

4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y CUANTIFICACION DEL GLUCOGENO HEPATICO

ESQUEMA

- Introducción
- Fundamento teórico: El glucógeno como reserva energética
Metabolismo del glicógeno hepático
Glucogenosis
La degradación del glucógeno por la α -amiloglucosidasa
Determinación colorimétrica de la glucosa
- Procedimiento práctico: Materiales y reactivos
Procedimiento experimental
- Cálculos y análisis de los resultados obtenidos

I. INTRODUCCIÓN

En esta práctica se llevará a cabo la degradación enzimática del glucógeno empleando la α -amiloglucosidasa, una enzima que degrada totalmente el glucógeno. La glucosa total obtenida por hidrólisis se determinará mediante una reacción enzimática (Glc oxidasa / POD), que da lugar a un sustrato coloreado cuya concentración se puede medir por espectrofotometría. Como sustrato inicial se utilizará glucógeno extraído de ratas normales y diabéticas, con el fin de comparar los resultados obtenidos en dos situaciones fisiológicas diferentes. La finalidad última de esta práctica es comprobar, mediante un ejemplo práctico, la capacidad del hígado para adaptarse a diversas situaciones metabólicas intentando mantener el aporte energético a otros tejidos.

II. FUNDAMENTO TEORICO

Ila. El glucógeno como reserva energética

El glucógeno es el polisacárido de reserva de células animales, formado por unidades de glucosa unidas entre sí mediante enlaces α 1 \rightarrow 4 y con ramificaciones en α 1 \rightarrow 6 cada 4 - 6 residuos. El glucógeno posee un extremo reductor unido a la proteína glucogenina por un residuo de Tyr y varios extremos no reductores en los que actúan las enzimas responsables de la biosíntesis y degradación de este polisacárido. El glucógeno se encuentra en el músculo (14 g/Kg = 400 g totales) como reserva energética propia, ya que carece de la enzima glucosa-6 fosfatasa, y en el hígado (65 g/Kg = 100 g totales) como reserva para el mantenimiento de la glucemia. En situaciones de ayuno, el glucógeno hepático puede mantener la glucemia durante 12-14 h. El glucógeno es una forma más eficiente de almacenamiento energético que la propia glucosa, ya que ejerce una menor presión osmótica y al estar menos hidratado, ocupa menos espacio. En comparación con los lípidos, la glucosa puede ser metabolizada en condiciones anaerobias y es el combustible universal, ya que determinados tejidos como el cerebro sólo pueden utilizar glucosa* para obtener energía en forma de ATP.

() excepcionalmente, el cerebro también puede utilizar cuerpos cetónicos como fuente de ϵ .*

Ilb. Metabolismo del glucógeno hepático

La glucogenolisis ó degradación del glucógeno es un proceso muy rápido, ya que se lleva a cabo sobre los extremos no reductores. En este proceso actúan tres enzimas: la glucógeno fosforilasa, la oligo α 1,4 \rightarrow 1,4 glucan-transferasa o enzima desramificante y la amilo α 1 \rightarrow 6 glucosidasa. Los productos finales de la glucogenolisis son la Glc1P y Glc, que se transforman en Glc6P; en el hígado, la Glc-6-fosfatasa transforma la glucosa fosforilada en glucosa, que se libera a la sangre para mantener la glucemia.

La biosíntesis del glucógeno es realizada por la glucogeno sintasa a partir de UDP-Glc (forma los enlaces α 1 \rightarrow 4). Las ramificaciones son introducidas por la enzima ramificante ó glucosil 4,6 transferasa (rompe el enlace α 1 \rightarrow 4 entre dos Glc y transfiere 5 - 7 Glc sobre una Glc central, formando un enlace α 1 \rightarrow 6).

El metabolismo del glucógeno está regulado por sistemas hormonales como el de la adrenalina, insulina y glucagón. Estas hormonas desencadenan cascadas de señalización intracelular en las que intervienen proteín-kinasas y proteín-fosfatasa. Los procesos de fosforilación y desfosforilación regulan la actividad de diversas enzimas, tales como la glucógeno fosforilasa y la glucógeno sintasa.

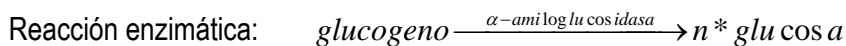
IIc. Glucogenosis

Se conocen con el nombre de glucogenosis aquellas alteraciones genéticas del metabolismo del glucógeno que afectan tanto a su síntesis como a su utilización. Existen varios tipos de glucogenosis:

- La glucogenosis tipo I ó enfermedad de von Gierke es un trastorno hereditario causado por el déficit en la actividad de Glc-6-fosfatasa. El hígado de estos pacientes puede almacenar glucosa en forma de glucogeno, pero no puede liberarla a la sangre en situaciones de hipoglucemia. La glucogenosis tipo I cursa con acumulaciones anómalas de glucógeno en hígado, hepatomegalia, hipoglucemia asociada a lactacidosis e hiperlipemia.
- La glucogenosis tipo II ó enfermedad de Pompe se caracteriza por el déficit de α -glucosidasa lisosomal. Como consecuencia, se producen acumulaciones anómalas de glucógeno en los tejidos.
- La glucogenosis tipo III ó enfermedad de Cori aparece por déficit en la enzima desramificante, con lo que se produce una acumulación de dextrinas límite que no pueden degradarse.
- La glucogenosis tipo IV o enfermedad de Andersen se caracteriza por la ausencia de la enzima ramificante, por lo que el glucógeno adopta una estructura lineal similar a la amilopectina. Debido a la pérdida de extremos no reductores, la degradación de este glucógeno es muy lenta y el polisacárido se acumula en los lisosomas.
- El déficit en glucógeno sintasa en el hígado impide la síntesis de este polisacárido, por lo que los pacientes presentan hipoglucemias e hipercetosis en ayunas, y hiperglucemia e hiperlactacidemias posprandiales.

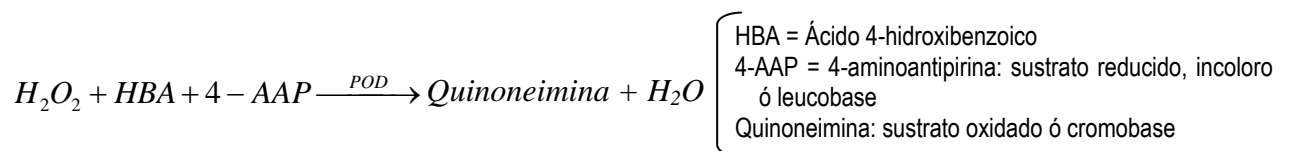
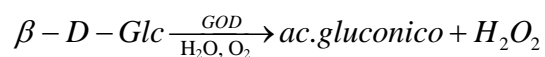
IId. La degradación del glucógeno por la α -amiloglucosidasa

La α -amiloglucosidasa es un enzima de origen fúngico (procede de hongo *Aspergillus niger*) que hidroliza el glucógeno, almidón y las dextrinas, liberando moléculas de glucosa. Por ello, se puede emplear en sustitución de las α -amilasas. La α -amiloglucosidasa es capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos $\alpha 1 \rightarrow 4$ y $\alpha 1 \rightarrow 6$, aunque la velocidad de reacción es mucho mayor para los enlaces $\alpha 1 \rightarrow 4$. Las condiciones óptimas son de pH ≈ 4.0 y T = 75 C, aunque también es activa a T = 37 C.



IId. Determinación colorimétrica de la glucosa

Se utiliza el método enzimático de la glucosa oxidasa – peroxidasa (GOD – POD), que es un método muy específico y sensible. La glucosa oxidasa (β -D-glucosa-oxígeno oxidoreductasa: GOD) transforma la β -D-glucosa en ácido D-glucónico, liberando agua oxigenada. Esta reacción se acopla con una reacción redox catalizada por una peroxidasa, de modo que se produce un sustrato coloreado. El sustrato coloreado presenta un máximo de absorbancia a $\lambda = 505$ nm. Aplicando la ley de Beer - Lambert, y teniendo en cuenta que la concentración de la cromobase es directamente proporcional a la concentración de glucosa libre, es posible determinar la concentración inicial de glucosa en la muestra. Para ello es necesario determinar la absorbancia de una solución de glucosa de concentración conocida (patrón de glucosa), o bien realizar una recta patrón con diferentes concentraciones de glucosa.



III. PROCEDIMIENTO PRÁCTICO

Antes de determinar el glucógeno hepático es necesario obtener el hígado, bien sea de un animal de experimentación como un hígado comercial. El hígado extraído se transfiere a un vaso de precipitados con 0.9% NaCl enfriado con hielo.

Para extraer el glucógeno hepático se pesan 0.5 g de hígado, se trocean con unas tijeras y se disgregan con un homogenizador tipo "Potter" con 9.6 mL 2% HClO₄ (Nota: hay que tener en cuenta el factor de homogenización, que en este caso es de 1/20). El homogenato se guarda a 4 C durante 24 h para conseguir la extracción total del glucógeno y posteriormente se centrifuga 10' 1000 rpm, se recoge el sobrenadante y se guarda a -20 C hasta su uso.

IIIa. Materiales y reactivos

- vaso de precipitados
- tubos de plástico
- micropipetas y puntas
- pipetas de vidrio y pipeteador manual
- tubos de espectrofotómetro
- solución enzimática (I): 1.7 mg/mL α -amiloglucosidasa en 100mM AcOH pH=4.75
- solución enzimática (II): 0.66M tampón fosfato en Tris 0.1M pH=7.3, 21mg GOD, 14.3mg POD, 4-AAP
- espectrofotómetro
- baño termostático
- 0.9% NaCl
- 0.2% HClO₄
- solución de glucosa estándar 0.2mM

IIIb. Procedimiento experimental

Hidrólisis del glucógeno

- Se mezclan 3 mL de mezcla enzimática (I) + 0.2 mL de extracto hepático y se incuban a 40 C.
- Como se va a realizar una estimación de la degradación del glucógeno en función del tiempo de incubación, se tomarán muestras a diversos intervalos: t = 0', 5', 10', 20', 30', 40'.

La medida para t = 0' determinará la glucosa libre, mientras que con el resto de las muestras se observará la hidrólisis del glucógeno. Con la medida t = 40' se obtendrá el valor de la glucosa

hepática total. Al restar estos dos valores se obtendrá la cantidad de glucosa hepática almacenada como glucógeno.

$$t = 0' \rightarrow \text{Glc libre}; \quad t = 40' \rightarrow \text{Glc total}$$

$$\text{Glc total} - \text{Glc libre} = \text{Glc almacenada como glucógeno}$$

- Se tomarán: 0.2 mL de mezcla y se añadirán 50 μL 0.2 % HClO_4 para detener la reacción. La determinación de la glucosa debe realizarse inmediatamente (añadiendo las cantidades según la tabla siguiente).

Determinación de glucosa

Se prepara una batería de 11 tubos; el primero de ellos es el blanco, mientras que los tubos 2 - 5 se utilizarán para realizar una recta patrón y los tubos 6 - 11 contendrán las muestras problema. Se pipetearán los volúmenes (siempre en mL) indicados a continuación ($V_f = 1 \text{ mL}$) y se añadirán 5 mL de la mezcla enzimática (II).

Tabla con los volúmenes que hay que pipetear en cada tubo

Tubo	V patrón Glc	V mezcla hepática	dH ₂ O	Reactivo II	Factor de dilución	Abs ($\lambda = 505 \text{ nm}$)
1 Blanco	-	-	1.00 mL	5 mL	-	
2 50 μM Glc	0.25 mL	-	0.75 mL	5 mL	-	
3 100 μM Glc	0.50 mL	-	0.50 mL	5 mL	-	
4 150 μM Glc	0.75 mL	-	0.25 mL	5 mL	-	
5 200 μM Glc	1.00 mL	-	-	5 mL	-	
6 Glc t = 0'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	
7 Glc t = 5'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	
8 Glc t = 10'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	
9 Glc t = 20'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	
10 Glc t = 30'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	
11 Glc t = 40'	-	0.2 mL	0.8 mL	5 mL	5 x 20 = 100	

Las mezclas se incuban 15' a 37 C o bien 30' a R.T. (temperatura ambiente) y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro.

Nota: teniendo en cuenta que los grupos están formados por varios alumnos, es conveniente repartirse el trabajo, de modo que mientras unos alumnos comienzan a preparar la degradación enzimática del glucógeno, otros elaboran la recta patrón de la glucosa.

IV. CÁLCULOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

1. Para obtener el valor de absorbancia específica es necesario restar el valor del blanco al resto de los tubos.
2. Construir la recta patrón de glucosa, representando la concentración de Glc (mM) en el eje de abscisas y la absorbancia en el eje de ordenadas. La ecuación que describe esta recta es del tipo $y = a \cdot x$ (es decir, la recta ha de cortar los ejes en el origen). Calcular el valor de la pendiente.
3. Calcular la concentración de glucosa en las muestras (tubos 6 - 11) utilizando los datos de la recta patrón. Expresar dichos resultados en mM. Es imprescindible tener en cuenta el factor de dilución de las muestras.
4. Representar gráficamente la degradación del glucógeno en función del tiempo de incubación.
5. Hallar la cantidad de glucosa hepática total, la glucosa libre y la almacenada como glucógeno, expresadas como mM y $\mu\text{moles Glc/g tejido}$. Para ello, hay que tener en cuenta que el factor de homogenización es 1/20 (1g de tejido en 20 mL de volumen). Determinar el porcentaje del total que representa cada una de ellas.
6. Interpretación de los resultados obtenidos. Relacionarlos en función de distintas situaciones fisiológicas y metabólicas.
7. La hidrólisis del glucógeno también puede llevarse a cabo con la α -amilasa humana, que sólo hidroliza los enlaces α 1 \rightarrow 4, o bien en medio ácido y en ebullición. Comparar la hidrólisis ácida con las enzimáticas y determinar la importancia fisiológica de las enzimas que degradan los polisacáridos.
8. Comentarios y conclusiones.