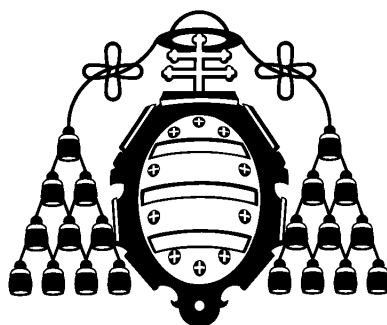


DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN MEDICINA

PRÁCTICAS DE BASES MOLECULARES DE LA  
ENFERMEDAD

Curso ..... / .....

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

29 de mayo de 2014  
Med-BME-sc  
Laboratorio de Prácticas

# Índice general

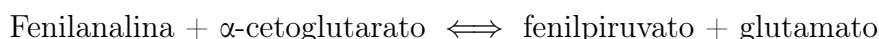
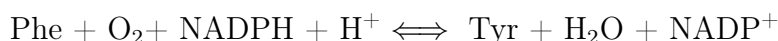
1. Diagnóstico de la fenilcetonuria clásica.	2
2. Electroforesis suero sanguíneo.	6
3. Detección de la deficiencia de G6P-DH.	10

# Práctica Nº 1

## Diagnóstico de la fenilcetonuria clásica mediante cromatografía en capa fina

### 1.1. Introducción.

Las enfermedades relacionadas con el metabolismo de aminoácidos que producen acumulación de los mismos en fluidos biológicos como sangre y/u orina se denominan genéricamente aminoacidurias. Una de ellas es la *fenilcetonuria clásica* (PKU) que se origina por una deficiencia genética del enzima fenilalanina hidroxilasa (4-monooxigenasa de la fenilalanina), la cual cataliza la hidroxilación de la fenilalanina y la convierte en tirosina.



La monooxigenasa de la fenilalanina inserta uno de los átomos de oxígeno del  $\text{O}_2$  en la fenilalanina para formar el grupo hidroxilo de la tirosina y el otro se reduce a agua por el NADPH que también interviene en la reacción.

Cuando no funciona la fenilalanina hidroxilasa por deficiencia genética, entra en juego una ruta secundaria del metabolismo de la fenilalanina, poco empleada normalmente, en la cual la fenilalanina experimenta una transaminación con el  $\alpha$ -cetoglutarato y produce fenilpiruvato el cual no experimenta metabolismo posterior, constituyendo una vía metabólica muerta que provoca su acumulación y la de la fenilalanina en la sangre y en los tejidos, excretándose por la orina. Los niveles de fenilalanina en sangre son al menos 20 veces superiores a los normales.

El exceso de fenilalanina y de fenilpiruvato en la sangre al comienzo de la vida impide el desarrollo normal del cerebro y origina un retraso mental grave. La fenilcetonuria clásica debe diagnosticarse en las primeras semanas después del nacimiento para impedir el retraso mental mediante una elección adecuada de la dieta, de modo que se eliminen de ella los alimentos que contengan proteínas con una elevada proporción de fenilalanina. Como ésta se necesita en pequeña cantidad para un crecimiento adecuado (es un aminoácido esencial) debe controlarse cuidadosamente la cantidad de fenilalanina en la dieta.

La fenilcetonuria clásica constituye un serio problema sanitario público. Los fenilcetonúricos que no han sido diagnosticados y tratados a tiempo desarrollan retraso mental irreversible, muchos mueren antes de alcanzar la edad de 25 años y otros precisan cuidados institucionales de por vida originando un gran coste social y humano. La incidencia de esta enfermedad autosómica recesiva es de 1 por cada 10000 recién nacidos.

El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo lleva a cabo dentro del Programa de Detección Neonatal de Enfermedades Metabólicas

subvencionado por el Gobierno del Principado, un programa de rastreo masivo para la detección precoz de la fenilcetonuria clásica en todos los recién nacidos de la Comunidad Autónoma. El criterio utilizado en el diagnóstico es la determinación de los niveles de fenilalanina en sangre mediante separación de los aminoácidos por cromatografía en capa fina.

### **1.1.1. Fundamento de la cromatografía en capa fina.**

La cromatografía de reparto en capa fina es una técnica extremadamente sensible para separar una gran variedad de compuestos orgánicos y entre ellos los aminoácidos. Se basa en el diferente coeficiente de reparto (solubilidad) de los aminoácidos entre un disolvente orgánico o mezclas de disolventes de diferente polaridad (fase móvil) que se desplaza sobre una capa delgada de un adsorbente acuoso (placas de silicagel o celulosa) denominado fase inmóvil o estacionaria).

En esta práctica se utilizará esta técnica para separar e identificar aminoácidos del suero de sangre de recién nacidos prestando especial atención a la fenilalanina. Las muestras se colocan en un extremo de la placa de silicagel, la cual se coloca entonces en posición vertical sobre un disolvente apropiado (en un tanque cromatográfico) para conseguir que éste ascienda por capilaridad arrastrando a las muestras. Las moléculas que se hayan separado y que ocupen diferentes posiciones al final de la cromatografía se pueden observar utilizando un revelador que las coloree.

## **1.2. Procedimiento.**

### **1.2.1. Preparación de los solventes cromatográficos.**

Solvente para transferencia de las muestras a la placa fina: isopropanol al 70 % (45 ml de agua y 105 ml de isopropanol).

Solvente de separación cromatográfica: Butanol:Acetona:Acido acético:Agua (70:70:20:40).

### **1.2.2. Preparación de las muestras.**

Las muestras de sangre de los recién nacidos son enviadas al Departamento desde los Hospitales públicos y privados por correo ordinario depositadas en papeles de filtro, para facilitar su transporte y su conservación. Por ello antes de iniciar la separación cromatográfica propiamente dicha hay que transferir las muestras desde el papel de filtro que contiene la sangre seca hasta la placa fina que va a constituir la fase estacionaria en la separación cromatográfica. Para ello se corta un círculo de 5 mm de diámetro y se pega con cinta adhesiva a un vidrio. A continuación se coloca la placa fina cromatográfica sobre el vidrio que contiene los círculos de papel de filtro con las muestras y se fija el conjunto con una banda elástica. Las muestras se transfieren desde el papel de filtro a la placa fina utilizando como solvente isopropanol al 70 %, permitiendo subir al solvente durante 15 minutos. Transcurrido este periodo de tiempo, se retira la placa fina del tanque cromatográfico, se deja reposar durante 45 minutos (así se completa la transferencia), se

separan los vidrios de la placa fina y se seca la placa fina en posición vertical con una corriente de aire frío durante 15–30 minutos.

### 1.2.3. Separación cromatográfica.

Como fase móvil se utiliza el solvente de separación Butanol / Acetona / Acético / Agua preparado previamente y que ya se encuentra situado en el tanque de cromatografía. La placa fina se sumerge verticalmente en el solvente por el extremo que contiene las muestras (sin que llegue a ellas). Se deja ascender el solvente hasta que llegue a 0,5 cm del borde superior de la placa (60–90 min). A continuación se retira la placa del tanque, se deja secar durante 45 min para volver a someterla a otro turno de cromatografía en el mismo solvente y en las mismas condiciones.

### 1.2.4. Revelado.

La tinción de aminoácidos en la placa se lleva a cabo con una solución que contiene ninhidrina (2 g de ninhidrina, 1 g de isatin en 100 ml de etanol al 70%) y 2,4,6 trimetilpiridina en proporción 100:1. La placa se pasa por la solución de revelado y después se deja escurrir el exceso por goteo. Se seca en una estufa a 80°C. Finalmente se coloca sobre una plancha caliente para resaltar más las manchas que aparecen.

### 1.2.5. Resultados.

El solvente arrastra con mayor facilidad a los aminoácidos hidrofóbicos que se desplazarán más lejos, mientras que los aminoácidos polares y los cargados permanecerán más cerca del origen. Con este solvente y estas condiciones cromatográficas el orden de aparición de las manchas correspondientes a los aminoácidos desde el frente hasta el origen es el siguiente:

- Leu/Ile
- Phe
- Val/Met
- Tyr
- Pro
- Ala
- Glu
- Gly/Ser
- Gln
- His/Lys

## ■ Cys

La banda o mancha de interés, correspondiente a la Fenilalanina, es la segunda empezando por el frente y se encuentra en una zona en la que está perfectamente separada de los aminoácidos que corren más que ella (Leu/Ile) y de los que corren a continuación (Val/Met).

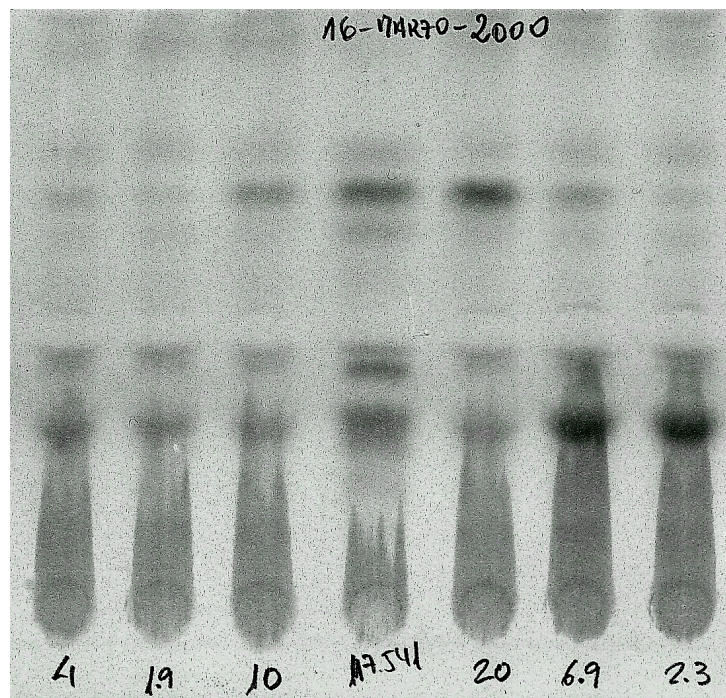


Figura 1.1: Cromatografía en capa fina de muestras de sangre de un recién nacido fenilcetonúrico (17.571) y de controles conteniendo diferentes cantidades de fenilalanina.

## Práctica N<sup>o</sup> 2

# Electroforesis de proteínas del suero sanguíneo

### 2.1. Introducción

Muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica cuya magnitud depende de la naturaleza de las mismas, del pH y de la composición del medio en el que se encuentren. Si a una disolución que contiene moléculas cargadas se le aplica un campo eléctrico, las moléculas emigran hacia el polo de carga opuesta. Este principio se usa en la electroforesis para separar moléculas que posean cargas diferentes.

Las proteínas, que son moléculas anfóteras, adquieren en medio alcalino una carga global negativa que hace que emigren desde el polo negativo (cátodo) hacia el polo positivo (ánodo). Debido a ello, la electroforesis de zona es una técnica muy empleada para separar proteínas.

La velocidad de migración electroforética depende del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de fricción entre las moléculas que se mueven y el medio circundante. Manteniendo constante el voltaje, la velocidad de migración electroforética es directamente proporcional a la carga de la molécula e inversamente proporcional a su tamaño.

Para que tenga lugar la electroforesis es necesario que la muestra esté disuelta en una disolución tampón y que sea colocada sobre un medio de soporte que debe de estar saturado con tampón para conducir la corriente.

Como medio de soporte se emplean materiales relativamente inertes, tales como el papel, acetato de celulosa, geles de almidón, geles de poliacrilamida, etc. La práctica se realizará usando un soporte de gel de agarosa (HYDRAGEL K20©) que permite una nítida separación de las bandas proteicas, de necesitarse cantidades mínimas de muestra y de permitir una separación muy rápida.

En esta práctica se pretende llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas del suero, obteniéndose habitualmente 5 fracciones con cargas negativas decrecientes: albúmina,  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas y  $\gamma$ -globulinas. Esta técnica es muy utilizada en bioquímica clínica para medir cambios en las proteínas séricas causados por diversas enfermedades (ver figura 2.1 en la página siguiente)

1. Suero normal.
2. Suero con bisalbuminemia
3. Síndrome inflamatorio agudo.
4. Síndrome nefrótico.
5. Cirrosis alcohólica con bloqueo  $\beta$ - $\gamma$ .
6. Suero con inmunoglobulina.



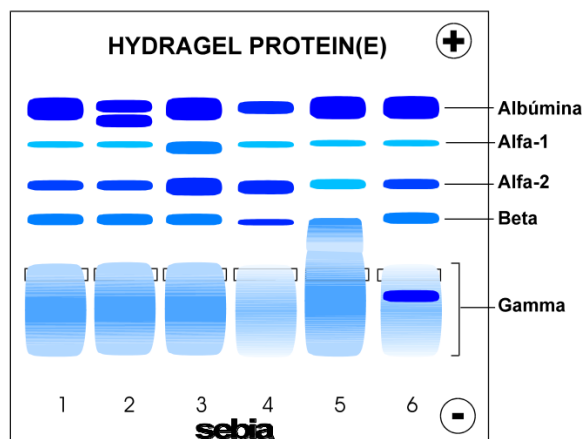


Figura 2.1: Proteinograma

VALORES NORMALES: Albúmina: 55-69 %; Alfa-1: 1.5-4 %; Beta:7-15 %; Gamma: 9-18 %.

## 2.2. Procedimiento

### 2.2.1. Preparación del tampón de electroforesis

El tampón para la electroforesis es un tampón barbital de pH= 8,6. Se prepararán 300 ml por dilución de un stock 10x que se repartirán entre los dos receptáculos (+ : rojo; - : negro) del tanque de electroforesis.

### 2.2.2. Preparación y aplicación de la muestra

1. Muestras: usar muestras de suero frescas sin diluir. No usar muestras hemolizadas (la hemólisis aumenta las fracciones  $\alpha_2$  y  $\beta$ ). No usar muestras de plasma.
2. Dispensar 120  $\mu$ l de agua destilada o desionizada en el tercio inferior del marco impreso en el soporte del aplicador K 20 (figura 2.2 en la página siguiente).
3. Sacar el gel de agarosa de su envoltorio y secar el exceso de tampón con un papel de filtro fino.
4. Colocar el soporte hydragel apoyando su base contra el tope situado en la base del marco impreso. Hacer que el gel contacte con el agua de forma que quede colocado en la base.
5. Aplicar las muestras: se aplican 10  $\mu$ l de suero sin diluir en los pocillos del aplicador.
  - a) Una vez se han cargado las muestras dejar transcurrir 3 minutos antes de poner en contacto el aplicador con el gel.
  - b) Colocar el aplicador en la posición n o 7 de su soporte.

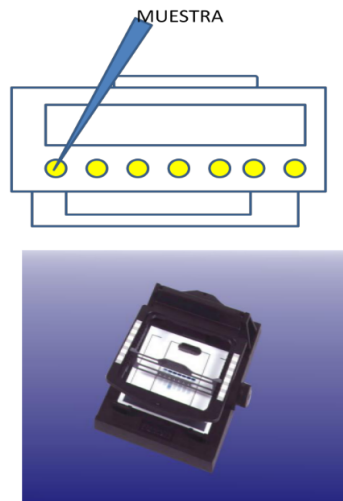


Figura 2.2: Aplicador de muestra

- c) Bajar el soporte para que el aplicador contacte con el gel y déjelo en esta posición durante 40 segundos. Cuando haya pasado ese tiempo, girar la rueda para elevar el aplicador.
6. Colocar el gel en el tanque de electroforesis. La agarosa debe estar orientada hacia abajo (cara cóncava del montaje).
7. Migración: condiciones de migración.  
 Voltaje: 90 V  
 Tiempo: 22 minutos  
 Corriente inicial (1 gel):  $12 \pm 3$  mA
8. Fijación: Fijar el gel con aire caliente o con solución fijadora. Se recomienda secar con aire caliente.  
**IMPORTANTE:** Asegurarse de que el gel está completamente seco y dejar que se enfríe antes de teñirlo.
9. Tinción y decoloración:
  - a) **TINCIÓN** durante 4 minutos. Para preparar el colorante, diluir 1 vial de 20 mL de colorante en solución diluyente (60 mL) y añadir 200 mL de agua.
  - b) **DECOLORACIÓN.** La solución de decoloración se prepara diluyendo 1 mL de stock en 1 L de agua. Repartir en 3 baños de decolorante. Pasar el gel sucesivamente por los tres baños hasta que las bandas queden nítidas.
  - c) **SECADO** del gel con aire caliente.
  - d) Limpiar la cara opuesta a la que está el gel en el montaje de cualquier partícula de polvo o colorante.
10. Lectura: Leer el gel a 570 nm en el escáner Epson 700. Colocar el gel boca abajo en el marco que se provee al respecto y aplicar el programa Phoresis diseñado para cuantificar las bandas que aparecen en el gel.



## Práctica Nº 3

# Detección de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

### 3.1. Introducción.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) cataliza la primera reacción específica de la ruta de las pentosas fosfato, transformando la glucosa-6-fosfato en 6-fosfoglucono- $\delta$ -lactona y utilizando como coenzima el  $NADP^+$ .

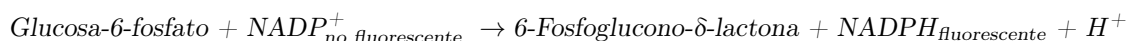
La ruta de las pentosas fosfato es una ruta multifuncional que proporciona a las células en las que funciona poder reductor (en forma de NADPH), pentosas fosfato (ribosa-5-fosfato) y/o energía (ATP), dependiendo de que funcionen ambas ramas, una de ellas, etc. En los glóbulos rojos maduros, que carecen de núcleo y de mitocondrias, el funcionamiento de la ruta es imprescindible para proporcionar a dichas células ATP, necesario para el funcionamiento de la bomba de Na/K y por tanto para el mantenimiento de la forma bicóncava del corpúsculo, y NADPH imprescindible para mantener el Glutathion en estado reducido y defender por tanto a dichas células de los efectos que provoca un estrés oxidativo.

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa provoca *anemia hemolítica* (destrucción de los eritrocitos) en situaciones de estrés oxidativo inducido por determinados alimentos (habas de soja: *favismo*), agentes químicos y determinados medicamentos (antimalaria, sulfamidas, etc), mientras que los individuos portadores son asintomáticos en condiciones oxidativas normales.

Esta enfermedad molecular se hereda como un carácter recesivo ligado al cromosoma X, y es especialmente prominente en ciertos grupos raciales, sufriendola el 13 % de los varones afroamericanos y el 3 % de las mujeres afroamericanas, presentando una alta incidencia entre los judíos sefardíes y los griegos.

### 3.2. Fundamento.

La presencia o ausencia de actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en los eritrocitos de los individuos sometidos a análisis se puede determinar de una forma semicuantitativa, estimando visualmente la aparición de fluorescencia (debida a la formación de NADPH) cuando se incubaba una muestra de sangre completa con el sustrato y el coenzima de la reacción enzimática.



El ensayo se realiza incubando a 37°C una pequeña cantidad de sangre con glucosa-6-fosfato y NADP<sup>+</sup>. A intervalos de 5 minutos se toma una gota de la mezcla de incubación y se coloca sobre papel de filtro Whatman no 1, visionándola a continuación bajo una luz ultravioleta de longitud de onda larga. La fluorescencia es claramente visible en las muestras preparadas con sangre normal, mientras que la sangre de los individuos con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa producen o muy poca o ninguna fluorescencia.

### 3.3. Procedimiento.

Preparación de la disolución de sustrato y coenzima: Reconstituir 1 vial de sustrato de G6P-DH (Sigma catálogo 203-2B) añadiendo 2 ml de tampón Trizma pH 7,8 (Sigma catálogo 203-2A), dejar reposar 2 min y luego mezclar por inversión del tubo. La disolución así preparada es estable como mínimo 2 semanas congelada, 1 semana en la nevera (4°C) o 4 h a temperatura ambiente.

#### 3.3.1. Ensayo de actividad G6P-DH.

1. Marcar la tira de 2x6 cm de papel de filtro Whatman no 1 con un lápiz con el número de taquilla o nombre del alumno. Señalar dejando un espacio de 1,5 cm entre cada anotación, 0 min, 5 min, 10 min y 15 min con un lápiz.
2. Las operaciones que se indican a continuación deben realizarse de manera lo más rápida posible ya que la reacción enzimática transcurre a gran velocidad.  
Añadir 5 microlitros de sangre (que puede corresponder a un control normal o a un individuo deficiente en G6P-DH) al tubo eppendorf que contiene 100 microlitros de disolución de sustrato de la G6P-DH, preparada según se indica más arriba. Mezclar en el agitador y sacar rápidamente 10 µl de la mezcla de incubación y colocarlos sobre el papel Whatman no 1 en la posición correspondiente a 0 min, a la vez que se pone en marcha el reloj. Introducir la mezcla de incubación en un baño termostatzado a 37°C y al cabo de 5 min volver a sacar otra alícuota de 10 µl y colocarla en el filtro Whatman en la posición marcada 5 min. Repetir la operación a los 10 min y a los 15 min de incubación.
3. Secar inmediatamente con un secador.
4. Inspeccionar visualmente sobre un transiluminador de luz UV la intensidad de la fluorescencia de cada muestra.
5. A partir del resultado obtenido deducir si la muestra de sangre correspondía a un individuo sano o enfermo.

Nota: La fluorescencia de las gotas depositadas sobre los filtros es estable durante al menos 2 semanas si se guardan los filtros en una bolsa de plástico con desecador en la nevera a 4°C.