



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ

PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO

BIOQUÍMICA

II Semestre

Giovanny Díaz Beltrán

Bacteriólogo MSc. Bioquímica clínica

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Medicina





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Director programa de Medicina

Heliana Padilla Santos

Mónica Rocha Carrascal

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Carlos Torres Madrid

Revisión y corrección de estilo

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Giovanny Díaz Beltrán



CONTENIDO

PRESENTACIÓN	4
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE	12
PRÁCTICA N°1.	14
AGUA – pH- Y EQUILIBRIO ÁCIDO BÁSICO	14
PRÁCTICA N°2	18
ESPECTROFOTOMETRÍA, COLORIMETRÍA, PRINCIPIOS BÁSICOS	18
PRÁCTICA N°3	25
USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO Y DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR	25
PRÁCTICA N°4	30
CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA	30
PRÁCTICA N°5	35
CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS	35
PRÁCTICA N°6	40
CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y HDL	40
PRÁCTICA N°7	47
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA	47
PRACTICA N° 8	53
CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA	53
PRÁCTICA N°9	58
CUANTIFICACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA	58
PRÁCTICA N°10	64
CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO	64
PRÁCTICA N°11	69
CUANTIFICACION DE CREATININA	69



PRESENTACIÓN

En el desarrollo de las Ciencias de la Salud, y de la Medicina en particular, la Bioquímica ha jugado un papel central al proveer razones, fundamentos y evidencias científicas que facilitan la comprensión y el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con los estados de salud y enfermedad.

La Bioquímica actual abarca tres campos de estudio, complementarios entre sí, que permiten comprender cómo funciona el cuerpo humano. La Bioquímica estructural estudia la composición, conformación, configuración y estructura de las moléculas de la materia viva, relacionándolas con su función biológica. La Bioquímica metabólica estudia las transformaciones, funciones y reacciones químicas que sufren o llevan a cabo las moléculas de la materia viva, así como los mecanismos de regulación de esas transformaciones. La Biología molecular o genética molecular, estudia la química de los procesos y las estructuras de las moléculas implicadas en el almacenamiento, transmisión y expresión de información genética, así como los mecanismos que los regulan. Estos tres campos de estudio han permitido que esta ciencia en las últimas décadas haya hecho notables aportes científicos en cuanto al conocimiento detallado de cómo funciona nuestro organismo y qué procesos se alteran en los estados patológicos o de enfermedad.

Como herramienta de estudio de formación básica en Medicina, esta ciencia facilita y fomenta en el estudiante conocimientos que permiten comprender la naturaleza química de los componentes celulares, los diversos aspectos del metabolismo, los procesos de regulación química y los cambios moleculares y alteraciones que ocurren dentro de las células vivas en los estados de enfermedad.

El estudio de esta disciplina es indispensable para el proceso de formación profesional, el conocimiento claro de las bases moleculares de la vida y el



funcionamiento del cuerpo humano es fundamental para el futuro médico, la homeostasis corporal depende de un complejo proceso de interacción y regulación molecular y en la actualidad es frecuente que las enfermedades investiguen, diagnostiquen y se traten desde el orden molecular. Pero además de los fundamentos teóricos propios de la asignatura, el fomento y desarrollo de habilidades prácticas en el Laboratorio le permitirá al Profesional de Medicina comprender, elegir, ordenar, correlacionar e interpretar distintas pruebas de laboratorio que se relacionan con diversos órganos y sistemas del cuerpo humano, su funcionamiento y su relación con los estados de salud y enfermedad, facilitando así el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diversas patologías, y desarrollar de competencias que aseguren un trabajo idóneo y acorde con las necesidades y las exigencias de su entorno, de la población atendida y de la institución donde deban desempeñarse.

OBJETIVO

El programa de Medicina de la Corporación Universitaria Rafael Núñez, en su compromiso misional de promover la formación de profesionales integrales, ha diseñado el presente Manual de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica con el objetivo de proporcionar bases teorico-prácticas que permitan fomentar y estimular la avidez por el conocimiento, el pensamiento crítico e investigativo del estudiante en formación y el desarrollo de habilidades y competencias para correlacionar e interpretar pruebas bioquímicas de laboratorio y su relación con los estados de salud y enfermedad.

ÁMBITO DE APLICACIÓN

Dirigido a los estudiantes de segundo semestre del programa de Medicina que cursan la asignatura de Bioquímica de formación básica.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Conjunto de medidas preventivas, destinadas a minimizar los factores de riesgo (biológicos, físicos o químicos) propios del trabajo práctico en los laboratorios, asegurando que el desarrollo final de los procedimientos no atente contra la salud y seguridad de la comunidad estudiantil y docente.

OBJETIVO

Orientar y educar a los estudiantes de Bioquímica, sobre la obligatoriedad de conocer y adoptar las normas de bioseguridad.

SISTEMA DE PRECAUCIONES UNIVERSALES

Este sistema fue establecido, por el centro de enfermedades (CDC) de Atlanta en 1987, en el cual se recomendó que todas las instituciones de salud adoptaran una política de control de la infección, que se denominaron “**políticas universales**”. Este es un conjunto de técnicas y procedimientos destinados a proteger al personal de posibles fuentes de infección con ciertos agentes, principalmente:

- Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).
- Virus de la Hepatitis B.
- Virus de la hepatitis C.
- Tuberculosis.
- Endoparásitos.
- Ectoparásitos.
- (Fluidos corporales que se consideran como potencialmente infectantes)
 - Semen.
 - Secreción vaginal.
 - Leche materna.
 - Líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido pleural, líquido amniótico, líquido peritoneal, líquido pericárdico, cualquier otro líquido



contaminado con sangre.

ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

Su uso es indispensable para proteger a las personas en un área específica donde se trabaja con sustancias o residuos peligrosos. Evitan que quien está manipulando la sustancia tenga contacto directo con ella.

- **Bata:** Deberán ser preferiblemente mangas largas e impermeables. Estas deberán cambiarse cuando halla contaminación visible con fluidos corporales durante procedimientos o al final de los mismos.
- **Guantes:** evitar contacto directo con sangre y otros fluidos corporales considerados potencialmente peligrosos. Es obligatorio su uso para:
 - Punciones venosas.
 - Contacto con piel (lesiones, membranas mucosas).
 - Manipulación de reactivos.
 - Preparación de medios de cultivo.
 - Eliminación de materiales de desecho.
 - Una vez colocados los guantes, no tocar superficies ni áreas corporales, con el propósito de no contaminarlas.
 - Los guantes deben ser cambiados entre pacientes, puesto que una vez utilizados, se convierten en una fuente de contaminación externa y ambiental.
 - Al presentarse ruptura o punción de los guantes estos deben ser cambiados.
 - Es importante usar los guantes de la talla adecuada, dado que el uso de guantes estrechos o laxos favorece la ruptura y accidentes laborales.
- **Mascarilla:** para prevenir la exposición de las membranas mucosas de la boca, la nariz y los ojos, a líquidos potencialmente infectados. Se indican en:



- Procedimientos donde se manipulen sangre o líquidos corporales.
- Cuando exista la posibilidad de salpicaduras (aerosoles) o expulsión de líquidos contaminados con sangre.
- **Gorro:** El cabello facilita la retención y posterior dispersión de microorganismos que flotan en el aire de los hospitales, laboratorios y otras entidades de salud por lo que se considera como fuente de infección y vehículo de transmisión de microorganismos.

ELEMENTOS DE PROTECCIÓN GENERAL

- **Guardianes:** Disposición final de elementos cortopunzantes (agujas, bisturís, lancetas u otros), se deberán tomar rigurosas precauciones para prevenir accidentes laborales.
- **Canecas:** Para hacer una eficiente disposición de los desechos, es necesario adoptar una codificación de colores de acuerdo al tipo y grado de peligrosidad del residuo que se esté manejando.

La OMS normatizó un código de colores para almacenamiento y disposición final de desechos, el cual es universalmente reconocido.

- Color verde: desechos ordinarios no reciclables
- Color rojo: desechos que implican riesgo biológico
- Color negro: desechos anatomopatológicos.
- Color naranja: depósitos de plástico.
- Color blanco: depósitos de vidrio.
- Color gris: papel, cartón y similares.
- **Lavado de las Manos:** Es la forma más eficaz de prevenir la infección cruzada entre pacientes, personal del laboratorio y visitantes. Se realiza con el fin de reducir la flora normal y remover la flora transitoria para disminuir la diseminación de microorganismos infecciosos. Se debe realizar en los siguientes casos:
 - Antes de iniciar las labores.
 - Antes y después de atender pacientes.



- Antes y después de manipular heridas.
- Después de estar en contacto con líquidos de precaución universal.
- Después de manipular objetos contaminados.
- Antes de colocarse guantes e inmediatamente después de retirarlos.
- Al finalizar labores.

NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- No fumar dentro del laboratorio.
- No consumir bebidas o alimentos dentro del área de trabajo del laboratorio.
- Usar bata limpia y abotonada, zapatos cerrados.
- Lavarse las manos antes y después del contacto con un paciente, después de manipular muestras y luego de quitarse los guantes.
- Una vez colocados los guantes no toque superficies ni objetos de uso común del laboratorio tales como: sillas, teléfono, libros, equipos, cerraduras, lapiceros, etc. con el fin de no contaminarlas.
- Asegúrese de que su sitio de trabajo tenga buena iluminación, ventilación suficiente espacio y buena disposición de las mesas de trabajo.
- Gasas, algodones y/o papeles que hayan estado en contacto con muestras de pacientes deben ser descartados en bolsas rojas.
- En ninguna circunstancia está aceptado pipetear con la boca, por lo tanto debe emplearse siempre procedimientos mecánicos para el pipeteado de todos los líquidos en el laboratorio.
- No abrir las canecas con las manos, utilice los pedales.
- Las pipetas de Pasteur y pipetas de vidrio deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio al 5%.
- Los tubos de ensayo con líquido no deben calentarse por el fondo, sino por la parte superior del líquido, se recomienda inclinarlos y no apuntar hacia el operador.
- En caso de que una sustancia corrosiva se ponga en contacto con la piel o los ojos, enjuagar con abundante agua.



- Para percibir un olor no es necesario poner el rostro encima de la sustancia; basta con agitar un poco con la mano, el aire circundante para que el olor llegue con la mano.
- Los reactivos una vez sacados de sus frascos, no deben ser devueltos a ellos. Sacar muestras apenas en la cantidad necesaria.

SÍMBOLOS DE PELIGROSIDAD DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS.

- **Sustancias tóxicas.** Peligro: Estos productos provocan casi siempre lesiones graves o incluso la muerte, sea por inhalación, ingestión o por contacto con la piel.
 - Precauciones: Trióxido de arsénico, cloruro de mercurio.
- **Sustancias nocivas.** Peligro: La absorción de estos productos se manifiesta por lesiones de menor gravedad.
 - Precauciones: Evitar el contacto con el cuerpo incluso la inhalación de vapores. Ejemplo: Piridina, tricloroetileno.
- **Sustancias corrosivas.** Peligro: El contacto con estos productos destruye tejidos vivos y ciertos materiales.
 - Precauciones: No respirar los vapores y evitar el contacto con la piel, ojos, y vestidos. Ejemplos: Bromo, ácido sulfúrico.
- **Sustancias irritantes.** Peligro: Los productos que llevan este símbolo pueden irritar la piel, ojos y vías respiratorias.
 - Precauciones: No respirar vapores de estos productos y evitar el contacto con la piel y los ojos. Ejemplo: Amoníaco.
- **Sustancias explosivas.** Peligro: En ciertas condiciones estos productos presentan un específico peligro de explosión.
 - Precauciones: Evitar los choques, la fricción, las chispas y el fuego. Ejemplos: Dicromato, amoníaco.



- **Sustancias comburentes.** Peligro: Las sustancias comburentes favorecen la inflamación de las materias combustibles o mantienen los incendios impidiendo la extinción.
 - Precauciones: Peróxido sódico, permanganato potásico. Ejemplos: Peróxido sódico, permanganato potásico
- **Sustancias fácilmente inflamables**
- Sustancias autoinflamables. Precauciones. Evitar todo contacto con el aire. Ejemplo: El fósforo
- Gases fácilmente inflamables. Precauciones: Evitar la formación de mezclas inflamables vapor-aire y el contacto con todas las posibles fuentes de ignición. Ejemplo: Butano
- Sustancias sensibles a la humedad. En contacto con el agua algunos de estos productos desprenden gases que son fácilmente inflamables.
 - Precauciones: evitar el contacto con la humedad o el agua. Ejemplo: Litio.
- Líquidos inflamables. Líquidos cuyo punto de inflamación se sitúa por debajo de 21°C.
 - Precauciones: Mantener estos productos separados de llamas, chispas y de cualquier clase de fuente que genere calor. Ejemplo. Benceno, acetona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dirección general de promoción y prevención programa nacional de prevención y control de las ETS/VIH/SIDA. Conductas Básicas en Bioseguridad: Manejo Integral. Santafé de Bogotá, D.C. abril de 1997.
- Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. – 3a ed. 2005



PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Antes de iniciar el procedimiento y tareas propias de cada práctica de laboratorio, el estudiante debe leer los procedimientos y recomendaciones en la respectiva guía de la práctica a realizar, cumplir con todas las normas generales de bioseguridad y preparar todos los materiales, reactivos, equipos y muestras necesarias para la ejecución de la misma.
2. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica con los equipos de medición ajustados según las indicaciones de la guía. El espacio de trabajo debe estar limpio y ordenado.
3. Antes de iniciar las actividades propias de la práctica repase nuevamente los procedimientos descritos en la guía y si existen dudas preguntar al docente, apóyese también en el inserto de los reactivos. Revise si los materiales, reactivos y equipos en el puesto de trabajo coinciden en tipo y número con los que se indican en la guía.
4. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica e inicie con los procedimientos de toma de muestras por venopunción o solicite la muestra problema para trabajar en aquellas prácticas en las que según las indicaciones del docente las muestras serán suministradas.
5. Marque el material, muestras y tubos para trabajar. Identifique los controles y/o calibradores y las respectivas muestras de trabajo.
6. Siga cuidadosamente cada uno de los procedimientos consignados y manipule los materiales, reactivos y equipos según las indicaciones de la guía para la respectiva práctica.
7. Anote cuidadosamente los resultados obtenidos para cada procedimiento o proceso de medición y según sea necesario realice los cálculos necesarios para la obtención de los resultados. El desarrollo y evaluación de la práctica no se limitará a la información proporcionada por la guía o el docente, sino que también sus propias observaciones, investigaciones y deducciones deben ser



consignados en el respectivo informe que deben entregar al finalizar cada práctica.

8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para la presentación del informe de la práctica de laboratorio.
9. Al culminar la práctica limpie la zona de trabajo y descarte el material teniendo en cuenta la disposición final según el tipo de residuo en los sitios destinados para cada uno. No deje material contaminado en las mesas de trabajo.
10. Entregue el material reutilizable y los equipos de medición.
11. Para la presentación del informe final tenga en cuenta las recomendaciones de la guía y del docente y el cuestionario de preguntas para cada práctica.



PRÁCTICA N°1. AGUA – pH- Y EQUILIBRIO ÁCIDO BÁSICO

I. INTRODUCCIÓN

El agua es una sustancia extraordinaria, cuyas propiedades son de gran importancia biológica; es el compuesto de mayor abundancia en los seres vivos (alrededor del 70% del peso corporal). Esta molécula se encuentra tanto en la célula como en el espacio intercelular. Asimismo, es el medio de transporte de nutrimentos, hormonas y metabolitos, y participa en la catálisis enzimática y en los procesos relacionados con la transferencia de energía química.

Las estructuras y la función celular de nuestro cuerpo se encuentran perfectamente adaptadas a las propiedades químicas y físicas del agua. De todas las propiedades fisicoquímicas de esta, la tendencia a ionizarse es de crucial importancia en la estructura y función de las Biomoléculas, por lo cual es necesario una revisión de este tópico en términos de constante de equilibrio y pH. La molécula de agua y sus productos de ionización (H^+ y OH^-) influyen de manera definitiva en la forma de ensamble y en las propiedades de los componentes celulares, incluyendo enzimas, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos. Sin embargo, lo que realmente hace que el agua sea una molécula importante es su gran capacidad como disolvente, lo cual tiene su explicación en las fuerzas de atracción entre las moléculas de este compuesto y la posibilidad de formar puentes de hidrógeno.

Solo por lo anterior se puede evidenciar la importancia del agua para los seres vivos, es por eso que todo curso de bioquímica debe iniciarse en el estudio de esta maravillosa biomolécula a la cual, por su cercanía a nosotros, muchas veces no le damos la importancia que se merece; claro que en el momento en que nos hace falta comenzamos a valorarla como se debe.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio de las propiedades y función biológica de la molécula del agua, el pH y el proceso de equilibrio ácido base.

Objetivos específicos

- Revisar las propiedades químicas del agua.
- Conocer la importancia Biológica del agua para el funcionamiento del organismo y el efecto de las variaciones.
- Revisar la importancia fisiológica de los procesos de equilibrio ácido-básico.

III. MÉTODOLÓGÍA

Para lograr los objetivos propuestos el estudiante deberá adelantar una revisión bibliográfica relacionada con la temática, resolver el taller de preguntas y entregar un informe escrito.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Espacio físico de laboratorio.

V. MUESTRA

No aplica

VI. TALLER DE PREGUNTAS

Taller 1. Agua: estructura y capacidad disolvente

1. Explique por qué la molécula de agua es polar.
2. ¿Qué tipos de compuestos puede disolver el agua?
3. ¿Por qué el benceno no puede ser disuelto por el agua?



4. ¿Qué son los puentes de hidrógeno?
5. ¿Qué relación existe entre los puentes de hidrogeno y el alto punto de ebullición o el bajo punto de fusión del agua?
6. Anote qué otros tipos de enlaces no covalentes se conocen. Explíquelos.
7. Indique a qué razón obedece la variación en el contenido acuoso de los diferentes tejidos del cuerpo. ¿Qué tipo de tejidos del cuerpo tienen mayor composición acuosa y cuales tienen menor y por qué?

Taller 2. pH y buffer

1. Defina ácidos y bases (fuertes y débiles).
2. ¿Qué es la constante de equilibrio en las reacciones reversibles?
3. ¿Qué es y qué indica pH?, ¿Cuál es su definición matemática?
4. ¿En qué intervalo de pH se mantiene la sangre?
5. ¿Cómo pueden los organismos vivos mantener el pH adecuado en cada sección de su cuerpo?
6. ¿Describa cómo está conformado un sistema de amortiguador o solución amortiguadora y que otros nombres recibe?

Taller 3. Acidosis y alcalosis

1. ¿Cuáles son los principales sistemas de amortiguamiento de los seres humanos y dónde funciona cada uno?
2. Escriba la ecuación de Henderson–Hasselbach; e indique la relación de proporcionalidad que según esta ecuación existe entre el pH y el cociente de $[A^-]/[HA]$
3. ¿Qué es y cuándo se considera que hay alcalosis o acidosis en nuestro organismo?

VII. EVALUACIÓN

Sustentación del taller



Evaluación del informe.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murray RK, Rodwell VW, Bender D, Botham KM, Weil P, Peter A, Kennelly J. Bioquímica de Harper. 29ª ed. McGraw-Hill. 2013.
- Feduchi E, Romero C, Yáñez E, Blasco I, Garcíañoz C. Bioquímica – Conceptos esenciales. 2ª ed. McGraw-Hill. 2015.
- Lozano A, Galindo JD, Garcíaaborrón JC, Martínez JH, Peñafiel R, Solano F. Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. 3ª ed. McGraw-Hill. 2005.



PRÁCTICA N°2

ESPECTROFOTOMETRÍA, COLORIMETRÍA, PRINCIPIOS BÁSICOS

I. INTRODUCCIÓN

La espectrofotometría es un método de análisis cuantitativo, de amplia aplicación en la sección bioquímica de los laboratorios clínicos.

La espectrofotometría de absorción en la región visible también llamada colorimetría, es un método que permite determinar la concentración de una molécula en solución, basada, por un lado, en la capacidad que tienen ciertas sustancias de absorber la energía radiante de esta parte del espectro electromagnético y por otro lado, en la relación que existe entre cantidad de energía absorbida y concentración de la molécula en solución.

Para que puedas entender mejor la anterior definición es necesario hacer un estudio sobre las generalidades y aspectos básicos referente a radiación electromagnética.

La radiación electromagnética (REM) es la forma de movilización a grandes velocidades de la energía radiante a través del espacio. La energía radiante se propaga en el espacio en forma de un tren de ondas que se moviliza a la vez dentro de un campo eléctrico y un campo magnético, de allí el término radiación electromagnética. Puesto que la REM tiene características de onda es costumbre describir la radiación dando su longitud de onda expresada en nanómetros (nm) o su frecuencia en centímetros a las menos uno (cm^{-1}).

Dependiendo de la longitud de onda o la frecuencia de las ondas, la REM se encuentra dividida en 7 zonas: rayos gamma, rayos X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), microondas, ondas de radio; esta clasificación se encuentra en orden creciente de longitud de onda y en orden decreciente de frecuencia. La



cantidad de energía asociada a la radiación es directamente proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda. El conjunto de todas ellas es denominado Espectro Electro-Magnético (EEM)

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Fomentar las habilidades y destrezas en el manejo de los equipos y materiales de laboratorio para cuantificación de biomoléculas de importancia clínica.

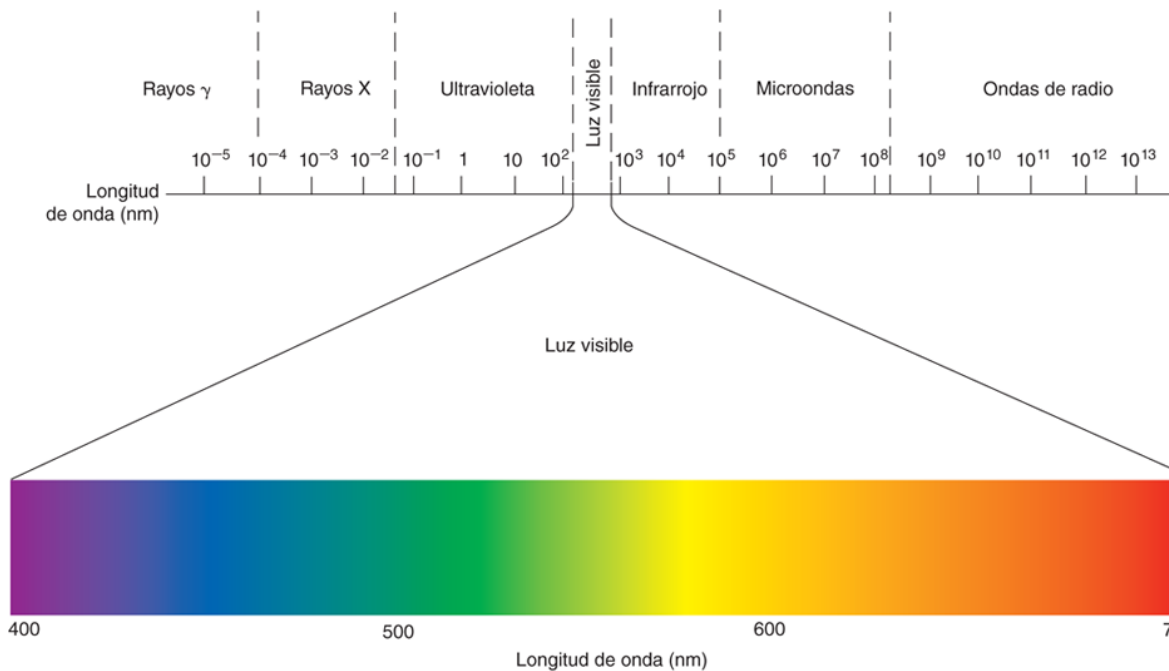
Objetivos específicos

- Comprender los conceptos básicos de la espectrofotometría y colorimetría.
- Conocer el fundamento y funcionamiento de los equipos de laboratorio
- Familiarizar al estudiante en el uso y manejo de equipos e instrumental de laboratorio.

III. FUNDAMENTO

Para el laboratorio clínico los tipos de REM de mayor utilidad son la radiación UV, la visible y la IR. El espectro visible va aproximadamente desde 700 nm (extremo rojo) a 400 nm (extremo violeta).

La región denominada visible comprende los fotones que por su cantidad de energía y su longitud de onda pueden ser captados por los ojos humanos, de allí su nombre; los fotones de esta región del EEM son reconocidos con el nombre general de colores y se organizan de mayor a menor cantidad de energías así:



Fuente: Trudy McKee, James R. McKee: *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*, 5e: www.accessmedicina.com
Derechos © McGraw-Hill Education. Derechos Reservados.

Después de lo anterior se puede entender con más claridad que existen moléculas que estando en la solución tienen la capacidad de absorber en su estructura fotones de la región visible del EEM y que la cantidad de energía absorbida por la solución es directamente proporcional a la concentración de dicha solución (**ley de Lambert-Beer**). Además, en virtud de esto último, la concentración de una solución se puede establecer por comparación de la cantidad de energía absorbida por la solución problema y la cantidad de energía absorbida por una solución patrón o referencia, que es aquella de la cual se tiene información precisa y exacta de su concentración. Así:

La cantidad de energía absorbida por la muestra problema (A_m) es proporcional a la concentración de la solución de dicha muestra (C_m); así como la cantidad de energía absorbida por la solución de referencia (A_p) es proporcional a la concentración de la solución de referencia (C_p); en otras palabras, se establece una regla de tres simple directa:



m=	concentración de la muestra
Cp =	concentración del patrón
Am =	absorbancia de la muestra
Ap =	absorbancia del patrón

Ap \longrightarrow **Cp**

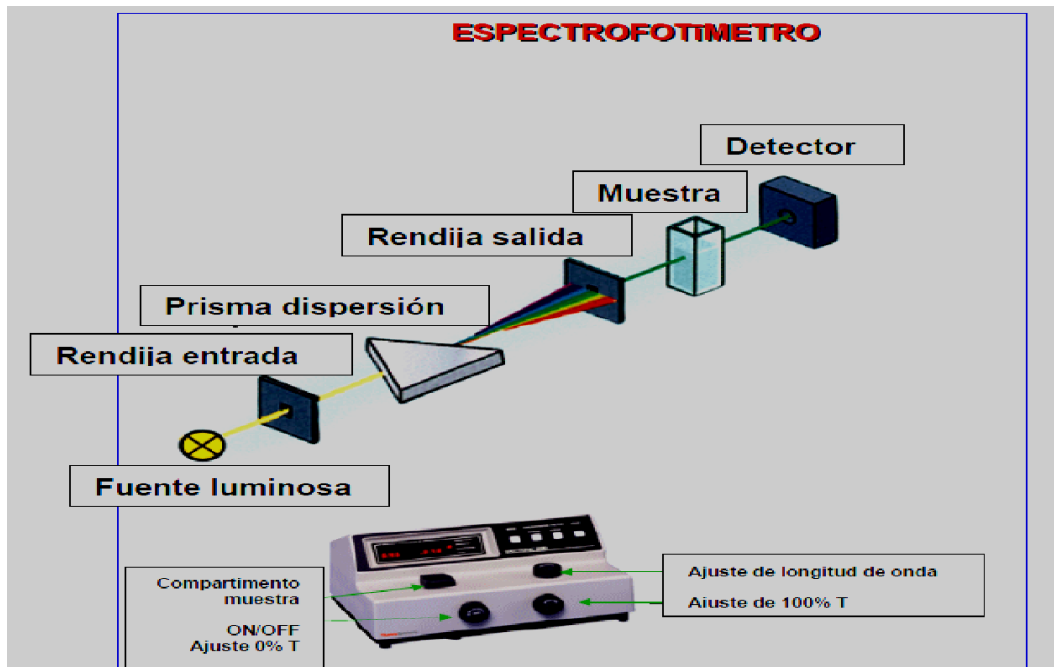
Am \longrightarrow **Cm**

si **Cm** es la incógnita, entonces:

$$\mathbf{Cm} = \frac{Am \times Cp}{Ap}$$

El espectrofotómetro es el instrumento diseñado para emitir y medir la cantidad de energía que puede ser absorbida por moléculas apropiadas en solución; consta de las siguientes partes generales:

- 1) Foco: es la fuente de radiación continua.
- 2) Monocromador o elemento difractor: es un artefacto que permite en primera medida difractar la luz y en segunda seleccionar la radiación de longitud de onda requerida.
- 3) Cubetas, celdas o portamuestras: son los recipientes que contienen la solución que se van a exponer a la radiación.
- 4) Detector: este artefacto tiene como función determinar la cantidad energía absorbida por la solución que se expone y convertir la energía luminosa en corriente eléctrica.
- 5) Medidor, tablero o pantalla: donde se hace la lectura de la medición.



N. A. Díaz. Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Solución patrón o estándar de concentración conocida.
- Reactivo colorimétrico o turbidimétrico para el patrón o estándar.

IV. MUESTRA

Suero humano (muestra problema)



V. PROCEDIMIENTO

Explicación y demostración magistral de las partes y funcionamiento del equipo de medición.

Desarrollo práctico (procedimiento):

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC DE COLORACION
M	10 μ L		1000 μ L
P		10 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L

Mezclar e incubar según los tiempos indicados en el inserto del reactivo de trabajo seleccionado.

Luego en el equipo leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco la longitud de onda especificada en el inserto.

VI. TALLER DE PREGUNTAS

1. Nota alguna diferencia de color en los tubos preparados anteriormente
2. ¿A qué se debe la diferencia del color?
3. ¿Qué relación puede notar entre la diferencia de color y la lectura que arroja el equipo?
4. Elabore un informe detallando los procedimientos y resultados obtenidos.



VII. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación y calificación del informe final

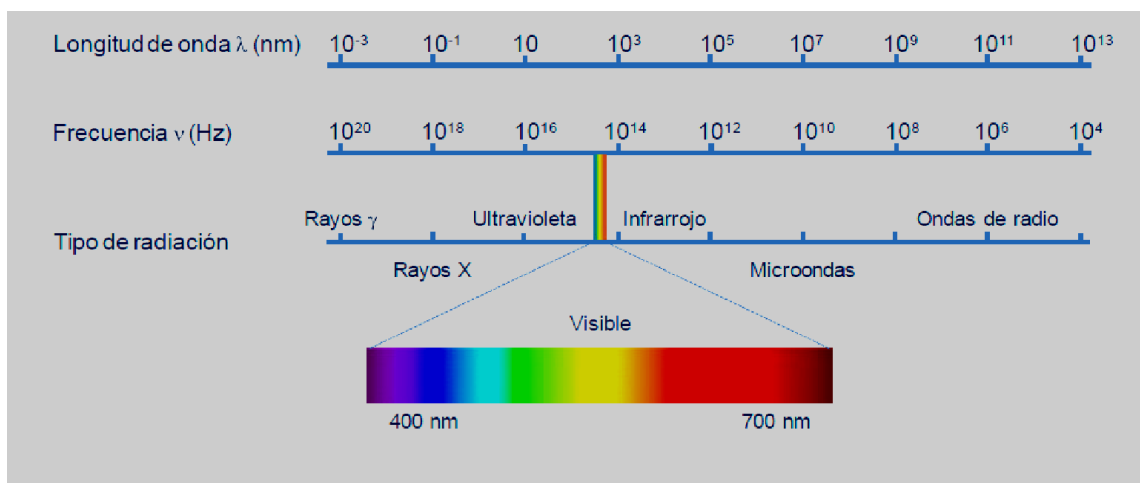
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Díaz et al. Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Rabanales, Córdoba España. 2012
- Harris DC. Análisis Químico Cuantitativo. 6ª ed. Editorial Reverté. 2017.

PRÁCTICA N°3 USO DEL ESPECTROFOTÓMETRO Y DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR

I. INTRODUCCIÓN

Algunas sustancias en solución, dependiendo de su naturaleza química, pueden absorber energía en un rango de longitudes de onda característico (visible, UV, IR etc). La máxima cantidad de energía absorbida por una solución de este tipo depende en principio de dos factores, el primero es la concentración de la sustancia en la solución y el segundo es la longitud de onda de la radiación a la cual se somete la solución. Para aplicar la colorimetría es necesario determinar la longitud de onda que permite la máxima absorción de energía por la solución, puesto que esa longitud de onda es con la que se debe trabajar en el colorímetro cuando se desea determinar la concentración de una muestra problema. (Espectro de absorción).



Harris, D. C. Análisis Químico Cuantitativo.

Muchas biomoléculas o metabolitos de importancia fisiológica y clínica pueden ser cuantificados por colorimetría, ya está determinada la longitud de onda específica a la cual cada una de ellas presenta su mayor absorción de energía.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar los procedimientos de análisis y cálculos para la cuantificación de metabolitos de importancia clínica.

Objetivos específicos

- Fomentar las habilidades y destrezas en el manejo del espectrofotómetro.
- Conocer los procedimientos matemáticos para la cuantificación de metabolitos en el laboratorio

III. FUNDAMENTO

En los análisis fotométricos se necesita siempre de uno o varios puntos de referencia con quien hacer comparaciones, a través de las cuales es posible el cálculo numérico de la concentración de la solución problema. En la construcción de una curva de calibración se usan varios patrones o soluciones de referencia, (son soluciones que contienen una concentración determinada y estandarizada de la molécula que se está cuantificando en el proceso); estas gráficas constituyen una de las herramientas para realizar el cálculo que conlleva a la determinación de la concentración de la solución problema, por interpolación en dicha gráfica de la absorbancia o de la transmitancia obtenida del instrumento, cuando se ha expuesto la solución problema a la longitud de onda característica para ella.

No obstante lo anterior, en un análisis fotométrico cualquiera incluida la colorimetría, en ausencia de una curva de calibración, se puede utilizar un solo dato de absorbancia de una solución de concentración conocida (patrón), para averiguar la concentración de una solución problema, estableciendo la siguiente relación: “La absorbancia del patrón es proporcional a la concentración de la solución del patrón así como la absorbancia de la muestra es proporcional a la concentración de la



solución de la muestra”; esta expresión sugiere una relación directa entre la concentración de una solución coloreada y la cantidad de energía absorbida por dicha solución. Para el cálculo matemático se aplica la siguiente ecuación:

Cm	Concentración de la muestra
Cp	Concentración del patrón
Am	Absorbancia de la muestra
Ap	Absorbancia del patrón

$$C_m = \frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

IV. MATERIALES Y REACTIVOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María,
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Solución patrón o estándar de concentración conocida.
- Reactivo colorimétrico o turbidimétrico para el patrón o estándar.

V. MUESTRA

Suero humano (muestra problema).



VI. PROCEDIMIENTO

Desarrollo práctico (procedimiento):

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	10 μ L		1000 μ L
P		10 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L

Mezclar e incubar según los tiempos indicados en el inserto del reactivo de trabajo seleccionado.

Luego, en el equipo leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco la longitud de onda especificada en el inserto. En ausencia de una curva de calibración, se puede utilizar un solo dato de absorbancia de una solución de concentración conocida (patrón), para determinar la concentración de una solución problema, estableciendo la siguiente relación: “La absorbancia del patrón es proporcional a la concentración de la solución del patrón así como la absorbancia de la muestra es proporcional a la concentración de la solución de la muestra”; esta expresión sugiere una relación directa entre la concentración de una solución coloreada y la cantidad de energía absorbida por dicha solución. Para el cálculo matemático se aplica la siguiente ecuación:

VII. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿Qué importancia clínica tiene la cuantificación de biomoléculas y metabolitos en sangre u otros fluidos corporales?



2. Calcular la concentración exacta de la muestra problema, aplicando la fórmula socializada.
3. Elaborar un informe detallando los procedimientos realizados en el laboratorio y los datos obtenidos, con el resultado final.

VIII. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación y calificación del informe final

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Díaz et al. Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Rabanales, Córdoba España. 2012
- Harris DC. Análisis Químico Cuantitativo. 6ª ed. Editorial Reverté. 2017.



PRÁCTICA N°4 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA

I. INTRODUCCIÓN

La cuantificación de glucosa en sangre o determinación de la concentración del metabolito en el suero o fluido corporal o simplemente determinación de glicemia, es una prueba de laboratorio especialmente útil en el diagnóstico y monitoreo de la diabetes.

La diabetes se caracteriza por una elevación crónica de la glucosa sanguínea, llamada hiperglicemia. Este aumento en los niveles de la glucosa en sangre se debe a un déficit total o parcial de insulina, que implica una disminución de la metabolización de la glucosa en la célula y en consecuencia un aumento de esta en la sangre; y según sea el déficit de insulina el incremento en la glucosa puede llegar a ser incompatible con la vida o provocar graves e irreversibles daños en una persona.

La diabetes puede ser diagnosticada con base en los niveles de glucosa en plasma bajo diferentes condiciones o con una prueba de hemoglobina glicosilada (HBA_{1C}) y teniendo en cuenta los criterios que se muestran en la siguiente tabla:

Criterios diagnósticos para Diabetes ADA 2018
Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL (no haber tenido ingesta calórica en las últimas 8 horas).
○
Glucosa plasmática a las 2 horas de ≥ 200 mg/dL durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba deberá ser realizada con una carga de 75 gramos de glucosa disuelta en agua.
○
Hemoglobina glicosilada (A1C) $\geq 6.5\%$. Esta prueba debe realizarse en laboratorios certificados de acuerdo a los estándares A1C del DCCT.
○
Paciente con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglucémica con una glucosa al azar ≥ 200 mg/dL.

American Diabetes Association. Guías ADA 2018



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar el proceso de cuantificación de glucosa en fluidos corporales y conocer su utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento de la prueba.
- Identificar los valores de referencia (normal y patológica) y la utilidad de estos.
- Interpretar correctamente el resultado de la determinación.

III. MÉTODO

Glucosa oxidasa/peroxidasa

IV. FUNDAMENTO

Para la prueba de cuantificación en sangre, la glucosa presente en la muestra es convertida por acción de la glucosa oxidasa (GOD) en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno; este último en presencia de peroxidasa (POD), oxida al cromógeno llamado 4-aminofenazona, convirtiéndolo en un compuesto de color rojo. La intensidad de este color depende de la cantidad de glucosa que existía originalmente en la muestra; por tanto si se determina la intensidad del color, se puede conocer la concentración de glucosa en la muestra por comparación del color de esta con el de un estándar (solución de glucosa con concentración conocida).

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.



- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación de glucosa.

VI. MUESTRA

Suero humano (muestra problema).

VII. PROCEDIMIENTO

- Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja.
- Esperar a que coagule y centrifugue a la velocidad y tiempo adecuado. Separe y recoja el sobrenadante en otro tubo.
- Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	10 μ L		1000 μ L
P		10 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L



Mezclar e incubar durante 10 min a 25^o C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 500 nm.

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿Qué importancia clínica tiene la prueba de laboratorio y qué patologías se pueden diagnosticar con la prueba?
2. Con la formula socializada, realice los cálculos de concentración de glucosa en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores de referencia.
3. Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
4. Elaborar un informe detallando los procedimientos realizados en el laboratorio y los datos obtenidos, con el resultado final.

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación y calificación del informe final

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Diabetes Association. Clasificación y diagnóstico de la diabetes, Guías ADA 2018.



- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, Texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°5 CUANTIFICACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS

I. INTRODUCCIÓN

Los triglicéridos o grasas neutras son ésteres de glicerol y ácidos grasos que provienen de la dieta o son sintetizados principalmente en el hígado.

En el intestino delgado los TAG son hidrolizados en sus ácidos grasos y glicerina para atravesar la pared intestinal, aislados o en forma de jabones al combinarse con los jugos pancreáticos e intestinales. Luego son reconstruidos de nuevo al otro lado de la pared intestinal, pero dado que los lípidos son insolubles en agua, deben combinarse con proteínas, sintetizadas por el intestino (quilomicrones), para ser transportadas y distribuidas a través de la sangre a todo el organismo; el transporte de triglicéridos está estrechamente integrado con el transporte de otros lípidos, como el colesterol. Las células del tejido adiposo son las principales células de reserva de grasas.

El cuerpo humano utiliza dos tipos de vehículos transportadores de lípidos:

- Lipoproteínas, como los quilomicrones, que los transportan al hígado tras su absorción por el intestino, desde donde se distribuyen al resto de células del cuerpo, sobre todo las adiposas y musculares en forma de lipoproteínas VLDL, IDL, LDL y HDL.
- Albúmina sérica. Transporta ácidos grasos libres.

Las concentraciones elevadas de triglicéridos en suero pueden ser debidas a alteraciones hepatobiliares, diabetes mellitus, nefrosis, hipotiroidismo, alcoholismo, hiperlipoproteinemia familiar tipo IV (elevación de VLDL) y tipo V (elevación de VLDL y quilomicrones), rara vez son tipo I (elevación exclusiva de quilomicrones).



II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar el proceso de cuantificación de triglicéridos en sangre y conocer su utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento bioquímico de la prueba.
- Identificar los valores de referencia (normal y patológico) y la utilidad de la cuantificación del metabolito.
- Interpretar correctamente los resultados de la determinación y su relación con los estados de salud y enfermedad.

III. MÉTODO

Glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa

IV. FUNDAMENTO

El desarrollo de la prueba inicia con la hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos y glicerol por acción catalítica de lipasas presentes, a continuación el glicerol liberado anteriormente es fosforilado por medio de la enzima glicerol kinasa, el donador de fosfato es el ATP, con lo que se forma ADP y glicerol-3-fosfato; este último es oxidado gracias a la presencia de la glicerol-3-fosfato oxidasa convirtiéndose en dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrogeno; finalmente el peróxido de hidrogeno generado anteriormente reacciona con la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol, bajo la influencia catalítica de la peroxidasa, el resultado es la formación de la tintura de quinoneimina que funciona como indicador cuantitativo de la presencia de TAG.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.



- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.

VI. MUESTRA

Suero humano (muestra problema).

VII. PROCEDIMIENTO

Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja.

Esperar a que coagule y centrifugue a la velocidad y tiempo adecuado.

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	10 μ l		1000 μ l
P		10 μ l	1000 μ l
B			1000 μ l



Mezclar e incubar durante 15 min a 25⁰ C (temperatura ambiente), o 5 min a 37⁰ C, luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 500 nm.

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- ¿Qué importancia clínica tiene la prueba de laboratorio y que patologías se pueden diagnosticar con la prueba?
- Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de triglicéridos en la muestra.
- Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- Elaborar un informe detallando los procedimientos realizados en el laboratorio y los datos obtenidos, con el resultado final.

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación y calificación del informe final

● REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murray RK, Rodwell VW, Bender D, Botham KM., Weil P, Peter A, Kennelly J. Bioquímica de Harper. Editorial: McGraw-Hill. Año: 2013. Edición:29ª



- Ministerio de Salud y Protección Social, Colciencias. Guía de práctica clínica para la prevención, detección temprana, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las dislipidemias en la población mayor de 18 años. 2014
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°6 CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y HDL

I. INTRODUCCIÓN

El colesterol es un compuesto fundamental en los tejidos, pues forma parte de las membranas celulares y es el precursor inmediato de varias biomoléculas esenciales para la vida, como las hormonas esteroideas y los ácidos biliares.

El colesterol presente en el organismo procede de la dieta y de la biosíntesis que las células realizan a partir de acetilCoA. El exceso de esta biomolécula se excreta como tal en las descamaciones celulares de la piel e intestino, lo mismo que por las secreciones gástricas, o intestinales; también tras la conversión del colesterol en hormonas esteroideas y ácidos biliares importantes para la solubilización de las grasas a nivel intestinal y posteriormente ser eliminado en forma de Coprostanol y Colestanol por acción de la flora bacteriana intestinal en la materia fecal.

Los niveles óptimos de colesterol dependen de un perfecto equilibrio entre la ingesta y la síntesis por un lado, y de la excreción por otro lado. Si el equilibrio se rompe puede producirse un aumento y, en consecuencia, la aparición a mediano plazo de graves problemas tales como aterosclerosis que finalmente genera accidentes cardiocirculatorios (infarto del miocardio, angina de pecho o hemorragias cerebrales).

La cuantificación del colesterol sérico total tiene una utilidad comprobada en el diagnóstico de hiperlipoproteinemia, arterosclerosis, enfermedades hepáticas y tiroidales. El dato de colesterol total y el de colesterol HDL, junto con una determinación de triglicéridos proveen una información valiosa para la predicción de la enfermedad coronaria.



El colesterol presente en la sangre puede existir de dos maneras, una es esterificado con ácidos grasos y la otra es libre, es decir sin esterificar; la suma de estas dos fracciones diferentes se denomina colesterol total.

A través de múltiples investigaciones se ha podido entender que existe una relación inversa entre la concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el riesgo de aparición de enfermedades coronarias y cardíacas, así mismo se ha podido determinar que la presencia de altas concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) está relacionada con la aparición de aterosclerosis y un alto riesgo de desarrollo de enfermedades cardíacas.

Para el médico es de suma importancia contar con los datos de niveles séricos no solo del colesterol total, sino también del colesterol presente en las lipoproteínas de alta y baja densidad, que junto con la determinación del nivel sérico de triglicéridos constituyen el denominado perfil lipídico. Esta información global le permite al médico establecer el estado del metabolismo de los lípidos de un individuo y así el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar el método enzimático de cuantificación de colesterol, para comprender su fundamento y utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento de la determinación del metabolito.
- Conocer los valores normales y patológicos (valor de referencia) para la prueba, su utilidad y las patologías relacionadas con el colesterol.
- Interpretar correctamente el resultado de la determinación



III. MÉTODO

Colesterol oxidasa/peroxidasa. Colesterol HDL reactivo precipitante

IV. FUNDAMENTO

El método a utilizar es netamente enzimático, y con él se puede determinar el colesterol total directamente en el plasma o en el suero a través de una serie de reacciones, en las que inicialmente los esteres de colesterol son hidrolizados con el fin de unificar al colesterol en una sola forma, luego todo el colesterol es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno, este último, finalmente se hace reaccionar con una mezcla de fenol y 4-aminoantipirina para formar la tintura de quinoneimina, cuya intensidad de color depende de la concentración de colesterol total en la muestra. Todas las reacciones anteriormente comentadas están catalizadas por las enzimas Estercolesterol hidrolasa, colesterol oxidasa y peroxidasa respectivamente.

La absorbancia del compuesto coloreado obtenido a partir de la muestra se mide en un colorímetro a 500 nm y se compara con la absorbancia de otro obtenido de una solución estándar de colesterol.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.



- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación de Colesterol total y Colesterol HDL.

VI. MUESTRA

Suero humano (muestra problema)

VII. PROCEDIMIENTO

Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja. Una vez coagulado centrifugar y separar.

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	10µl		1000µl
P		10µl	1000µl
B			1000µl

Mezclar e incubar durante 10 min a 25⁰ C (temperatura ambiente), o 5 min a 37°C en baño de María. Luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 500 nm y calcular los valores:



$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

FUNDAMENTO (COLESTEROL HDL)

Los quilomicrones, VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad) se precipitan y separan de las HDL (lipoproteínas de alta densidad) por medio de la reacción con el ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio (reactivo precipitante). Mediante centrifugación se garantiza que el sobrenadante posea de manera exclusiva solo a las HDL; luego a partir del sobrenadante se hace la cuantificación del colesterol. Así de esta manera el dato que se obtendrá será solo del colesterol denominado HDL.

PRECIPITACIÓN

- Ensayo macro: en un tubo de ensayo para centrífuga dispensar 500µl (Volumen inicial) de la muestra (suero sanguíneo) y adicionar 1000µl (volumen final) del reactivo precipitante no diluido.
- Ensayo micro: en un tubo de ensayo para centrífuga dispensar 200µl (Volumen inicial) de la muestra (suero sanguíneo) y adicionar 500µl (volumen final) del reactivo precipitante no diluido.

Mezclar bien, incubar por 10 min a temperatura ambiente y centrifugar por 10 min a 3500 rpm aproximadamente. Después de centrifugar separar el sobrenadante claro, y usar como muestra determinar la concentración de colesterol.

CUANTIFICACIÓN

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:



TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	AGUA DESTILADA	REACT. DE COLORACION
M	100µl			1000µl
P		100µl		1000µl
B			100µl	1000µl

Mezclar e incubar por 30 min a temperatura ambiente o 10 min a 37° C en baño de María. Transcurrido el tiempo de incubación, leer la absorbancia de la muestra y el estándar respectivamente frente al blanco de reactivo a una longitud de onda de 500 nm y calcular las concentraciones:

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- 1) Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de colesterol HDL en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- 2) Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- 3) Investigar la importancia clínica de la cuantificación del perfil lipídico.

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica



Evaluación, calificación y sustentación del informe final

- **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Murray RK, Rodwell VW, Bender D, Botham KM., Weil P, Peter A, Kennelly J. Bioquímica de Harper. Editorial: McGraw-Hill. Año: 2013. Edición:29ª
- Ministerio de Salud y Protección Social, Colciencias. Guía de práctica clínica para la prevención, detección temprana, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las dislipidemias en la población mayor de 18 años. 2014
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°7

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y ALBÚMINA

I. INTRODUCCIÓN

A excepción de las hormonas peptídicas y de las inmunoglobulinas, las proteínas circulantes en sangre son de síntesis principalmente hepática. Entre ellas están los factores de coagulación, los factores del sistema complemento, las lipoproteínas, las proteínas reactantes de fase aguda, etc.

Por medio de la denominada electroforesis de límite móvil o frontal, fue posible el conocimiento actual de la composición de las proteínas del suero; existe una clasificación de estas de acuerdo a su grado de movilidad electroforética así: albúmina, α_1 , α_2 , β y γ globulinas. Las fracciones α_1 , α_2 , β y γ globulinas representan cada una diferentes grupos de proteínas, que poseen entre sí un comportamiento electroforético similar.

El estudio de las proteínas sanguíneas es de gran importancia, puesto que facilita la comprensión de ciertos estados patológicos, dado que las concentraciones de éstas en sangre se alteran ante el desarrollo de muchas enfermedades, por ejemplo: hepatopatías, desordenes del sistema inmunológico, enfermedades renales y también ante traumatismo o intervenciones quirúrgicas etc.

La albúmina es la más abundante de las proteínas séricas. Su importancia en el funcionamiento del cuerpo es la habilidad para transportar sustancias tales como medicamentos, antibióticos, bilirrubina y ácidos y sirve como almacén de proteínas de estructura necesarias para el crecimiento de los tejidos. Los niveles bajos de albúmina ocurren comúnmente en una variedad de enfermedades tales como el síndrome nefrítico, enfermedades hepáticas, infecciones agudas y mala nutrición haciendo así a las determinaciones de albúmina de primordial importancia.



Muchos métodos han sido descritos para determinar a la albúmina sérica. En 1965 F. L. Rodkey introdujo un método simple basado en la unión de la proteína con colorantes. La reacción de la albúmina con el verde de bromocresol es la de más amplio uso.

El procedimiento que se usará está basado en las propiedades de albúmina sérica de unirse con colorantes, en este caso con el Verde de bromocresol. La absorbancia del VBC a 630 nm se incrementa al unirse con la albúmina y es proporcional a la concentración de albúmina presente en el suero.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer y aplicar la técnica de cuantificación de proteínas totales y albúmina en el suero sanguíneo.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento de las técnicas de cuantificación de los metabolitos.
- Identificar y relacionar los valores normales y patológicos (valor de referencia) para la prueba y la utilidad de estos.
- Interpretar correctamente el resultado de la determinación y conocer que patologías se relacionan con estos metabolitos y sus niveles sanguíneos.

III. MÉTODO

Biuret (Proteínas totales). Verde de Bromocresol(Albúmina)

IV. FUNDAMENTO



La cuantificación de las proteínas totales se basa en la capacidad que tienen las moléculas con enlaces peptídico de reaccionar con el reactivo de Biuret, el cual está constituido básicamente por acetato de cobre (III), yoduro de potasio e hidróxido de sodio. Los iones cúpricos en medio alcalino reaccionan con las proteínas y los péptidos de la muestra formando un complejo de color púrpura. La absorbancia de este complejo es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra; la cual se mide a un longitud de onda entre 520 y 580 nm.

Para la determinación de Albúmina, la proteína presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en medio ácido originando un compuesto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

V. MATERIALES Y REACTIVOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación proteínas totales y albúmina.



VI. MUESTRA

- Suero humano (Muestra problema).

VII. PROCEDIMIENTO (PROTEINAS TOTALES)

Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja. Una vez coagulado centrifugar y separar.

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	20 MI		1000 μ L
P		20 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L

Mezclar e incubar durante 10 min a 25⁰ C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 545 nm.

PROCEDIMIENTO (ALBÚMINA)

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	10 μ L		1000 μ L
P		10 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L



Mezclar e incubar durante 1 min a 25⁰ C (temperatura ambiente), luego en el colorímetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 630 nm. Realizar los respectivos cálculos según los datos obtenidos.

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Con la formula anterior se realizar los cálculos de la concentración de proteínas totales en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
2. Con la formula anterior se realizar los cálculos de la concentración de albúmina en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
3. Investigue la utilidad clínica de la cuantificación de proteínas totales y albúmina.
4. Con los datos de concentración de proteínas totales y de albúmina, calcule el valor de globulinas en la muestra. ¿Porque es importante de determinación de las Globulinas?

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica.

Evaluación, calificación y discusión en mesa redonda del informe final.

- **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- Murray RK, Rodwell VW, Bender D, Botham KM, Wei P, Peter A, Kennelly J. Bioquímica de Harper. 29^a Ed. McGraw-Hill. 2013.



- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio: Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio. 11ª ed. Elsevier España. 2014.
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRACTICA N° 8 CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA

I. INTRODUCCIÓN

La hemoglobina es el componente principal de los glóbulos rojos, químicamente es una proteína conjugada del grupo de las hemoproteínas; tiene como función principal transportar oxígeno de los pulmones hacia los tejidos.

Una molécula de hemoglobina consta de dos pares de cadenas de polipéptidos, denominadas globina; cuatro grupos prostéticos denominados hem o hemo, los cuales contienen cada uno un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}). Cada grupo hem está unido a una cadena polipeptídica. Tiene la capacidad de combinarse con cuatro moléculas de oxígeno (O_2), por medio del hierro ferroso de cada grupo hem presente en las cadenas (cada hierro une a un O_2).

La hemoglobina no asociada al oxígeno se denomina hemoglobina reducida (Hb); cuando cada grupo hem se asocia a una molécula de oxígeno, se forma la oxihemoglobina (HbO_2); tanto en la Hb; como en la HbO_2 el hierro del grupo hem permanece como hierro ferroso; cuando el hierro se oxida a hierro férrico (Fe^{3+}) se forma la metahemoglobina o hemoglobina (Hi) y la molécula pierde la capacidad de combinarse con el oxígeno.

La anemia es la alteración más corriente relacionada con la hemoglobina; que se define funcionalmente como una masa de eritrocitos (Glóbulos rojos) insuficientes para suministrar adecuadamente oxígeno a los tejidos periféricos. Para fines prácticos la anemia se puede definir en relación a la medición en la sangre de la concentración de la hemoglobina, el hematocrito o el recuento de eritrocitos. Tratando de unificar este concepto a nivel universal, la Organización Mundial de la



Salud recomienda que la definición de anemia se establezca en función de la concentración de hemoglobina.

La hemoglobina también puede verse aumentada en ciertos trastornos por una superproducción de glóbulos rojos, caso que recibe el nombre de policitemia. Junto con otros parámetros hematológicos la determinación de hemoglobina se utiliza para evaluar estados anémicos, pérdidas de sangre, hemólisis y policitemia; además que ayuda al diagnóstico de enfermedades relacionadas con los casos mencionados.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar el método de la cianometahemoglobina para la cuantificación de hemoglobina en sangre humana y conocer su utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento y la utilidad clínica de la prueba
- Describir los estados patológicos relacionados con los niveles sanguíneos de Hemoglobina

III. MÉTODO

Drabkin

IV. FUNDAMENTO

La hemoglobina reacciona con el reactivo de Drabkin, el cual contiene ferrocianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), cianuro de potasio (KCN) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$). La mayoría de las formas de hemoglobina que se encuentran en la



sangre son convertidas en metahemoglobina (hemiglobina, Hi) por acción del $K_3Fe(CN)_6$; posteriormente la Hi reacciona con el KCN, que proporciona los iones cianuro (CN), para formar cianometahemoglobina (HbCN), el cual es un compuesto coloreado que tiene una absorbancia máxima a una longitud de onda de 540nm.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos de ensayo grandes.
- Tubos tapa lila o con EDTA.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Reactivo de Drabkin.
- Patrón de hemoglobina.

VI. MUESTRA

Sangre anticoagulada con EDTA recolectada en tubo tapa lila.

VII. PROCEDIMIENTO

Extraer 3 ml de sangre; tratar con anticoagulante (1 ml de EDTA al 1%) agite para homogenizar.



Coloque 5 ml del reactivo de Drabkin en un tubo de ensayo.

Con una pipeta de hemoglobina, vierta en el tubo que contiene Drabkin, 20 μ l (0.02 ml) de sangre bien homogenizada; para asegurar la completa adición de la sangre, limpie la parte exterior de la pipeta con papel absorbente, luego enjuáguela por dentro con la mezcla recién formada, por lo menos 3 veces.

Agite y deje reposar por 10 minutos.

Prepara un blanco y patrón y lea en el espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm. Con los datos obtenidos realizar los cálculos de concentración.

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- 1) Con la formula anterior se realizan los cálculos de la concentración de hemoglobina en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes.
- 2) Investigue la importancia clínica de la cuantificación de hemoglobina y las patologías que se relacionan con niveles disminuidos y aumentados.

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación, calificación y socialización grupal del informe final



- **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Campuzano G. Anemia, un signo no una enfermedad. Laboratorio Clínico Hematológico. 6ª ed. Editora Medica Colombiana. Medellín Colombia; 2016.
- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio: Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio. 11ª ed. Elsevier España. 2014.
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°9 CUANTIFICACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA

I. INTRODUCCIÓN

Los niveles altos de bilirrubina en suero producen una condición clínica conocida como ictericia. Dos formas de bilirrubina pueden ser responsables de ictericia: la bilirrubina conjugada y la no conjugada. El hígado convierte la forma no conjugada a conjugada, ya que de esta manera puede ser más fácilmente excretada. En la ictericia obstructiva y enfermedad hepática el proceso de excreción se ve afectado y la bilirrubina conjugada se eleva en el suero. El hígado de algunos recién nacidos no está completamente desarrollado y por lo tanto es incapaz de convertir la forma no conjugada a la conjugada para permitir su excreción, por esta razón, la bilirrubina no conjugada se puede elevar en el suero causando la ictericia. Por lo anterior resulta de importancia reconocer los valores de bilirrubina en la sangre.

La bilirrubina conjugada químicamente es muy hidrosoluble, y la no conjugada que es hidrófoba. Gracias a su solubilidad la bilirrubina conjugada puede reaccionar directamente con el ácido sulfanílico diazoado, de allí que también se le reconozca como bilirrubina directa. En cuanto a la bilirrubina no conjugada, por su carácter hidrofóbico no reacciona tan rápido con el ácido sulfanílico, por lo que se requiere de un acelerador para que se pueda dar la reacción con el mencionado ácido. Este hecho da a entender que la bilirrubina no conjugada reacciona con el ácido pero de manera indirecta.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar en el laboratorio la técnica de cuantificación de bilirrubinas en el suero sanguíneo y conocer su utilidad clínica.

Objetivos específicos

- Conocer el fundamento de la prueba.



- Conocer los valores normales y patológicos (valor de referencia) para la prueba y la utilidad para el diagnóstico de patologías que cursan con ictericia.
- Interpretar clínicamente los resultados de la determinación.

III. MÉTODO

Sulfanílico Diazotado

IV. FUNDAMENTO

La bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotado (DSA) formando un color rojo. La absorbancia de este color a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra. Para determinar la concentración de bilirrubina total se tratará a la muestra con el ácido sulfanílico diazotado y en presencia de un acelerador, de esta manera toda la bilirrubina presente en la muestra reaccionará e inducirá al desarrollo del color, por lo que el resultado será bilirrubina total

Para la determinación de la bilirrubina directa se tratará la muestra con el ácido sulfanílico diazotado pero esta vez sin acelerador con lo que la bilirrubina que reaccionará será la conjugada y por tanto el resultado será el de bilirrubina directa.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.



- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación de Bilirrubina total y directa

VI. MUESTRA

Suero humano (Muestra problema)

VII. PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo de Trabajo: Vaciar el contenido de un vial de Reactivo B en un frasco de Reactivo AT para la determinación de bilirrubina total, o en un frasco de Reactivo AD para la determinación de bilirrubina directa. Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 1 mL de Reactivo B + 4 mL de Reactivo AT o AD. Estable 20 días a 2-8° C.

MUESTRAS

Suero recogido mediante procedimientos estándar.

La bilirrubina en suero es estable 2 días a 2-8° C si se protege de la luz.

PARA BILIRRUBINA TOTAL

Marcar los tubos de ensayo y pipetear según las siguientes cantidades:



	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra	Patrón
Agua destilada	100 µL			
Muestra		100 µL	100 µL	
Patrón (S)				100 µL
Reactivo (AT)		1,0 mL		
Reactivo de Trabajo	1,0 mL		1,0 mL	1,0 mL

Agitar bien y dejar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.

Leer la absorbancia (A) de las Muestras y del Patrón a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

PARA BILIRRUBINA DIRECTA

Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra
Agua destilada	100 µL		
Muestra		100 µL	100 µL
Reactivo (AD)		1,0 mL	
Reactivo de Trabajo	1,0 mL		1,0 mL

Agitar bien y dejar reaccionar durante exactamente 5 minutos a 37° C.

Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.

Leer la absorbancia (A) de las Muestras a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.



CALCULO

La concentración de bilirrubina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco muestra} \times \text{Conc. Patrón}}{\text{Abs. Patrón}} = \text{Conc. Muestra}$$

En los cálculos de bilirrubina directa, se debe utilizar el valor de absorbancia obtenido para el patrón en el procedimiento de bilirrubina total.

Para lecturas efectuadas con cubetas de 1 cm, se puede aplicar el siguiente factor:

$$(A \text{ muestra} - A \text{ blanco muestra}) \times 7,74 = \text{Conc. Muestra (mg/dL)}$$

$$\text{Concentración masa (mg/dL)} \times 17,1 = \text{concentración sustancia } (\mu\text{mol/L})$$

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

1. Investigue la importancia clínica de la cuantificación de Bilirrubinas
2. ¿Qué es ictericia y qué patologías se acompañan de ictericia?
3. ¿Cómo se produce la bilirrubina y por medio de qué mecanismo fisiológico es eliminada del organismo?

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación, calificación y socialización grupal del informe final

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asociación Colombiana de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología. Guía de práctica clínica para la enfermedad hepaticagrasa no alcohólica. Rev. Col. Gastroenterología. 2015; 30(1).



- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio: Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio. 11ª ed. Elsevier España. 2014.
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°10 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

I. INTRODUCCIÓN

El ácido úrico es el producto final más importante del catabolismo de las bases púricas: adenina, guanina, xantina e hipoxantina, las dos primeras forman parte de los ácidos nucleicos; las otras dos son intermediarios de su metabolismo.

Existen dos fuentes de ácido úrico: la endógena por destrucción de tejidos del propio organismo, y la exógena proveniente de la alimentación. En ambos casos la eliminación se realiza por vía urinaria. Cuando hay niveles anormales de ácido úrico en suero, puede deberse a desordenes en el metabolismo de las sustancias que lo originan o a defectos en la eliminación.

Se observan niveles aumentados de ácido úrico en suero en enfermedades tales como: artritis gotosa, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca congestiva, leucemia, policitemia, mieloma múltiple, intoxicación plúmbica, anemia perniciosa y eclampsia. Se observan niveles disminuidos de ácido úrico en suero en casos tales como: tratamientos con drogas uricosúricas, enfermedad de Wilson, Síndrome de Fanconi, necrosis aguda de hígado.

Se define Hiperuricemia cuando la concentración sérica de ácido úrico es superior a 7 mg/dl. Suele ser más frecuente en el hombre que en la mujer, en una relación 3:1. En el hombre se presenta con frecuencia después de los 30 años de edad y en las mujeres en la postmenopausia.

La hiperuricemia puede presentarse por:

A) Aumento en la producción de ácido úrico:

- Hiperuricemia primaria: anomalías en el metabolismo o idiopáticas



- Hiperuricemia secundaria: ingesta excesiva de purinas. Consumo excesivo de alcohol, fase blástica de enfermedades linfoproliferativas, radio o quimioterapia en leucemias o linfomas. Mieloma múltiple, policitemias, anemias hemolíticas, glucogenosis tipo III, V y VII, psoriasis extensa.

Disminución de la excreción de ácido úrico (más frecuente)

- Hiperuricemia primaria: idiopática sin lesión renal previa
- Hiperuricemia secundaria: ingesta de alcohol, fármacos (tiazidas, etambutol, salicilatos a bajas dosis, pirazinamida, ciclosporina, ácido nicótico, levodopa), acidosis láctica, cetoacidosis, síndrome de Down, insuficiencia renal crónica, intoxicación por plomo, hiperparatiroidismos, sarcoidosis.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Aplicar en el laboratorio el fundamento de la técnica de cuantificación de ácido úrico en el suero sanguíneo.

Objetivos específicos

- Conocer y estudiar el fundamento teórico de la prueba
- Identificar y relacionar los valores normales y patológicos (valor de referencia) para la prueba.
- Interpretar clínicamente los resultados de la determinación y conocer su utilidad clínica.

III. MÉTODO

Uricasa / Peroxidasa

IV. FUNDAMENTO

El ácido úrico presente en la muestra es oxidado enzimáticamente por acción de la uricasa (UOD) y transformado en alantoína y peróxido de hidrógeno. El peróxido



de hidrogeno formado reacciona con el ácido 3,5-dicloro-2 hidroxibencenosulfónico y la 4-Aminofenazona, en presencia de peroxidasa (POD), para formar un complejo de quinoneimina de color rojo. La intensidad de color medida fotocolorimetricamente a 510 nm permite cuantificar el ácido úrico presente en las muestras.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación de ácido úrico.

VI. MUESTRA

Suero humano (muestra problema).

VII. PROCEDIMIENTO

Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja. Una vez coagulada centrifugar y separar.



Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REAC. DE COLORACION
M	25 μ L		1000 μ L
P		25 μ L	1000 μ L
B			1000 μ L

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o durante 10 minutos a 20-25 °C o 5 minutos a 37°C en baño de María. Una vez transcurrido el tiempo de incubación Leer a 520 nm contra blanco de reactivos. El color es estable durante una hora a 20-25 °C. Con los datos obtenidos hacer los cálculos de concentración.

$$C_m = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón

VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- Con la formula anterior se pueden realizar los cálculos de la concentración de ácido úrico en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores de referencia.
- Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.
- Investigar la importancia clínica de la cuantificación de ácido úrico, valores de referencia y las patologías relacionadas con hiperuricemia.



IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación, calificación y presentación grupal del informe final

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Colombiana de salud. Guía de manejo de consulta especializada de Reumatología. Artritis Gotosa. Manual de calidad. CDS GDM 2.1.2.1 RE-01. 2012
- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio: Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio. 11ª ed. Elsevier España. 2014
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



PRÁCTICA N°11 CUANTIFICACION DE CREATININA

I. INTRODUCCIÓN

La creatinina es el producto final del catabolismo de la creatina (o fosfocreatina). La cantidad producida diariamente está relacionada con la masa muscular. La creatinina filtra libremente por el glomérulo (pequeñas cantidades son reabsorbidas y también secretadas por los túbulos renales). La medición de creatinina tiene utilidad casi exclusivamente para la evaluación de la función renal (perfusión renal alterada, pérdida de la función de las nefronas) y en la monitorización de la diálisis renal. El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

La enfermedad renal se define como una anormalidad en la estructura y función del riñón, con implicaciones para la salud del individuo, puede ocurrir de manera abrupta, resolverse o volverse crónica. La evaluación de la tasa de filtración glomerular (TFG) es una de las pruebas de gran importancia para evaluar la función renal. Se recomienda el uso de la creatinina sérica y una ecuación de cálculo de la TFG para la evaluación inicial.

II. OBJETIVOS

Objetivos generales

Conocer y aplicar en el laboratorio la técnica de cuantificación de Creatinina en el suero sanguíneo.

Objetivos específicos

Estudiar el fundamento teórico de la prueba

Conocer la utilidad clínica y los valores normales y patológicos (valor de referencia) para la prueba.



Interpretar correctamente el resultado de la determinación y describir los estados patológicos relacionados con alteraciones cuantitativas del metabolito.

III. MÉTODO

Picrato alcalino

IV. FUNDAMENTO

La creatinina presente en la muestra de estudio reacciona con el picrato en medio alcalino, formando un complejo coloreado. Se mide la velocidad de formación de dicho complejo en periodos de tiempo iniciales cortos evitándose así la interferencia con otros compuestos.

V. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Baño de María.
- Centrífuga.
- Puntas amarillas.
- Puntas azules.
- Pipeta 0-50 microlitros.
- Pipeta 100-1000 microlitros.
- Cubetas para bts-330 o bts-350 de Biosystem.
- Pinza sacatubos.
- Tubos tapa roja.
- Jeringa o sistema vacutainer.
- Algodón.
- Alcohol.
- Torniquete.
- Kit completo de cuantificación sérica de creatinina.



VI. MUESTRA

Suero humano (Muestra problema).

VII. PROCEDIMIENTO

Preparar el material de venopunción. Tomar las muestras y dispensarlas en los tubos tapa roja. Una vez coagulada centrifugar y separar.

Reactivo de Trabajo: Mezclar volúmenes iguales de Reactivo A y de Reactivo B. Homogeneizar. Estable 1 mes a 2-8°C.

Marcar tres tubos como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera:

TUBO	SUERO MUESTRA	SUERO PATRON	REACTICO DE TRABAJO
M	100µL		1000 µL
P		100µL	1000 µL
B			1000 µL

Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Leer la absorbancia a 500 nm para patrón y muestra después de 30 segundos (A1) y después de 90 segundo (A2)

CALCULO

La concentración de creatinina en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula general:

$$C_m = \frac{A_{m2} - A_{m1}}{A_{p2} - A_{p1}} \times C_p$$

C_m = concentración de la muestra

C_p = concentración del patrón

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del patrón



VIII. TALLER DE PREGUNTAS

- Con la fórmula anterior se realizan los cálculos de la concentración de creatinina en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales y patológicos de referencia.
- Establezca la secuencia ordenada de reacciones y los productos obtenidos en las mismas.
- Investigar la importancia clínica de la cuantificación de creatinina, valores de referencia y las patologías o condiciones relacionadas con hipercreatinemia.
- ¿Por qué la creatinina en clínica se la utiliza como marcados de la función renal?
- Además de la creatinina, ¿qué pruebas se utilizan en la práctica clínica para evaluar, monitorear o diagnosticar enfermedades relacionadas con el funcionamiento renal?

IX. EVALUACIÓN

Evaluación de los procedimientos durante la práctica

Evaluación, calificación y discusión del informe final en meza redonda.

- **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
- Ministerio de salud y protección Social, Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud. Guía práctica para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica. Guía número GPC 2016-59. Bogotá, Colombia. Mayo de 2016.
- Gaw A, Murphy MJ, Srivastava R, Cowan RA, Reilly D. Bioquímica clínica Allan Gaw, texto y atlas en color. 5ª ed. Elsevier España. 2015.
- Pagana KD, Pagana TJ. Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio: Guía de Pruebas diagnósticas y de Laboratorio. 11ª ed. Elsevier España. 2014
- Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH. Inserto



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 110

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

