

Practica 5

OBTENCION DE GLUCOGENO HEPATICO DE

HIGADO DE POLLO

INTRODUCCION

El glucógeno es el principal polisacárido de reserva de las células animales y al igual que la amilopectina es un polisacárido ramificado de la D-glucosa con enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6 en los puntos de ramificación, pero es mucho más ramificado y compacto que ésta.

El glucógeno es abundante en el hígado, donde puede alcanzar hasta el 7% del peso húmedo, pero también se le halla en músculo esquelético.

En las células hepáticas el glucógeno se encuentra almacenado en gránulos grandes que contienen además las enzimas responsables de su síntesis y degradación.

El glucógeno puede hidrolizarse por la acción de alfa-amilasa que se encuentra en la saliva y jugo pancreático, las cuales rompen los enlaces alfa-1,4 en las ramas exteriores del glucógeno para dar glucosa, una pequeña cantidad de maltosa y un núcleo resistente llamado dextrina límite.

GLUCOGÉNESIS:

El glucógeno es la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en los animales y corresponde al almidón de las plantas. Se encuentra en proporción mayor en el hígado (hasta 6%) y en el músculo, donde rara vez excede de 1%. Al igual que el almidón, es un polímero ramificado de α -glucosa.

La función del glucógeno muscular es actuar como una fuente de fácil disponibilidad de unidades de hexosa para la glucólisis dentro del propio músculo. El glucógeno hepático sirve en gran parte para exportar unidades de hexosa para la conservación de la glucosa sanguínea, particular entre comidas. Después de 12 a 18 horas de ayuno, el hígado casi agota su reserva de glucógeno.

El glucógeno muscular sólo disminuye de manera significativa después de ejercicio vigoroso prolongado. Puede inducirse en almacenaje mayor de glucógeno muscular con dietas ricas en carbohidratos después de la depleción por el ejercicio. Las enfermedades por almacenamiento de glucógeno son un grupo de trastornos hereditarios que se caracterizan por movilización deficiente del glucógeno y depósito de formas anormales del mismo.

OBJETIVO

Realizar el aislamiento del glucógeno a partir de hígado de pollo y su purificación, así como su identificación como polisacárido ramificado mediante la reacción colorimétrica de lugol.

MATERIAL

- Vaso de precipitados 250 ml
- Balanza granataria.
- Mortero con pistilo.
- Tubos de centrifuga.

- Tubos de ensaye 13x100
- Centrifuga
- Pipetas graduadas de 1, 5, 10 ml.
- Arena de río lavada.
- Guantes.
- Lentes.
- Cubrebocas.
- Ácido tricloroacético al 5 y 10%.
- Etanol al 95% y absoluto.
- Cloruro de sodio al 5% y sólido.
- Ácido clorhídrico 1, 2, 4N y concentrado.

METODOS Y TECNICAS

- Matar el pollo durmiéndolo previamente con cloroformo y proceder a extraerle el hígado.
- Lavar el hígado al chorro de agua, pesarlo y cortarlo en pedazos pequeños, lavar nuevamente.
- Colocar los pedazos en un mortero previamente sumergido en hielo.
- Añadir TCA al 10% en proporción de 1 ml/gr. de tejido hepático y aproximadamente 0.5 gr. de arena lavada. Triturar hasta formar una pasta homogénea.
- Centrifugar el homogeneizado por 5 minutos a 2000 r.p.m.
- Decantar el líquido sobrenadante en un vaso de 1000 ml. Lavar el mortero con TCA al 5% y resuspender en este líquido el precipitado de la centrifugación.
- Dejar reposar por 5 min. centrifugar nuevamente. Decantar y reunir los líquidos sobrenadantes.
- Añadir el sobrenadante 2 volúmenes de Etanol al 95% por volumen de sobrenadante, agitar la mezcla y dejar en reposo hasta que el glucógeno flocule; si esto no sucediera, añadir un poco de NaCl y colocarlo en baño María a 37°C hasta la formación de flóculo y centrifugar 5 minutos a 200 r.p.m.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml. de agua Reprecipitar con dos volúmenes de Etanol al 95% centrifugar nuevamente.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 ml. de agua precipitar con dos volúmenes de Etanol absoluto y centrifugar por 3 min.
- Decantar y suspender con la menor cantidad posible de Etanol, y pasarlo a un vidrio de reloj. Dejar secar.
- Pesarlo para evaluar el rendimiento.
- Realizar la prueba de lugol para su identificación.

CUESTIONARIO

- ¿Cuáles son los órganos encargados de conservar concentraciones constantes de glucosa y glucógeno.
- Enumere las glándulas endocrinas que intervienen en el equilibrio entre el glucógeno hepático y la glucosa sanguínea.
- Escriba la formula estructural del glucógeno.
- ¿por qué es importante que el animal al que se le va a extraer el hígado esté vivo en ese momento?
- En ¿qué? Ocasiones las concentraciones de glucógeno hepático son elevadas sin que haya daño hepático.
- Tiene fundamento el que se consuman muchos carbohidratos en los casos de patología hepática.
- ¿Cuál es la fuente más importante de glucosa endógena?
- ¿En cuáles tejidos se realiza la vía de la pentosa fosfato y para que se utiliza ésta vía?
- Mencione las concentraciones de glucógeno en los diferentes sitios orgánicos donde se encuentra.
- Patológicamente ¿cómo Se comporta la concentración de glucógeno en un hígado cirrótico?