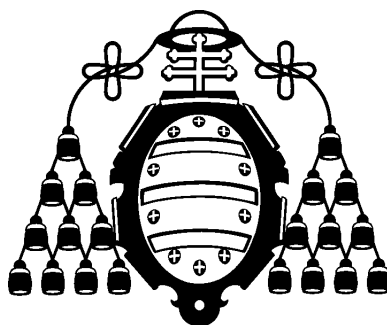


**DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

GRADO EN MEDICINA

**PRÁCTICAS DE BASES MOLECULARES DE LA
ENFERMEDAD**

Curso /

NOMBRE Y APELLIDOS:

CURSO Y GRUPO:

Taquilla nº:

15 de mayo de 2021
Med-BME-BP
Laboratorio
de Prácticas

Índice general

1. Diagnóstico de la fenilcetonuria clásica.	4
2. Electroforesis suero sanguíneo.	7
3. Detección de la deficiencia de G6P-DH.	10

Práctica N° 1

Diagnóstico de la fenilcetonuria clásica mediante cromatografía de intercambio iónico

1.1. Introducción.

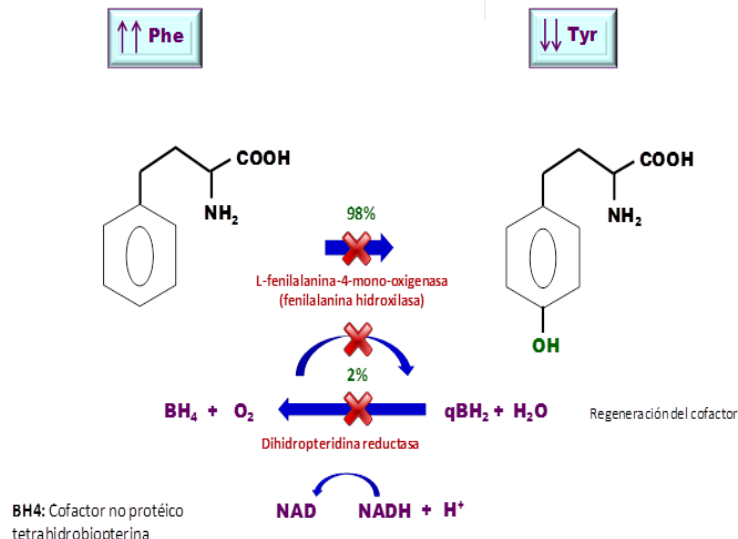
El cribado poblacional neonatal permite el diagnóstico en enfermedades que, de dejarse a su evolución natural, comprometerían la vida y/o el desarrollo intelectual de las personas afectadas, con un alto coste social y psicológico para los sujetos afectados y sus familias, constituyendo además una carga económica muy importante por la dependencia y el consumo de recursos sociales y sanitarios que conllevan.

En Asturias contamos con un programa de cribado poblacional de Hipotiroidismo congénito (HC) y Fenilcetonuria (PKU) desde el año 1982, con coberturas superiores al 98 % de los nacimientos. Dicho programa se amplió en 2014, al trasladarse al servicio de Bioquímica Clínica del HUCA, para cribar también Fibrosis Quística, Acidemia Glutárica de tipo I (GA-I), Deficiencia de acil CoA-deshidrogenasa de cadena media (MCAD) y de 3-hidroxiacil CoA-deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD). Para ello se requiere una única toma de muestra de sangre impregnada en papel (prueba del talón), a las 48 -72 horas de vida del recién nacido. En 2017, se implementó el cribado de Drepanocitosis y se prevé incorporar próximamente el cribado del Déficit de Biotinidasa, la Enfermedad de orina con olor a jarabe de arce (MSUD) y la Homocistinuria.

En esta práctica se realizará el análisis correspondiente a las pruebas confirmatorias que se practican tras obtener un cribado positivo en el protocolo de PKU.

Fenilcetonuria (PKU)

Las hiperfenilalaninemias son un grupo genéticamente heterogéneo de alteraciones congénitas del metabolismo de la fenilalanina (Phe) que tienen en común un aumento de la concentración de este aminoácido en sangre, causado por una alteración que bloquea la reacción enzimática de hidroxilación hepática de Phe a tirosina (Tyr), mediada por la fenilalanina hidroxilasa. La alteración molecular puede conducir a menor actividad del enzima de manera directa (98% de los casos) o por la carencia de algún intermediario relacionado con el metabolismo de su cofactor, la tetrahydropterina (BH4), como se muestra en la figura.



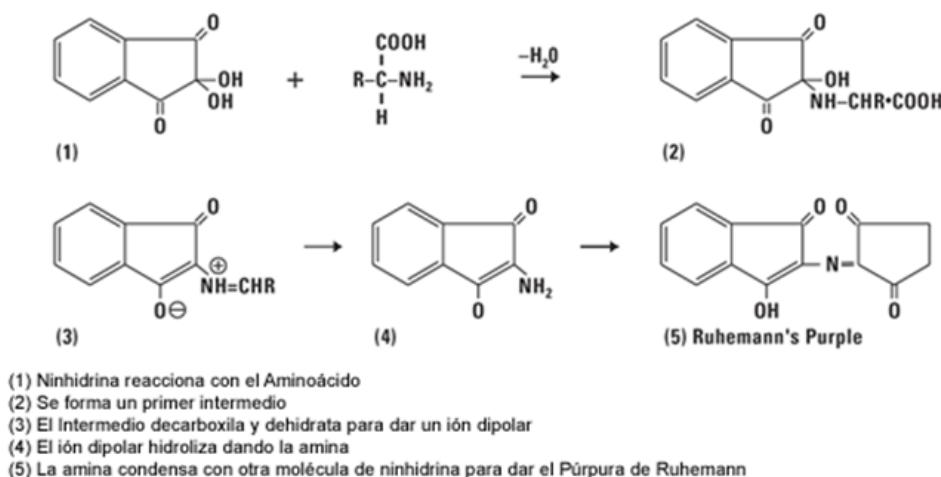
La cuantificación de Phe y del cociente Phe/Tyr permite realizar un primer diagnóstico de confirmación y orientar el ajuste dietético posterior, de acuerdo a la siguiente tabla, en función del tipo de hiperfenilalaninemia.

	Forma grave o PKU clásica	PKU moderada	PKU leve	HPA (Hiperfenilalaninemia)
Phe en plasma al diagnóstico	>1200 μM (>20 mg/dL)	600 y 1200 μM (10 y 20 mg/dL)	360 y 600 μM (6 y 10 mg/dL)	150 y 360 μM (2.5 y 6 mg/dL)
Tolerancia Phe en la dieta	<350 mg/día	350-400 mg/día	400-600 mg/día	>600 mg/día

1.1.1. Fundamento de la cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico es el método de referencia para el análisis de aminoácidos en fluidos biológicos. Se trata de una técnica de separación basada en que las moléculas cargadas se adhieren de forma reversible a grupos intercambiadores presentes en la fase estacionaria de una columna cromatográfica, de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el entorno iónico. Para conseguir la separación, se utiliza como fase móvil una serie de soluciones tampón que se pasan por la columna formando un gradiente de pH, de modo que los compuestos se van disociando de la columna secuencialmente en función de la mayor o menor acidez de sus grupos funcionales.

El análisis de aminoácidos se realiza por cromatografía de intercambio catiónico acoplado a un sistema de detección altamente específico empleando una derivatización post-columna con ninhidrina. El producto final de cada aminoácido se mide por absorbancia a 570/440 nm.



Los aminoácidos se separan de acuerdo con su carga neta, determinada por el pKa de sus grupos ionizados. La fase móvil está constituida por 5 tampones de citrato de litio que permiten realizar una elución a pH y molaridad crecientes. El gradiente de temperatura en la columna maximiza la resolución. Una solución de hidróxido de litio regenera los grupos iónicos de la resina que constituye la fase estacionaria después de cada análisis, dejándola lista para la siguiente inyección de muestra.

1.2. Procedimiento.

El análisis se realizará en un cromatógrafo de líquidos (BIOCHROM; Gomensoro), disponible en el laboratorio de cribado de metabolopatías del HUCA. Las soluciones tampón necesarias para generar el gradiente de pH que permite separar los aminoácidos presentes en la muestra se suministran listas para el uso.

1.2.1. Preparación de las muestras.

Se realizará una desproteínización de las muestras de plasma y de los controles de calidad (QC) con ácido sulfosalicílico (SSA) al 50%, tras adicionar patrón interno (nLeu) para la normalización de todos los pasos del proceso analítico. Las etapas a realizar son las siguientes:

- Pipetear en un tubo eppendorf 125 uL de plasma/QC, 20 uL de nLeu 0.25 mM y 15 uL de SSA50%
- Mezclar en un vórtex, durante unos 30seg
- Incubar 1h a temperatura ambiente y añadir 45 uL de buffer 6 (LiOH)
- Agitar en vortex unos segundos y centrifugar a 3000 rpm durante 10 min
- Extraer el sobrenadante con jeringa de insulina (evitar tanto el pellet como lípidos que pueda haber flotando en la superficie)
- Filtrar el sobrenadante con filtros de membrana de nitrato de celulosa de 0.2 μm al trasvasarlo a un vial con inserto mediante una micropipeta. Sellar el vial y rotular con la identificación de la muestra

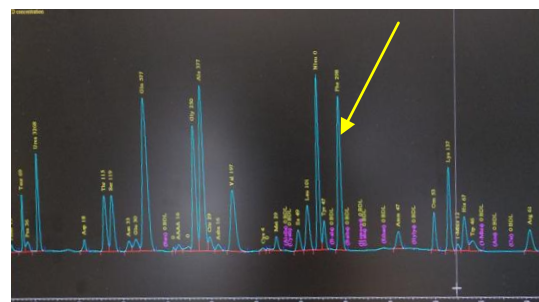
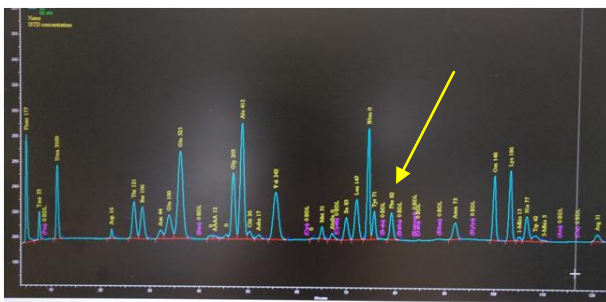
Finalmente, se programa el muestreador para que inyecte la muestra en el sistema cromatográfico.

1.2.2. Separación cromatográfica.

Se deberá programar la secuencia cromatográfica con el software disponible en el laboratorio, indicando el método de separación, el orden de muestreo a realizar en el equipo y el volumen de muestra a inyectar (80 uL). Previamente se programará un método de acondicionamiento de la columna.

1.2.3. Resultados.

Los aminoácidos más ácidos aparecen al principio del cromatograma puesto que presentan menor tiempo de retención en la columna, los neutros saldrán en el centro del cromatograma y los más básicos aparecerán los últimos.



Separación de aminoácidos en un plasma normal (izda) en comparación con un plasma de un paciente con PKU (decha), destacando la marcada elevación de la relación Phe / Tyr, que confirma el diagnóstico.

Práctica N° 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, α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas y γ -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 β - γ .
6. Suero con inmunoglobulina.

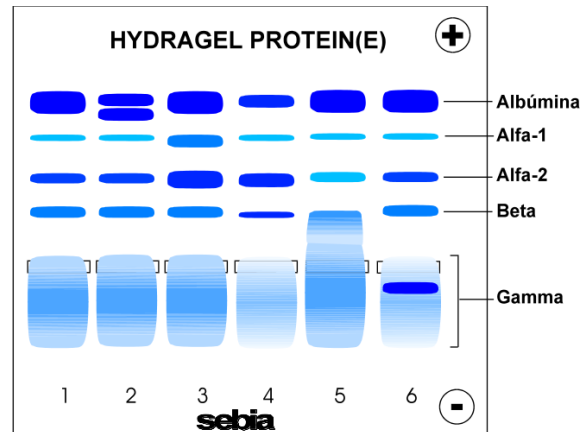


Figura 2.1: Proteinograma

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 α_2 y β). No usar muestras de plasma.
2. Dispensar 120 μ 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 hydrigel 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 μ 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.

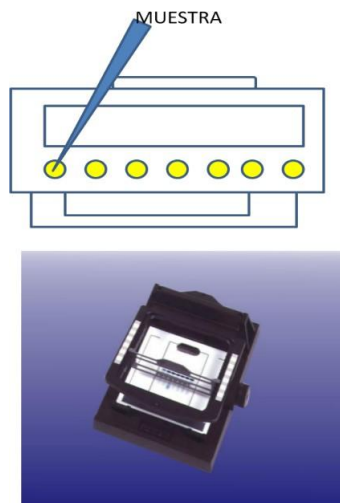


Figura 2.2: Aplicador de muestra

- 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 ± 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 N° 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- δ -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 Glutation 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 sefardies 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⁺. 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.