Instrucciones para la operación del fotocolorímetro Klett-Summerson

1. Antes de encender el fotocolorímetro cerciőrese 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 est apagada.
3. Ajuste la escala del potencmetro (B) a cero usando la perilla (A).
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Continúe con la lectura de otros problemas y, de vez en cuando, compruebe el cero con el "blanco."



USO DE GLUCOMETRO

Partes del glucómetro



Lancetas



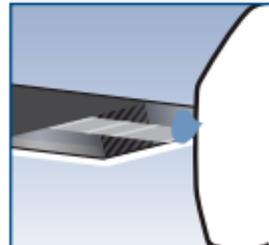
Paso 1.

Inserte una tira reactiva en el puerto de análisis, con las barras de contacto de la tira hacia arriba y mirando hacia arriba.

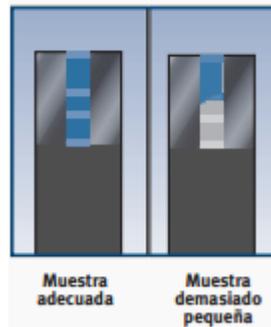
Introdúzcala firmemente hasta que no avance más. El medidor se encenderá y aparecerán brevemente todos los segmentos de la pantalla. Luego aparecerá el número de código, seguido por el símbolo y mg/dL.



Paso 2. Aplique la muestra. Obtenga una gota de sangre utilizando el dispositivo de punción. La muestra de sangre debe tener al menos un microlitro (1 μ l) de volumen (gota de sangre en tamaño real) para llenar la ventana de confirmación.



Mantenga la gota de sangre en el borde superior de la tira reactiva hasta que la ventana de confirmación esté completamente llena de sangre, antes de que el medidor comience la cuenta regresiva. Si la ventana de confirmación no se hubiera llenado por completo antes de que el medidor comience la cuenta regresiva, no añada más sangre a la tira



reactiva; deseche la tira y comience de nuevo la prueba

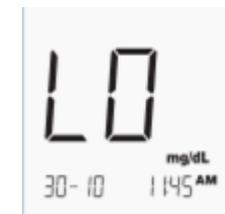
Paso 3

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



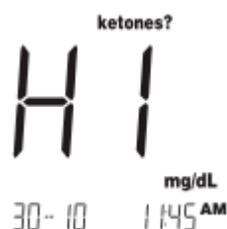
MENSAJES ESPECIALES

Si el resultado de su prueba es inferior a 20 mg/dL, aparecerá lo (Bajo) en la pantalla del medidor. Esta condición podría indicar una hipoglucemia grave. Aunque este mensaje podría deberse a un error de la prueba



Si el resultado de su prueba es superior a 600 mg/dL, aparecerá h1 (Alto) en la pantalla del medidor.

Esto podría indicar una hiperglucemia grave (alto contenido de glucosa en sangre).



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. Las tiras reactivas y las lancetas usadas posiblemente se consideren en su área como un desecho de riesgo biológico.

USO DEL ACCUTREND



PASO 1. Coloque el instrumento sobre una superficie plana y sin vibraciones, a continuación enciéndolo presionando el botón.



PASO 2. Asegúrese de que la pantalla está iluminada.



PASO 3. Con la tapa cerrada, introduzca la tira de codificación, hasta el tope y luego retírela de inmediato.



PASO 4. Si la codificación se ha realizado correctamente, el instrumento emitirá un breve pitido. Si se ha producido un error, repita el proceso transcurridos unos segundos.

PASO 5. Extraiga una tira reactiva del tubo y ciérrelo de inmediato para evitar que el desecante pierda su efecto.



PASO 6. Sujete la tira reactiva según se indica e introdúzcala a hasta el tope. Si la tira se ha introducido correctamente, el instrumento emitirá dos pitidos.

PASO 7. Abra la tapa de la cámara de medición.



PASO 8. Utilice el dispositivo de punción, para obtener una muestra de sangre del dedo o del lóbulo de la oreja

PASO 9. Para la aplicación de la muestra de sangre en el instrumento:

Aplique la gota de sangre directamente en la zona de aplicación amarilla de la tira reactiva, la zona amarilla debe quedar completamente cubierta. NO toque la zona de aplicación con el dedo. NO aplicar una segunda gota. La sangre debe aplicarse en un espacio de 15 segundos tras la punción para evitar un resultado incorrecto debido al inicio de la coagulación.



PASO 10. Para la aplicación de la muestra de sangre fuera del instrumento:
Extraiga la tira reactiva y deje la tapa abierta. Aplique la sangre directamente desde el lugar de la punción. NO toque la zona de aplicación con la piel.



PASO 11. Vuelva a introducir la tira reactiva en el instrumento y cierre la tapa.



VALORES DE REFERENCIA

Glucosa		70 -105 mg/dL
Urea		6 - 20 mg/dL
Creatinina		0,7 - 1,5 mg/dL
Depuración de Creatinina	Hombres	97 - 137 mL/min/1,73m ²
	Mujeres	88 - 128 mL/min/1,73m ²
Ácido úrico	Hombres	3,4 - 7,0 mg/dL
	Orina	250 - 750 mg/24 h
Proteínas totales	LCR	6,6 - 8,7 mg/dL
	Orina 28 - 141 mg/24H	15 - 45 mg/dL
		1,0 - 15,0 mg/dL
Albúmina		3,5 - 5,5 mg/dL
Bilirrubina	Total	0,32 - 1,08 mg/100 mL
	Conjugada	0,10 - 0,50 mg/100 mL
	No conjugada	0,08 - 0,72 mg/100 mL
Globulina		1,46 - 2,54 mg/dL
Mucoproteínas		1,9 - 4,9

		mg/dL
Microalbuminuria		Negativo
Fibrinógeno		180 - 350 mg%
Saturación de transferrina		20 - 50 %
Fijación del hierro		250 - 410 µg/dL
Colesterol		140 - 200 mg/dL
HDL	Hombres	55 mg/dL
	Mujeres	65 mg/dL
LDL		130 mg/dL
Triglicéridos		80 - 150 mg/dL
Lípidos totales		400 - 800 mg/dL
Fosfolípidos		150 - 200 mg/dL
Fructosamina		Hasta 285 µmol/L
Hb Glicosilada Total	Total	5,3 - 9,0 %
Hb Glicosilada A1C	A1C	4 - 5 %
Calcio iónico		4,0 - 5,4 mg/dL
Calcio	Orina	8,8 - 11,0

		mg/dL
		60 - 180 mg/24 h
Hierro sérico		250 -460 µg/dL
Sodio	Orina	40 - 220 mg/24 h
	Sangre	136 -145 mEq/L
Potasio	Sangre	3,6 - 5,5 mmol/L
Cloro	Orina	98 - 107 mmol/L
		110 - 250 mg/24 h
Fósforo	Niños	3,0 - 7,0 mg/dL
	Adultos	2,5 - 4,8 mg/dL
	Orina	340 - 1000 mg/24 h
Amilasa		Hasta 95 U/L
Lipasa		10 -150 U/L
Fosfatasa ácida total	Hombres	Hasta 6,50 U/L
	Mujeres	Hasta 5,50 U/L
Fosfatasa ácida prostática		Hasta 2,6 U/L
Fosfatasa alcalina	Adultos	98 - 279 U/L
	Niños	151 - 471

		U/L
TGO, transaminasa glutámico-oxalacética (Sinón: AST, aspartato aminotransferasa)		10 - 34 U/L
TGP, transaminasa glutámico-pirúvica (Sinón.: ALT, alanino aminotransferasa)		5 - 59 U/L
Colinesterasa		1000 - 4000 U/L
Deshidrogenasa láctica DHL		210 - 420 U/L
CPK	Hombres	24 - 195 U/L
	Mujeres	24 - 170 U/L
Gamma GT		0 - 51 UI/L
Aldolasa		Hasta 5,7 U/L

Colaboradores

OBJETIVOS DEL CURSO

Guillermo Álvarez Llera

Patricia del Arenal Mena

Alicia Cea Bonilla

Leonor Fernández Rivera Río

Rebeca Milán Chávez

Sara Morales López

Celia Virginia Sánchez Meza

SYLLABUS

Guillermo Álvarez Llera (agua, ciclo de Krebs, oxidación de los aminoácidos, química y metabolismo de carbohidratos, química y metabolismo de lípidos).

Patricia del Arenal Mena (ciclo celular).

Alicia Cea Bonilla (fundamentos del metabolismo, proteínas, enzimas y coenzimas, estructura de carbohidratos, metabolismo de carbohidratos, regulación de la glucemia, regulación del metabolismo de lípidos, síntesis y degradación de fosfolípidos, regulación e integración metabólica, biología molecular).

Leonor Fernández Rivera Río (nucleótidos).

Óscar Flores Herrera (figuras: ciclo energético, vías que siguen los protones en las levaduras, ciclo de Krebs y esquema de un potenciómetro).

Alberto Hamabata Nishimuta (aspectos básicos de fisicoquímica, niveles de regulación de la expresión genética).

Noemí Meraz Cruz (síntesis y degradación de fosfolípidos, regulación del metabolismo de lípidos).

Rebeca Milán Chávez (equilibrio hidroelectrolítico).

Sara Morales López (agua, química y metabolismo de carbohidratos, química y metabolismo de lípidos).

Celia Virginia Sánchez Meza (tabla periódica, enlaces, fundamentos del metabolismo, equilibrio hidroelectrolítico, proteínas, radicales libres, descarboxilación del piruvato, regulación de la glucemia, síntesis y degradación de fosfolípidos, metabolismo del colesterol, estructura y metabolismo de las lipoproteínas, regulación del metabolismo de lípidos).

Haydée Torres Guerrero (modificaciones postraduccionales).

Aída Uribe Medina (características de la materia viva).

Alejandro Zentella Dehesa (virus, oncogenes y transformación).

INTRODUCCIÓN AL MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Alicia Cea Bonilla (potenciometría y electroforesis).

Rébeca Milán Chávez (gota).

Celia Virginia Sánchez Meza.

ELABORACIÓN O REVISIÓN DE LAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

1. Soluciones. *Celia Virginia Sánchez Meza y Rebeca Milán Chávez*.
2. Regulación del equilibrio ácido-base después de ejercicio muscular intenso y de la ingestión de bicarbonato de sodio. *Concepción González López, Celia Virginia Sánchez Meza y Juan Luis Rendón Gómez*.
3. Cinética enzimática. Efecto de la concentración del sustrato en la velocidad de la reacción enzimática. *Celia Virginia Sánchez Meza, Rebeca Milán Chávez y Jesús Antonio Oria Hernández*.
4. Estudio del bombeo de protones por levaduras; efecto de los inhibidores de la cadena de transporte de electrones y de los desacoplantes. *Juan Pablo Pardo Vázquez y Federico Martínez Montes*.
5. Determinación de glucosa en sangre total. *Rebeca Milán Chávez y Eugenia Flores Robles*.
6. Determinación de colesterol y lipoproteínas. *Celia Virginia Sánchez Meza y Rebeca Milán Chávez*.

7. Integración Metabólica. *Rebeca Milán Chávez y Eugenia Flores Robles*.

8. Examen General de Orina (EGO). *Rebeca Milán Chávez y Eugenia Flores Robles*.

9. Pipeteo. *Rebeca Milán Chávez y Eugenia Flores Robles*.

10. Huella génica. *Rebeca Milán Chávez y Eugenia Flores Robles*.

La revisión y la actualización de los *Objetivos* del curso se realizó en colaboración con el proyecto: *Mejoramiento de la Enseñanza de la Bioquímica y Biología Molecular* (EN-206603) del Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME), siendo el responsable del proyecto el doctor Federico Martínez Montes.

Corrección y cuidado de la edición 2017-2018: Juan Pablo Pardo Vázquez, Rebeca Millán Chávez, Juan Luis Rendón Gómez, Eugenia Flores Robles.