

PRACTICA N° 06

Reconocimiento de Proteínas

• INTRODUCCIÓN:

Son los nutrientes que desempeñan un mayor número de funciones en las células de todos los seres vivos. Forman parte de la estructura de los tejidos y por otro lado tienen función metabólica y reguladora. En la dieta se puede distinguir entre proteínas de origen vegetal o de origen animal. Las proteínas de origen vegetal se encuentran en frutos secos, legumbres, champiñones y cereales. Las proteínas de origen animal se encuentran en carnes, pescados, aves, huevos y productos lácteos. La principal causa del consumo energético en reposo (metabolismo basal) está motivada por la degradación y posterior formación de las nuevas proteínas.

Las proteínas de la dieta se usan, principalmente, para la formación de nuevos tejidos o para el reemplazo de las proteínas presentes en el organismo. No obstante, cuando las proteínas consumidas exceden las necesidades del organismo, sus aminoácidos constituyentes pueden ser utilizados para obtener de ellos energía. Sin embargo, la combustión de los aminoácidos tiene un grave inconveniente: la eliminación del amoníaco y las aminas que se liberan en estas reacciones químicas. Estos compuestos son altamente tóxicos para el organismo, por lo que se transforman en urea en el hígado y se eliminan por la orina al filtrarse en los riñones.

La cantidad de proteínas que se necesita en la dieta diaria depende de muchos factores, de la edad (durante el crecimiento las necesidades se duplican o triplican), el estado de nuestro intestino y riñón, de los que dependerá la capacidad de absorción y también del valor biológico de las proteínas que consumamos. Las proteínas consumidas en exceso, que el organismo no necesita para el crecimiento o para el recambio proteico, se queman en las células para producir energía. A pesar de que tienen un rendimiento energético igual al de los hidratos de carbono, su combustión es más compleja y dejan residuos metabólicos, como el amoníaco, que son tóxicos para el organismo.

Las proteínas de origen animal son moléculas mucho más complejas y grandes, su valor biológico es mucho mayor que las de origen vegetal aunque son más difíciles de digerir. La carne contiene todos los aminoácidos básicos en proporciones similares a las necesitadas por el cuerpo humano, también posee muchas vitaminas y minerales. No obstante la carne también tiene grasas saturadas que aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Para obtener una dieta equilibrada se necesita diariamente de 100 a 150 gr. de carne. Al tomar proteínas animales a partir de carnes, aves o pescados ingerimos también todos los desechos del metabolismo celular presentes en esos tejidos (amoníaco, ácido úrico, etc.), que el animal no pudo eliminar antes de ser sacrificado. Estos compuestos actúan como tóxicos en nuestro organismo. El metabolismo de los vegetales es distinto y no están presentes estos derivados nitrogenados. Los tóxicos de la carne se pueden evitar consumiendo las proteínas de origen animal a partir de huevos, leche y sus derivados. En cualquier caso, siempre serán preferibles los huevos y los lácteos a las carnes, pescados y aves. En este sentido, también se prefiere los pescados a las aves, y las aves a las carnes rojas o de cerdo. Si combinamos las proteínas vegetales podemos obtener una dieta equilibrada.

En general, se recomienda que una tercera parte de las proteínas que comamos sean de origen animal, pero es perfectamente posible estar bien nutrido sólo con proteínas vegetales. Eso sí, teniendo la precaución de combinar estos alimentos en función de sus aminoácidos limitantes. El problema de las dietas vegetarianas en occidente suele estar más bien en el déficit de algunas vitaminas, como la B12, o de minerales, como el hierro.

• **OBJETIVOS:**

- Importancia de las proteínas en el hombre.
- Conocer los diferentes métodos para el reconocimiento de las proteínas, en las formas en que se presentan.
- Reconocer la importancia que cumplen las proteínas en nuestro organismo, así como sus diferentes funciones.

• **MATERIALES Y EQUIPOS:**

•

• **MATERIALES:**

- 2 huevos.
- Aceite comestible.
- Leche.
- 2 papas.
- Plasma sanguíneo.
- Carne molida.
- Ajinomoto.
- EQUIPOS e INSUMOS:

- ◆ Pipeta
- ◆ 9 Tubos de Ensayo.
- ◆ Crisol.
- ◆ Mechero
- ◆ Gradilla.
- ◆ Hidróxido de sodio al 40%.
- ◆ Ácido clorhídrico al 75%.
- ◆ Sulfato de Cobre al 10%.
- ◆ Alcohol al 75%.
- ◆ Arginina al 0.1%.
- ◆ Triptófano al 0.1%.
- ◆ Tirosina al 0.1%.
- ◆ Solución de ninhidrina .
- ◆ Agua destilada.

◆ **DESARROLLO DE LA PRÁCTICA**

◆ EXPERIENCIA N° 1: Reacción de Precipitación.

◆ Procedimiento:

◆ Enumerar los tubos de ensayo y coloque 3 ml. de solución de albúmina en cada uno de ellos.

◆ Adicionar en cada tubo lo siguiente:

◇ Tubo n° 1 : 1 ml de HCl al 75%.

◇ Tubo n° 2 : 1 ml de NaOH al 40%.

◇ Tubo n° 3 : 1 ml de CuSO₄ al 10%.

◇ Tubo n° 4 : 1 ml de alcohol al 75%.

◇ Tubo n° 5 : calentar ligeramente al mechero.

◇ Observar el cambio de estado del contenido de cada tubo y explicar.

◇ Resultados y Fundamentación:

Se pudo observar que todas las muestras se coagularon, debido al gran tamaño de sus moléculas forman con el agua soluciones coloidales que pueden precipitar

formándose coágulos al ser calentadas a temperaturas superiores a 70°C o al ser tratadas con soluciones salinas, ácidos, alcohol, etc. La coagulación de las proteínas es un proceso irreversible y se debe a su desnaturalización por los agentes indicados que al actuar sobre la proteína la desordenan por destrucción de sus estructuras secundaria y terciaria.

◇ Diagramación:

◇ EXPERIENCIA N° 2: Reacción de Biuret.

2.1 Procedimiento:

◇ Enumerar los tubos de ensayo del 1 – 4 .

◇ En cada tubo colocar lo siguiente:

- Tubo n° 1 : 2 ml de albúmina.
- Tubo n° 2 : 2 ml de leche.
- Tubo n° 3 : 2 ml de jugo de papas.
- Tubo n° 4 : 2 ml de plasma sanguíneo.

◇ Agregar a cada tubo 1 ml. de NaOH al 40%.

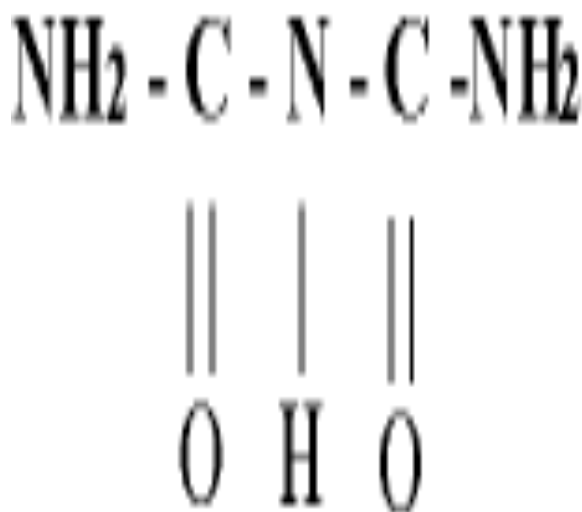
◇ Agitar los tubos y agregar 5 gotas de CuSO₄ al 1% en cada uno de ellos.

◇ Observar el cambio de color de cada uno de ellos y explicar.

2.2 Resultados:

La producen los péptidos y las proteínas, pero no los aminoácidos, ya que se debe a la presencia del enlace peptídico (– CO– NH –) que se destruye al liberarse los aminoácidos.

Cuando una proteína se pone en contacto con un álcali concentrado, se forma una sustancia compleja denominada **biuret**, de fórmula:



Que en contacto con una solución de sulfato cúprico diluida, da una coloración violeta característica. Entre las reacciones coloreadas específicas de las proteínas, que sirven por tanto para su identificación, destaca la reacción del Biuret.

2.3 Diagramación:

◇ EXPERIENCIA N° 3: Reacción Xantoproteica.

3.1 Procedimiento:

◇ Enumerar los tubos del 1 – 3.

◇ Colocar en cada tubo lo siguiente:

- Tubo n° 1 : solución de albúmina.
- Tubo n° 2 : leche.
- Tubo n° 3 : carne molida.
- Agregar a cada tubo 1 ml. de HNO₃ concentrado.
- Caliente cada uno de los tubos.
- Agregar 1 ml. de NaOH al 40% a cada tubo.
- Observar los cambios de color y explicar.

3.2 Resultados y Fundamentación:

Es debida a la formación de un compuesto aromático nitrado de color amarillo, cuando las proteínas son tratadas con ácido nítrico concentrado. La prueba da resultado positivo en aquellas proteínas con aminoácidos portadores de grupos bencénicos, especialmente en presencia de tirosina. Si una vez realizada la prueba se neutraliza con un álcali vira a un color anaranjado oscuro.

3.3 Diagramación:

- EXPERIENCIA N° 04: Reacción de Ninhidrina.
- Procedimiento
- Enumerar del 1 – 5 a cada uno de los tubos.
- En cada tubo de ensayo colocar lo siguiente:
 - Tubo n° 1 : 2 ml. de arginina al 0.1%.
 - Tubo n° 2 : 2 ml. de triptófano al 0.1 %
 - Tubo n° 3 : 2 ml. de tirosina al 0.1%.
 - Tubo n° 4 : 2 ml. de solución de ajinomoto.
 - Tubo n° 5 : 2 ml. de solución de albúmina.
- Agregar 0.5 ml de ninhidrina al 0.1% a cada tubo.
- Llevar los tubos al calor del mechero durante 1 ó 2 minutos.
- Observar el cambio de color y explicar.
- Resultados y Fundamentación:

Se observó que todas las muestras cambiaron a un color violeta con excepción de la muestra que contenía albúmina, ya que esta reacción se utiliza para determinar a aminoácidos.

La ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) reacciona con los aminoácidos en medio ácido (pH entre 3 y 4) y en caliente produciendo amoniaco, dióxido de carbono y un complejo de color púrpura azulado. Todos los aminoácidos primarios forman el mismo complejo tras su reacción con ninhidrina, haciendo este agente inapropiado para la precolumna de derivatización. A altas temperaturas ($\pm 100^{\circ}\text{C}$), todos los aminoácidos primarios reaccionan con dos moléculas de ninhidrina para formar un cromóforo (púrpura de Ruthermann) con máxima absorción a 570 nm.

La reacción coloreada de la ninhidrina se utiliza en trabajos analíticos, así como en la visualización de las bandas de los aminoácidos después de su separación por electroforesis o por cromatografía. El reactivo que se utiliza en estas circunstancias se prepara generalmente disuelto en etanol; cuando se añade 2,4-6colidina, las diferencias de color entre cada mancha ayudan a la identificación de los distintos aminoácidos.

· Diagramación:

· **CONCLUSIONES:**

- Las proteínas constituyen una de las moléculas más importantes en el organismo, ya que cumple muchas funciones.
- Las reacciones se utiliza en trabajos analíticos, así como en la visualización de las bandas de los aminoácidos después de su separación por electroforesis o por cromatografía.
- Las proteínas están constituidos por aminoácidos, por los cuales los métodos se basan en el reconocimiento de los aminoácidos.

· **BIBLIOGRAFIA:**

- A. DE HARO VERA: Atlas de Biología. Ediciones Jover.
- ALBERT L. LEHNINGER: Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona 1989
- INTERNET
 - www.arrakis.es/~rfluengo/lipidos.html

· **METABOLISMO DE LAS PROTEINAS EN EL SISTEMA DIGESTIVO:**

En el metabolismo de las proteínas se llevan a cabo mediante diversas reacciones en donde intervienen enzimas, las cuales van degradando hasta llegar a aminoácidos; los cuales se siguen degradando, en las siguientes líneas se describe los procesos de degradación de los aminoácidos:

Metabolismo de las proteínas:

La catabolia de las proteínas, al igual que la de las grasas consiste en 2 etapas.

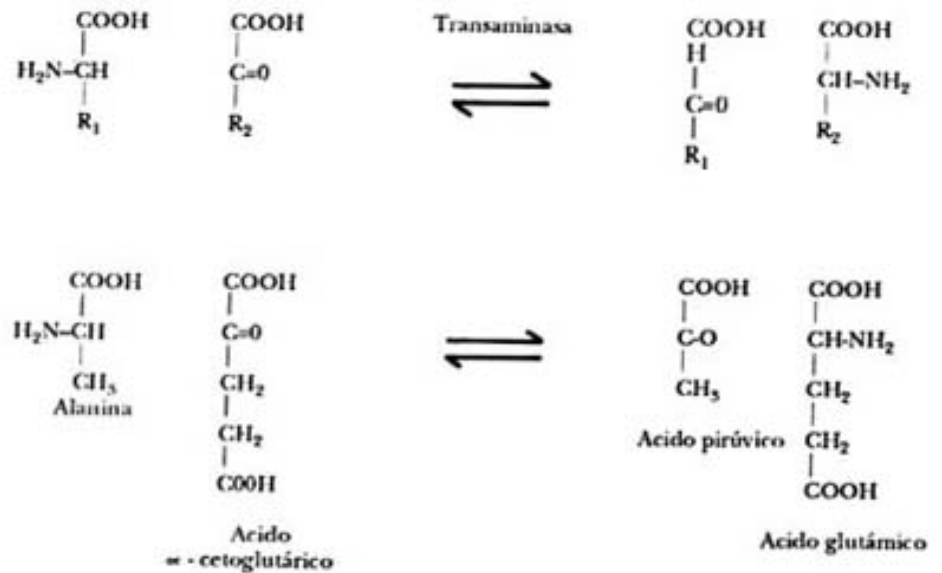
La primera ocurre principalmente en las células hepáticas, y la segunda es el ciclo del ácido cítrico, a continuación detallaremos estos eventos:

· **Desaminación de los aminoácidos:**

Es la reacción por medio de la cual un radical amino (NH_2). Se separan una molécula de aminoácidos, y así se forman una molécula de amoníaco y una de cetoácido. La mayor parte del amoníaco se convierte en urea y se excreta por orina.

El cetoácido puede experimentar desaminación por la vía del ácido cítrico o convertirse en glucosa (gluconeogénesis) o a grasa (lipogénesis). Los mecanismos de conversión de unos aminoácidos y su degradación. Las proteínas se degradan para dar aminoácidos, y viceversa, pero las transformaciones más interesantes son las de los aminoácidos. En las células hay cetoácidos y aminoácidos, y mientras los primeros tienen un grupo ceto ($-\text{C}=\text{O}$) en el carbono número 2, los segundos tienen un amino ($-\text{NH}_2$). Como se muestra en la figura II.8, un cetoácido (piruvato) se puede convertir en un aminoácido (alanina), tomando el grupo amínico de un aminoácido (glutámico), que en el proceso se convierte a su vez en cetoácido

(cetoglutarico). Este proceso, que recibe el nombre de transaminación, ocurre en muchos otros pares de cetoácidos y aminoácidos y permite el intercambio de unos aminoácidos en otros.

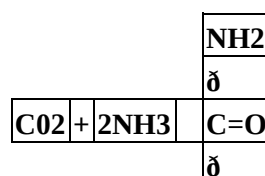


- **La transaminación. Un cetoácido recibe el grupo amínico de un aminoácido, y éste a su vez se convierte en cetoácido.**

Por otra parte, los aminoácidos pueden perder su grupo amínico por otros procesos, reacción en la cual liberan amoníaco (NH₃) y dan lugar a un cetoácido. Este proceso permite obtener cetoácidos diferentes, como el piruvato, el oxalocetato o el cetoglutarato. El primero es el resultado final de la glucólisis y los otros dos son pasos intermedios del ciclo de Krebs. De aquí resulta que, cuando los aminoácidos pierden su grupo amínico, el residuo se puede incorporar a diferentes caminos metabólicos para su degradación (figura II.9).

La desaminación. Los aminoácidos pueden también perder su grupo amínico y convertirse en cetoácidos.

Otro punto importante en el metabolismo de las proteínas es el destino del amonio que pierden al desaminarse. Dependiendo de los organismos, éste se puede eliminar como tal o como diferentes compuestos. En los humanos, una gran parte del amoníaco, que les resulta tóxico, se elimina después de unirlo con CO₂, dando lugar a una molécula inerte, la urea:



Finalmente, también hay enzimas capaces de sintetizar aminoácidos a partir de cetoácidos y amoníaco, como la deshidrogenasa glutámica, que puede aminorar al cetoglutarato, o sea, ponerle un grupo amínico en lugar de cetónico, como se muestra en la figura:

• Conversión del cetoglutarato en glutamato por la deshidrogenasa glutámica.

El metabolismo de las proteínas es debido al ataque de las mismas por las proteasas, desdoblándolas nuevamente en aminoácidos, que por oxidación dan como productos finales de deshecho CO₂, H₂O y amoníaco (NH₃), este no es tolerado por la sangre, por lo que se transforma en carbonato amónico, que en el hígado es transformado en urea, que se expulsa por la orina. Cuando el riñón no filtra toda la orina formada, esta se acumula en sangre, dando lugar al temido estado urémico. Sobre el metabolismo de los nucleoproteídos, formados por la unión de una proteína y un ácido nucleico, diremos, en síntesis, que mediante acciones metabólicas complejas llegan a convertirse en ácido úrico, que se expulsa por la orina, provocando, cuando se acumula en sangre, la uricemia y el artrismo.

Cuando el organismo recibe demasiadas proteínas o aminoácidos en forma libre, no es capaz de asimilarlas; en este caso además se inhibe el almacenamiento de glucógeno, que es el combustible de la actividad muscular. Por su parte, los carbohidratos se convierten en glucógeno rápido y fácilmente, por lo que una dieta con alto porcentaje de aminoácidos (en forma de proteínas) y bajo contenido de H.G. No contribuirá con el almacenamiento de glucógeno. Esto quiere decir que las posibilidades de aumento de la resistencia y el volumen con el consecuente incremento de la potencia disminuyen.

¿QUÉ SON LAS PROTEINAS TAU?

La tau es una proteína que está asociada a los microtúbulos, cuya función, en condiciones normales, es estabilizar dichos microtúbulos (Caceres & Kosik, 1990; Drubin & Kirschner, 1986). Esta proteína se expresa de un único gen (localizado en células humanas en el cromosoma 17) (Andreadis *et al.*, 1992) que, tras transcribirse su RNA, puede procesarse de diferentes maneras

y originar seis isoformas diferentes en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) (Goedert *et al.*, 1989), existiendo otra isoforma, de mayor tamaño, en las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) (Couchie *et al.*, 1992).

Las seis isoformas de tau del SNC difieren entre sí por la presencia o ausencia de unas regiones situadas cerca del extremo aminoterminal y de una región (similar a otras tres regiones existentes en todas las isoformas), localizada cerca del extremo carboxilo terminal, y que está implicada (como las regiones similares a ella) en la interacción con microtúbulos (Goedert *et al.*, 1989).

Si bien la función de tau es estabilizar los microtúbulos evitando su despolimerización, cabe señalar que se han aislado ratones mutantes que carecen de dicha proteína y se ha observado que son perfectamente viables y similares a los ratones no mutados (Harada *et al.*, 1994). Este hecho indica que la función que desempeña la proteína tau pueden realizarla en el ratón mutante otras proteínas con una función similar. La disfunción de tau en la enfermedad de Alzheimer origina una menor interacción de la proteína con microtúbulos y una agregación aberrante de la proteína. La hiperfosforilación de tau parece estar más relacionada con la menor interacción de la proteína con microtúbulos (Mandelkow & Mandelkow, 1998), discutiéndose si tiene o no una función en la agregación de tau, aunque recientemente se ha observado que se facilita la agregación (Perez *et al.*, 2000).

Hay fundamentalmente dos tipos de quinasas que modifican a tau: las dirigidas y las no dirigidas por prolina (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995).

Dentro del primer grupo, dos quinasas, GSK3 y cdk5 (también denominadas tau-quinasa I y tau-quinasa II) (Ishiguro *et al.*, 1993), tienen un papel relevante en la fosforilación de tau. La fosforilación de tau por GSK3 ha sido analizada por varios grupos diferentes (Lovestone *et al.*, 1994; Muñoz-Montañó *et al.*, 1997); fundamentalmente, GSK3 modifica residuos localizados en las regiones adyacentes a la zona de tau implicada en la unión a microtúbulos.

En 1963, se descubrió que los ovillos de neurofibrillas eran estructuras filamentosas acumuladas en el citoplasma de las neuronas degeneradas, filamentos que fueron denominados "parejas de filamentos helicoidales" o PHFs. Estos filamentos están formados por microtúbulos citoesqueléticos asociados a las llamadas *proteínas tau*, que pertenecen a la familia de la "*Proteínas asociadas a los microtúbulos*" o MAP. En el cerebro humano, las proteínas tau se presentan como seis isoformas de 352 a 441 residuos de aminoácidos que provienen todas ellas de la expresión de un único gen tau localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Se conocen perfectamente todas las propiedades físico-químicas de estas proteínas y como interaccionan con los microtúbulos neuronales estabilizándolos. Las *proteínas tau* se caracterizan por fosforilizarse fácilmente, permitiendo esta reacción la movilidad de las mismas dentro de los axones de las neuronas en dirección centrífuga. En la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías se produce un fenómeno de hiperfosforilización y/o de fosforilación anormal que en definitiva, es el responsable de la formación de los complejos proteínas tau-PHF. En la actualidad, los esfuerzos de los investigadores se encaminan a la identificación de las proteína-quinasas implicadas en esta fosforilación anormal. El conocimiento de una estructura permitiría eventualmente, el diseño de un inhibidor enzimático que frenase o eliminase las proteínas tau anormales y por lo tanto la formación de ovillos de neurofibrillas.

Por otra parte, GSK3 interacciona con otras proteínas, como presenilina 1 (PS1), que tienen un papel importante en la iniciación de la patología que se observa en la enfermedad (Anderton, 1999). Además, la caracterización de un ratón GSK3 transgénico ha indicado que la sobreexpresión de GSK3 da lugar a alguna de las características patológicas que se encuentran en la EA

(Lucas *et al.*, 2001). La proteína cdk5 también fosforila tau, y esta fosforilación puede facilitar la posterior modificación de tau por GSK3. La fosforilación por cdk5 puede estar regulada por una proteína, p35, que en la enfermedad de Alzheimer puede sufrir un corte proteolítico que la desregula y la hace permanecer activa, pudiendo fosforilar aberrantemente a tau (Patrick *et al.*, 1999). Además de la cdk5, otra proteína relacionada, cdk1 (conocida inicialmente como cdc2), que se encuentra fundamentalmente en células en proliferación, puede activarse anormalmente (Lu *et al.*, 1999) en la enfermedad de Alzheimer, fosforilando la proteína tau en el residuo 231.

Como consecuencia de dicha fosforilación, puede producirse un cambio conformacional en tau que afecte su interacción con los microtúbulos. La interacción de tau (fosforilado con cdc2) con una proteína con actividad chaperona, Pin-1, revierte dicho cambio conformacional (Johnson, 1992) facilitando de nuevo la interacción de tau con microtúbulos.

Para conocer si la proteína tau es el verdadero armazón de los PHF que forman los ovillos neurofibrilares, hace tiempo se estudió si tau era capaz de polimerizar *in vitro* para producir filamentos. El resultado obtenido fue positivo (Montejo de Garcini *et al.*, 1988) y posteriores experimentos demostraron que tau sin ningún tipo de modificaciones era capaz también de ensamblarse en filamentos similares a los PHF (Crowther *et al.*, 1994; Wille *et al.*, 1992). Sin embargo, la concentración requerida de tau para ensamblarse *in vitro* era muy elevada, por lo que se analizó si la presencia de otras moléculas favorecían su polimerización. Entre estas posibles moléculas se probaron aquellas que se encuentran asociadas a los ovillos neurofibrilares como, por ejemplo, los glucosaminoglicanos sulfatados (GAGs), como heparina (Perry *et al.*, 1991). Los estudios de polimerización *in vitro* de tau con GAGs indicaron que estas moléculas facilitaban su ensamblaje (Arrasate *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1996), posiblemente debido al carácter aniónico de estas moléculas (Kampers *et al.*, 1996; Wilson & Binder, 1997). Estas moléculas GAG podrían ensamblar los polímeros de tau una vez muerta y lisada una neurona, permitiendo que tau (una proteína citoplásmica) interacciona con GAG (moléculas de la matriz extracelular). Adicionalmente se ha sugerido que otras moléculas como los compuestos resultantes de la oxidación lipídica podrían también facilitar el ensamblaje de tau.

Así pues en la enfermedad de Alzheimer parece jugar un importante papel por una parte el péptido amiloide y aquellas proteínas que le generan y facilitan su agregación, y por otra parte, la proteína tau es un componente fundamental, teniendo gran importancia aquellas proteínas que la modifican y aquellas moléculas que permiten su agregación.

· **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:**

- ALBERT L. LEHNINGER: Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona 1989
- DE HARO VERA: Atlas de Biología. Ediciones Jover.
- DRUBIN, D. G. & KIRSCHNER, M. W. (1986). Tau protein function in living cells. *J. Cell. Biol.* 103,2739–2746.
- INTERNET:
 - ♦ www.joseacortes.com/practicas/protidos.htm

Pepsina Proteasas

Proteínas Peptonas

Polipéptidos

Tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidasa, proelastasa

Polipéptidos Peptidasas

+ Aminoácidos

Aminoácidos

