

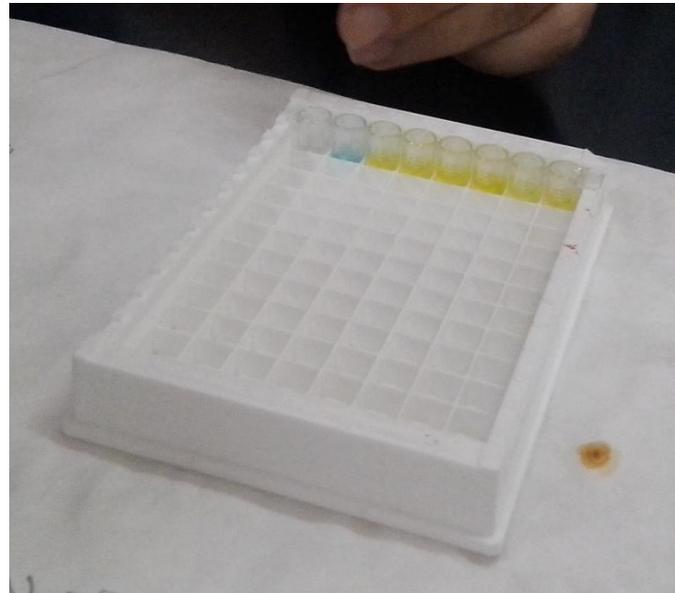
Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

Práctica 2.1. Determinación de cortisol, glucosa y triglicéridos en plasma

Biomarcadores del estrés

- Cortisol
- Hematocrito o VGA (volumen celular o globular acumulado)
- Glucosa plasmática
- Liberación al torrente sanguíneo de la enzima CK, creatinfosfoquinasa (enzima muscular que cataliza la reacción para obtener ATP)
- Lactato: por el ejercicio físico
- Urea: producida por el catabolismo proteico
- Hemograma: la relación neutrófilos/linfocitos se altera
- Hemograma: el estrés eleva la producción de glóbulos blancos en la sangre y esto puede causar infartos, por lo general, el cuerpo produce tal exceso de células “para cicatrizar heridas y combatir infecciones”. Sin embargo, ante un cuadro de estrés crónico, “no hay lesiones que sanar ni infección que combatir”

Cuantificación de cortisol



- El CORTISOL es un glucocorticoide producido y secretado en la corteza adrenal. La producción depende de la hormona ACTH, con un pico por la mañana que decrece a lo largo del día.
- Se le conoce como la hormona del estrés porque está involucrada en respuestas al estrés, y afecta a la presión sanguínea, niveles de azúcar en sangre y otras acciones de adaptación al estrés.
- Inmunológicamente funciona como un importante antiinflamatorio y juega un papel importante en la hipersensibilidad, inmunosupresión y resistencia a enfermedades.
- En el aspecto metabólico promueve la gluconeogénesis, lipólisis y degradación de proteínas.
- Hay enfermedades que cursan con niveles anormales de cortisol, como la enfermedad de Addison (caracterizada porque la corteza adrenal está dañada y produce poco cortisol) y el síndrome de Cushing (caracterizado por una alta producción de cortisol debida a diferentes causas como tumor en la hipófisis o tumor en la corteza adrenal).
- En el hombre los valores del cortisol en sangre están comprendidos entre 9-300 ng/mL.
- La mayor parte del cortisol sanguíneo está unido a proteínas (albúminas y proteínas que unen corticosteroides), permaneciendo libre sólo un 4%.

Método de cuantificación

Inmunoensayo Enzimático (EIA) de tipo competitivo. Luego se comparan las *muestras* con una *curva estándar de cortisol* :

1-El ensayo se realiza en placas multiwell de 96 pocillos cuyo fondo está tapizado con **anticuerpos de cabra** fijos, que a su vez se unirán a anticuerpos de ratón (ver explicación a continuación).

2- Se pipetea la **curva estándar** o **las muestras** (ambas tienen cortisol) en los pocillos. Luego se añade **conjugado cortisol-peroxidasa** (es cortisol unido a la **enzima peroxidasa**). A continuación se agrega **anticuerpo de ratón para cortisol**. Se deja incubar y empiezan a **competir** el **cortisol de las muestras o estándar** con el **cortisol de la cortisol-peroxidasa** por el anticuerpo de ratón para cortisol.

Luego el anticuerpo de ratón se une al anticuerpo de cabra, quedando por tanto el complejo **cortisol-peroxidasa + anticuerpo de ratón + anticuerpo de cabra** unido a la placa

3-Luego se lava la placa para retirar los reactivos no unidos.

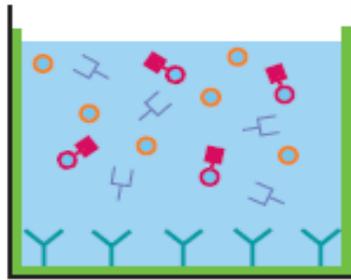
4-Se añade el **sustrato de la peroxidasa** (tetrametilbencidina TMB y H_2O_2) sobre el que actuará ésta para formar un compuesto azul. Después de una corta incubación se paraliza la reacción con la **solución de parada** (ácido clorhídrico) produciéndose un compuesto amarillo que absorbe a una longitud de onda de **450 nm**.

Se lee dicha absorbancia en un lector de multiplacas (espectrofotómetro).

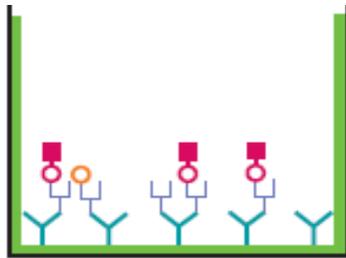
Finalmente se calcula la concentración de la muestra relacionándola con la curva.



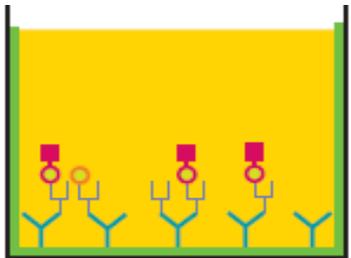
1- Placas con anticuerpos de cabra anti-Ig G de ratón adheridos



2-Incubación con estándar o muestra, conjugado cortisol-peroxidasa y anticuerpo de ratón



3-Lavado para retirar los reactivos no unidos



4-Desarrollo del color al poner el sustrato de la peroxidasa

 = Anticuerpo de cabra anti-Ig G de ratón

 = Conjugado cortisol-peroxidasa

 = Anticuerpo de ratón para cortisol

 = Cortisol libre

Reactivos, Kit Arbor



Placa con anticuerpos de cabra adheridos

Reactivo de disociación

Stock de cortisol

Conjugado cortisol-peroxidasa

Anticuerpo para cortisol

Tampón de ensayo

Tampón de lavado

Solución de parada (HCl)

Sustrato de peroxidasa (TMB)

Protocolo

1 A- Se prepara la curva estándar a partir del **stock de cortisol** que está a **32000 µg/mL** haciendo sucesivas diluciones con **tampón de ensayo**.

Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
50 µL stock	250 µL estándar1	250 µL estándar2	250 µL estándar3	250 µL estándar4	250 µL estándar5
450 µL tampón ensayo	250 µL tampón ensayo				
3200 pg/mL	1600 pg/mL	800 pg/mL	400 pg/mL	200 pg/mL	100 pg/mL



1 B- Paralelamente se preparan las muestras. Se puede medir en plasma, suero, saliva, orina, extracto de heces secas y medio de cultivo tisular.

En **plasma y suero** se tiene que diluir en un volumen igual de **reactivo de disociación** (que permite separar el cortisol de las proteínas a las que esté unido): **5 µL de plasma + 5 µL de reactivo de disociación** (muestra diluida 2 X). Luego se diluye 25 veces en **tampón de ensayo**. (Muestra finalmente diluida 50 X).

Muestras de plasma: se cogen 5 μ L



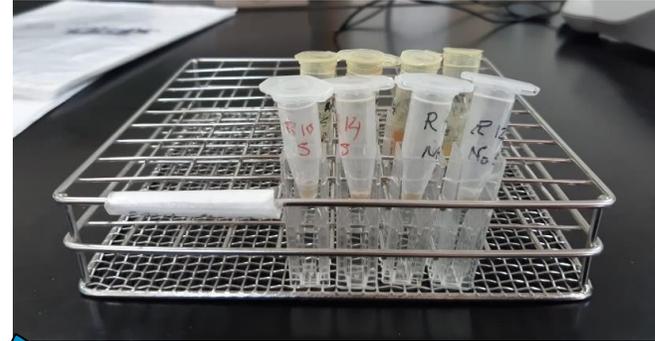
Adición de reactivo de disociación de la proteína: 5 μ L



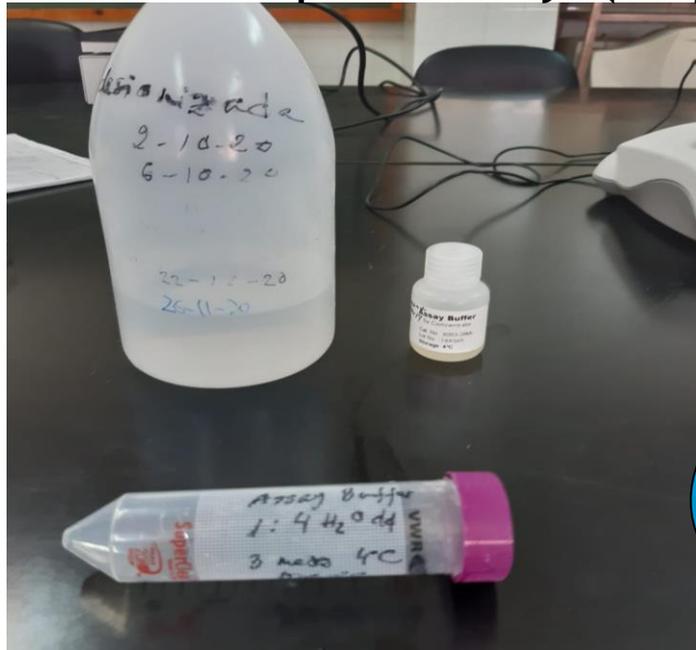
Homogeneización



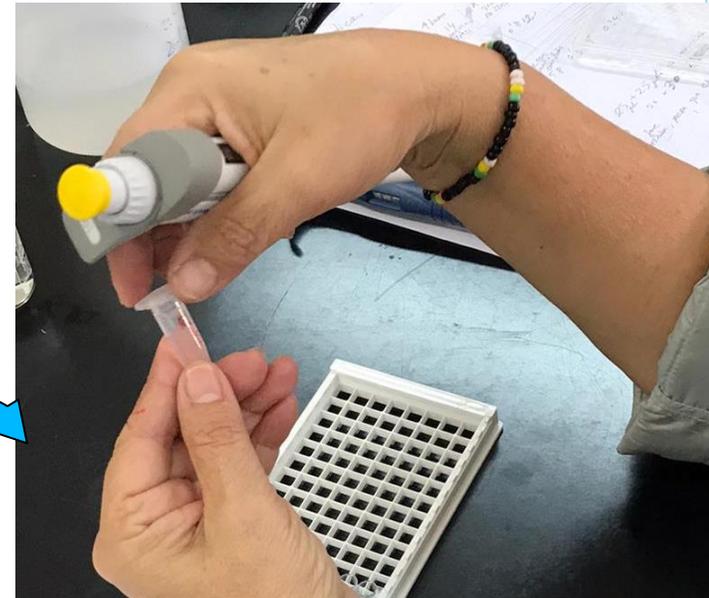
Muestras de plasma + reactivo de disociación de la proteína (2x)



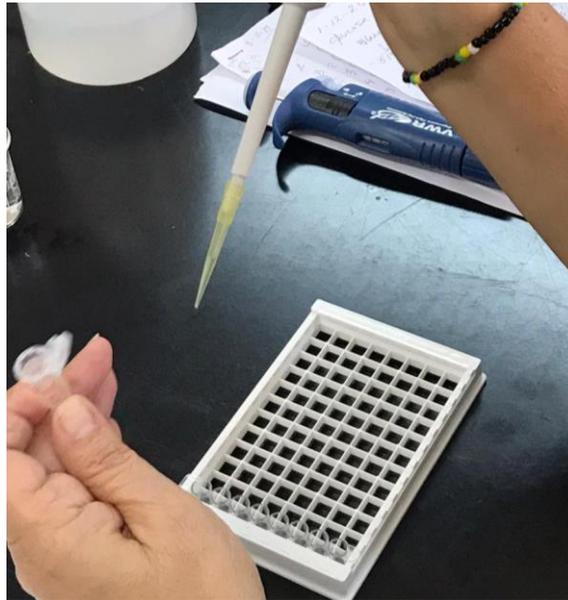
Adición de tampón de ensayo (25x)



Muestras diluidas final (50x)



- 2- A- Se pipetea **50 μ L** de **la curva** o **muestra diluida** en los pocillos correspondientes, ó
- B- Se pipetea **50 μ L** de **tampón de ensayo** en los pocillos **B₀** (son los pocillos de máxima unión cortisol-peroxidasa ó 0 pg de cortisol/mL) ó
 - C- Se pipetea **50 + 25 μ L** de **tampón de ensayo** en los pocillos **NSB** (Non Specific Binding).



3- Se pipetea **25 μ L** de **conjugado cortisol-peroxidasa** en todos los pocillos.

4- Se pipetea **25 μ L** de **anticuerpo para cortisol** en todos los pocillos **excepto en los pocillos NSB** (son los pocillos que presentan absorbancia porque se haya unido el conjugado cortisol-peroxidasa directamente al anticuerpo de cabra, sin que intervenga el anticuerpo para cortisol de ratón. No es frecuente y hay que restarla del resto de absorbancias).



5- Se agita la placa durante **1 hora** a **temperatura ambiente**.



6- Se vacía la placa y se lava **4** veces con **300 μ L** de **tampón lavador** y se deja secar boca abajo sobre papel absorbente.

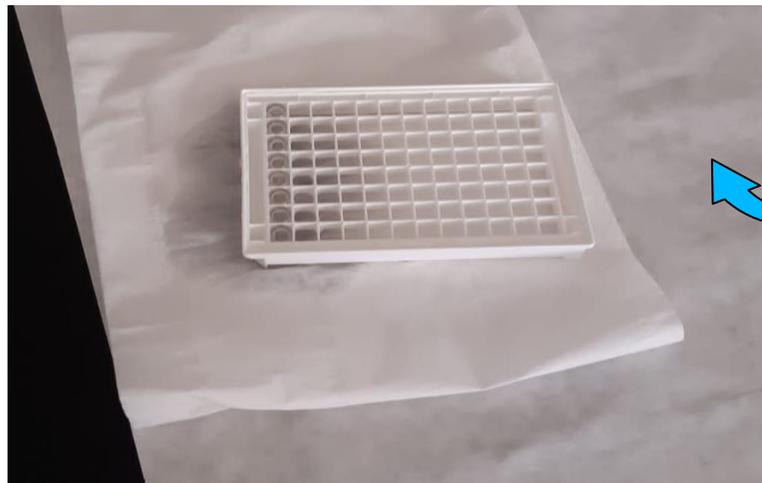
Vaciar



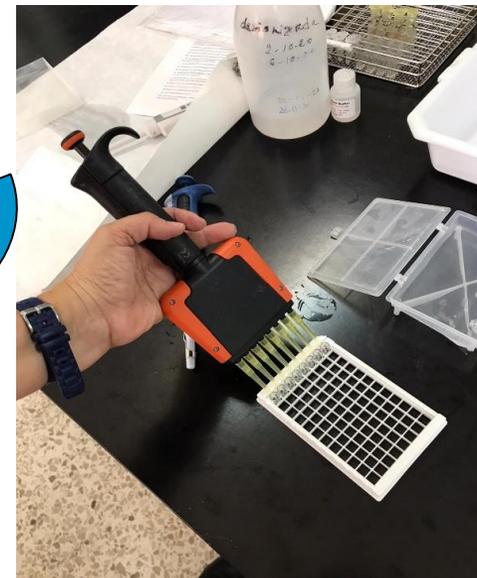
Tampón de lavado



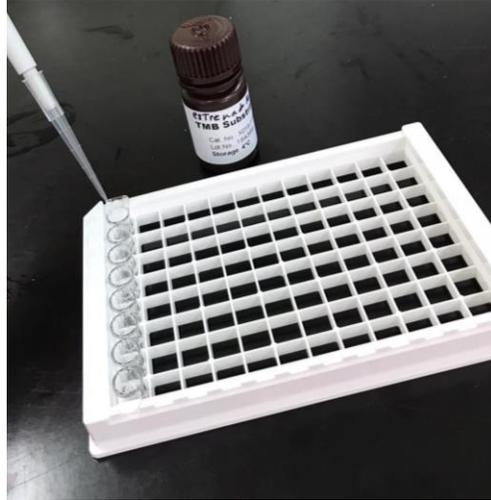
Secar



Lavar

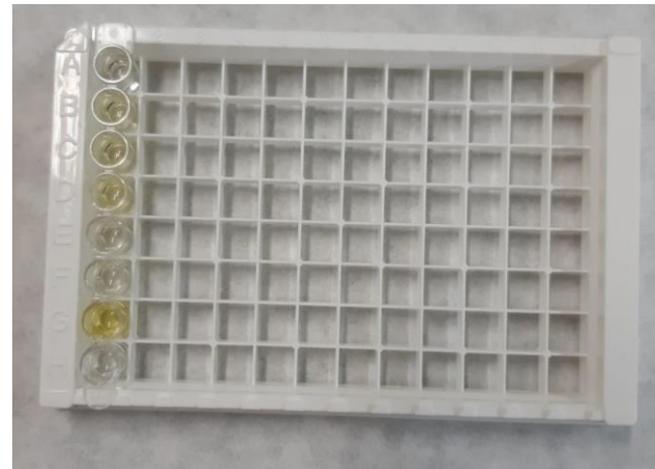
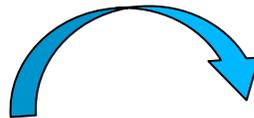
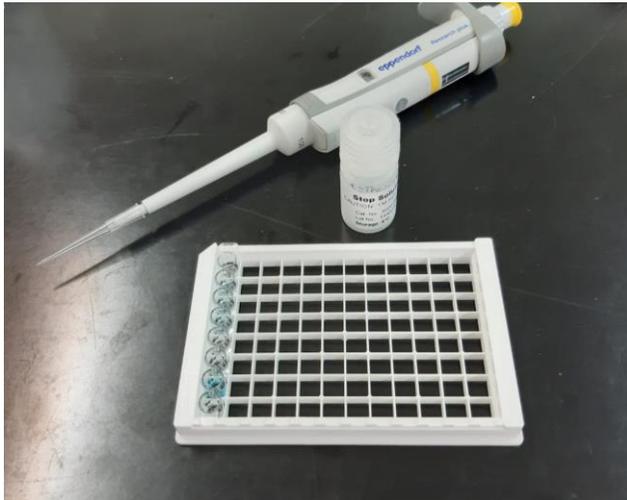


7- Se añade **100 μL** del **sustrato de la peroxidasa** a cada pocillo.

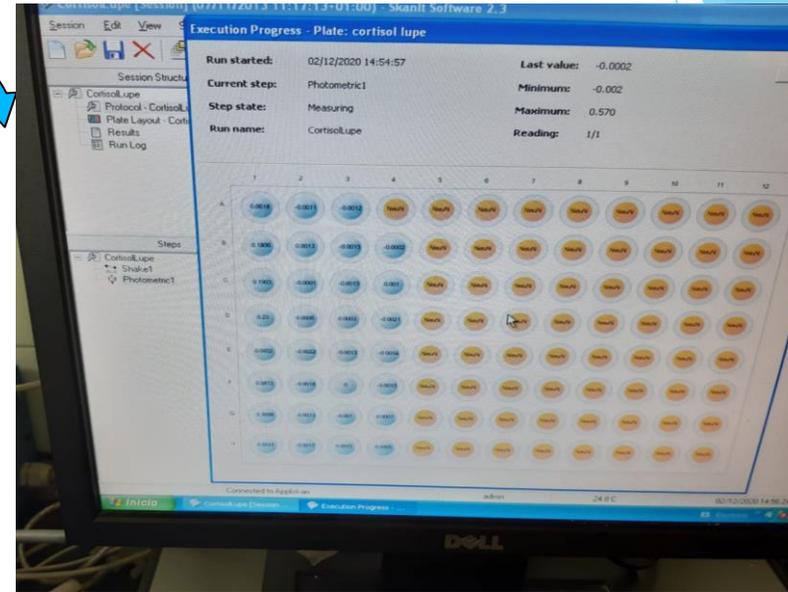


8- Se incuba **30 minutos** a temperatura ambiente sin agitar (la mezcla toma un color azul).

9- Se añade **50 μL** de la **solución de parada** a cada pocillo (la mezcla toma un color amarillo).



10- Luego la placa se lee a **450 nm** en un lector de multiplacas.



11- Crear una curva estándar y calcular la concentración de la muestra en relación a la curva estándar. Hay 2 procedimientos:

A-Ajustando a una curva logística del tipo 4PLC (four parameter logistic curve). En el **eje x** se representa la concentración de cortisol en escala logarítmica y en el **eje y** se representa % B/B_0 en escala lineal. Es el que usa el fabricante Arbor.

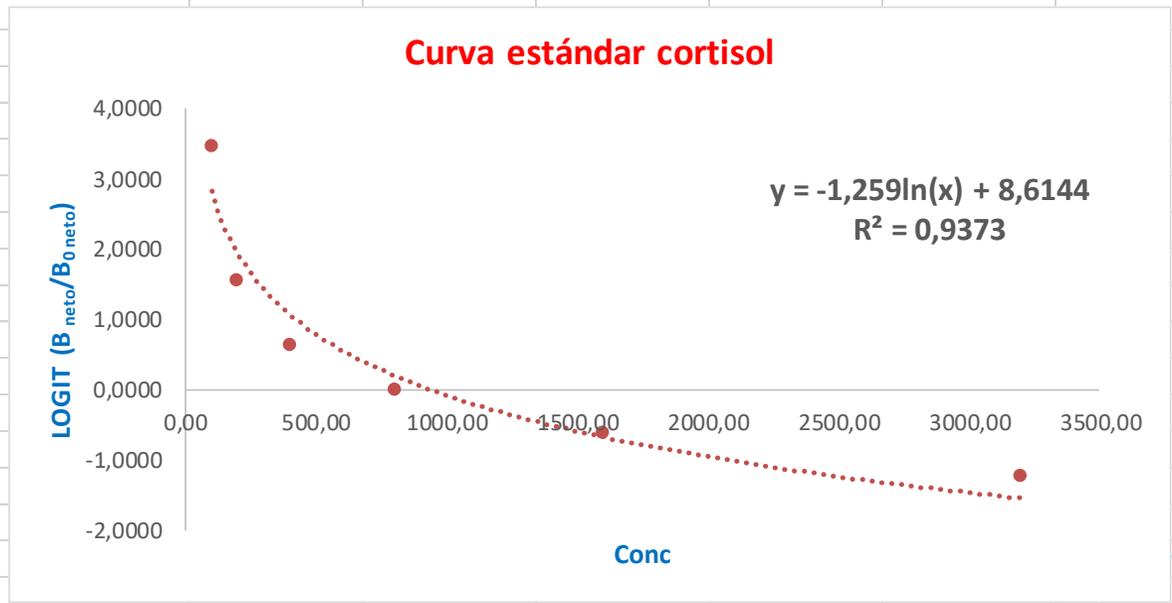
B-Ajustando a una recta usando una transformación **LOGIT** : $\text{LOGIT } B/B_0 = \ln [B/B_0 / (1 - B/B_0)]$ En el **eje x** se representa la **concentración de cortisol** o el **ln de la concentración de cortisol** y en el **eje y** se representa **LOGIT B/B_0** . Este procedimiento lo usa el fabricante Cayman y se muestra a continuación (indicando los pasos hasta llegar a la relación final):

1	Absorbancias de la placa		
		1	2
Estándar 1 (BA1 _{bruto} , BA2 _{bruto})	A	0,2800	0,2710
Estándar 2 (BB1 _{bruto} , BB2 _{bruto})	B	0,3990	0,3840
Estándar 3 (BC1 _{bruto} , BC2 _{bruto})	C	0,5540	0,5140
Estándar 4 (BD1 _{bruto} , BD2 _{bruto})	D	0,6830	0,6730
Estándar 5 (BE1 _{bruto} , BE2 _{bruto})	E	0,7930	0,8800
Estándar 6 (BF1 _{bruto} , BF2 _{bruto})	F	0,9930	0,9370
B _{0 bruto} (G1 _{bruto} , G2 _{bruto})	G	1,1250	0,8850
NSB (H1 _{bruto} , H2 _{bruto})	H	0,0630	0,0570
promedio NSB		0,0600	
2	Restar promedio NSB (los llamamos B _{neto})		
		1	2
Estándar 1	A	0,2200	0,2110
Estándar 2	B	0,3390	0,3240
Estándar 3	C	0,4940	0,4540
Estándar 4	D	0,6230	0,6130
Estándar 5	E	0,7330	0,8200
Estándar 6	F	0,9330	0,8770
B _{0 neto}	G	1,0650	0,8250
	H		
promedio B_{0 neto}		0,9450	

3	$B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}$		
	1	2	
Estándar 1	A	0,2328	0,2233
Estándar 2	B	0,3587	0,3429
Estándar 3	C	0,5228	0,4804
Estándar 4	D	0,6593	0,6487
Estándar 5	E	0,7757	0,8677
Estándar 6	F	0,9873	0,9280
	G		
	H		
4	$\text{LOGIT} (B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}) = \ln ((B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}})/(1-B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}))$		
	1	2	
Estándar 1	A	-1,1925	-1,2467
Estándar 2	B	-0,5809	-0,6506
Estándar 3	C	0,0911	-0,0783
Estándar 4	D	0,6600	0,6132
Estándar 5	E	1,2406	1,8810
Estándar 6	F	4,3535	2,5570
	G		
	H		

5	Tenemos 3 series de datos		
	Conc (pg/mL)	ln (Conc)	Promedio LOGIT ($B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}$)
Estándar 1	3200,00	8,07	-1,2196
Estándar 2	1600,00	7,38	-0,6157
Estándar 3	800,00	6,68	0,0064
Estándar 4	400,00	5,99	0,6366
Estándar 5	200,00	5,30	1,5608
Estándar 6	100,00	4,61	3,4552

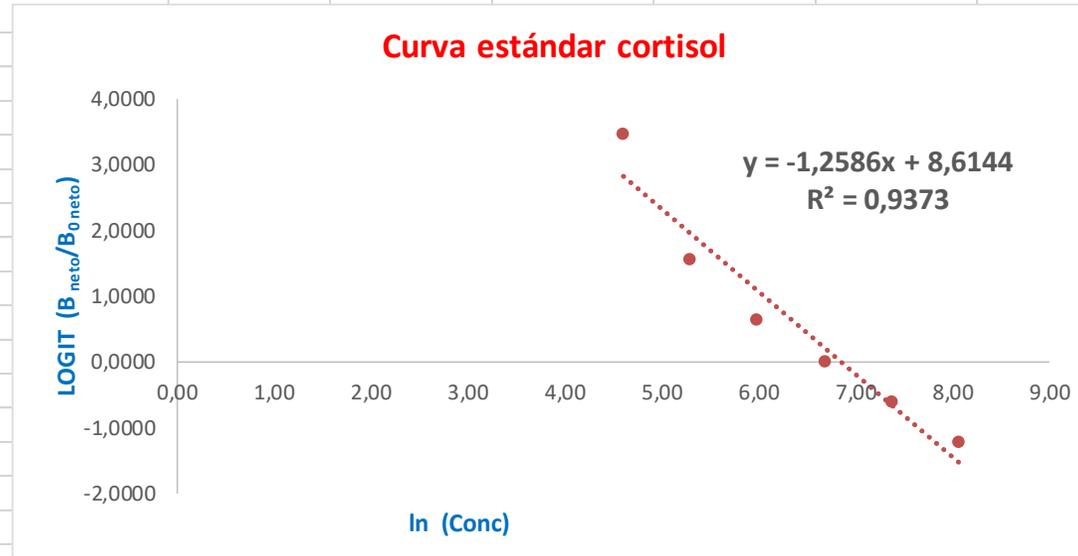
6 Si representamos LOGIT ($B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}$) frente a Concentración
Nos sale una curva logarítmica



7

Si representamos LOGIT ($B_{\text{neto}}/B_{0\text{neto}}$) frente a $\ln(\text{Conc})$

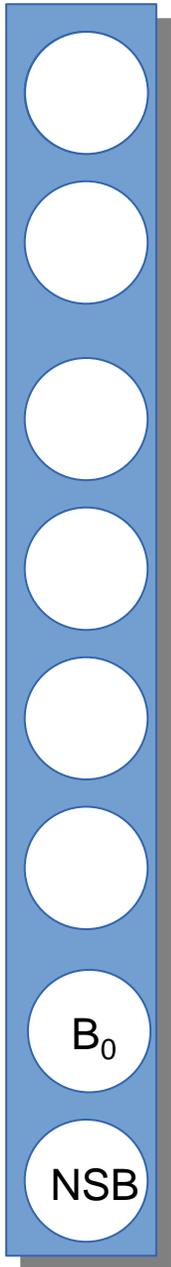
Nos sale una recta



8

Tanto por una relación como por la otra sacamos la relación entre la Absorbancia y la Concentración

$$\text{CONC (pg/mL)} = e^{(\text{LOGIT (B/B0)} - 8,6144)/-1,2586} * \text{Factor dilución}$$



Muestra 1 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	∩
Muestra 2 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Muestra 3 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Muestra 4 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Muestra 5 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Muestra 6 (50μl)	+ Cortisol Peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Tampón Ens. (50μl)	+ Cortisol peroxidasa (25μl)	+ Ac cortisol (25μl)	
Tampón Ens. (75μl)	+ Cortisol peroxidasa (25μl)	+ -----	

Cuantificación de glucosa



- **La GLUCOSA es la principal fuente de energía del organismo.**
- **La insulina facilita la entrada de glucosa en las células de los tejidos. Una deficiencia de insulina o una disminución de su actividad ocasiona un aumento de la glucosa en sangre.**
- **Se encuentran concentraciones elevadas de glucosa en suero o plasma en pacientes con diabetes mellitus y con otras condiciones o síndromes.**
- **La hipoglucemia puede darse como respuesta al ayuno, o bien puede ser debida a fármacos, venenos, errores congénitos del metabolismo, etc.**
- **En el hombre los valores de referencia en suero y plasma están comprendidos entre**
- **60-100 mg/dL = 3,30-5,60 mmol/L.**

Método de cuantificación

El fundamento del método consiste en una serie de reacciones enzimáticas acopladas que generan un compuesto final coloreado que se cuantifica por espectrofotometría:

1-La glucosa se oxida en presencia de la enzima ***glucosa oxidasa*** formando agua oxigenada.



2-El agua oxigenada oxida al compuesto 4-aminoantipirina en presencia de fenol gracias a la enzima ***peroxidasa*** para generar el compuesto coloreado quinonaimina de color rosa que absorbe a 500 nm.



Finalmente se calcula la concentración de la muestra relacionándola con una solución estándar o patrón de concentración conocida.

La cantidad de quinonaimina es proporcional a la de glucosa.

Reactivos, Kit BioSystems



Reactivo para glucosa

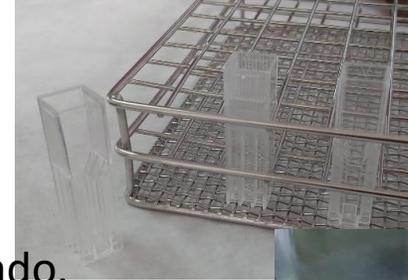
Contiene lo necesario para la reacción:
Glucosa oxidasa, peroxidasa, fenol,
4-aminoantipirina, tampón fosfato

Estándar o patrón de glucosa

Glucosa 100 mg/dL ó 5,5 mmol/L

Protocolo

1- Se cogen 3 cubetas espectrofométricas donde se realizará la reacción y también se leerá en el espectrofotómetro: para **blanco**, **estándar** y **muestra**.



2- Se pipetea **1 mL** de **Reactivo de glucosa** previamente atemperado.

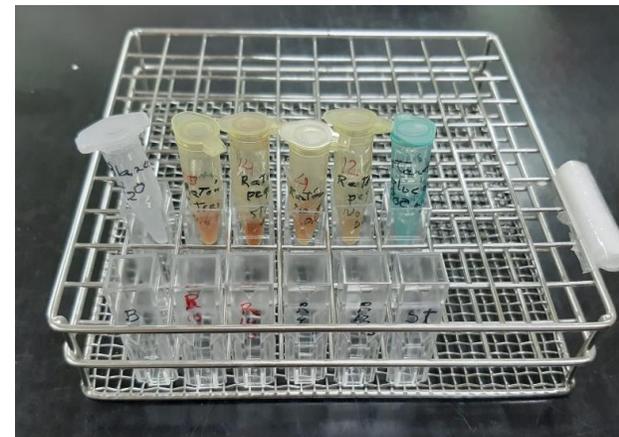


3-A- En la cubeta del **blanco** se pipetea **10 μ L** de **agua destilada**.

-B- En la cubeta de **estándar** se pipetea **10 μ L** de **estándar de glucosa**.

-C- En la cubeta de **muestra** se pipetea **10 μ L** de **muestra** (plasma, suero).

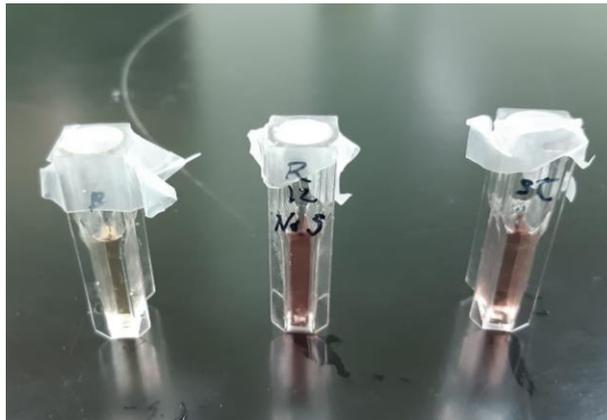
Todas estas sustancias previamente atemperadas.



4-Se incuban en un baño termostataado a **37 °C** durante **5 minutos**, en **agitación**.



5-Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a **500 nm**. El color es estable durante 2 horas.



6-Se calcula la concentración de la muestra comparándola con la curva estándar (formada por el blanco y el estándar).

$$\text{concentración muestra (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar glucosa}} * 100 \text{ mg/dL (conc estándar)}$$

Cuantificación de triglicéridos



- **Los TRIGLICÉRIDOS son ésteres de glicerol y ácidos grasos que provienen de la dieta o son sintetizados principalmente en el hígado.**
- **Se transportan en el plasma en las lipoproteínas y son utilizados por el tejido adiposo, músculo y otros.**
- **Su principal función es suministrar energía a la célula.**
- **Las concentraciones elevadas de triglicéridos o hiperlipidemias en el plasma pueden ser debidas a alteraciones hepatobiliares, diabetes mellitus, hipotiroidismo, alcoholismo, etc.**
- **En el hombre los valores en suero y plasma suelen estar alrededor de 150 mg/dL = 1,7 mmol/L.**

Método de cuantificación

El fundamento del método consiste en una serie de reacciones enzimáticas acopladas que generan un compuesto final coloreado que se cuantifica por espectrofotometría:

1- Los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente por la **lipasa**.



2- El glicerol es fosforilado por la **glicerol quinasa**.



3- El glicerol-3-P se oxida a dihidroxiacetona por la **glicerol-3-P-oxidasa**.

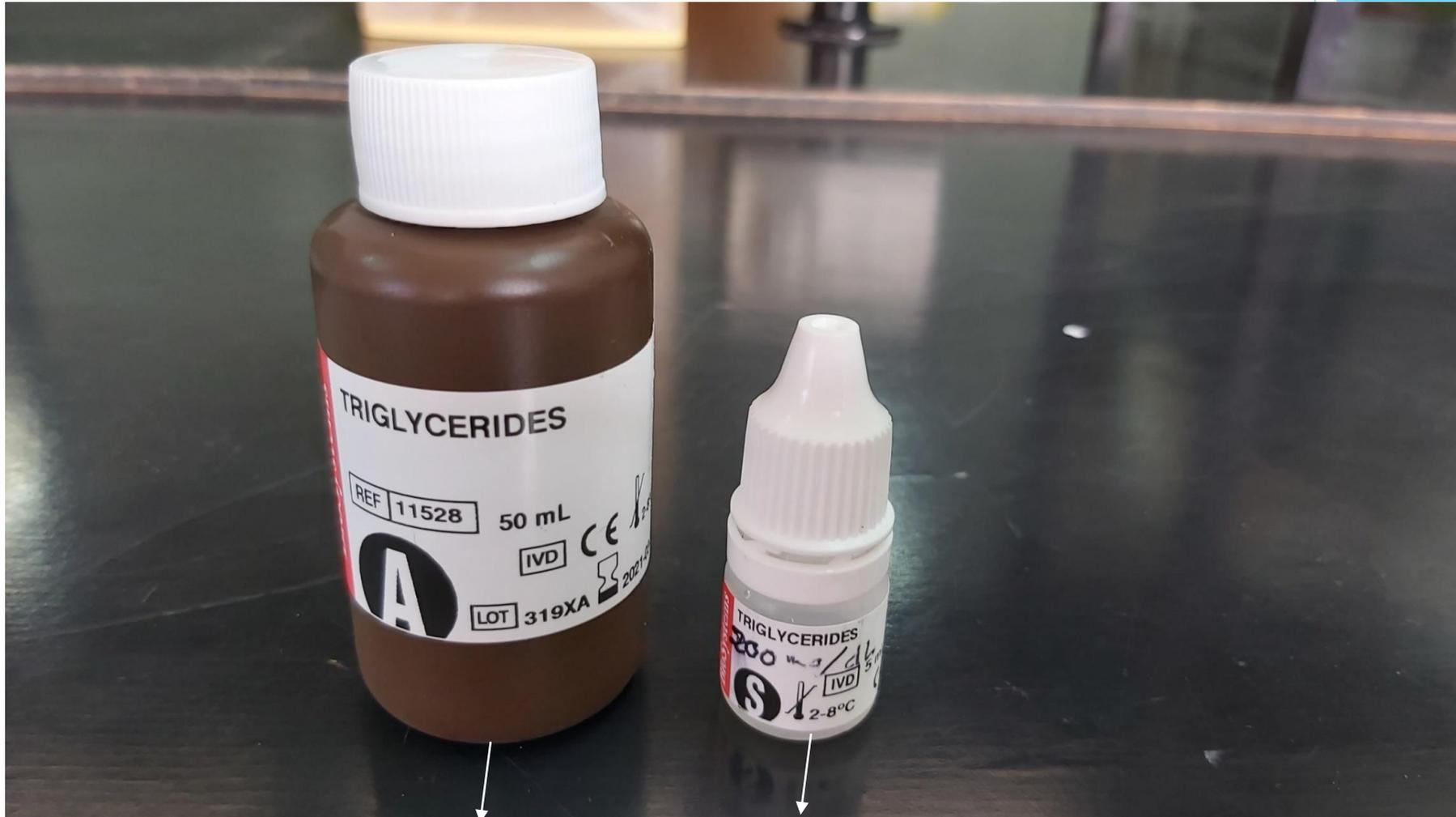


2-El agua oxigenada oxida al compuesto 4-aminoantipirina en presencia de 4-clorofenol gracias a la enzima ***peroxidasa*** para genera el compuesto coloreado quinonaimina de color rosa que absorbe a 500 nm.



La cantidad de quinonaimina es proporcional a la de triglicéridos. Finalmente se calcula la concentración de la muestra relacionándola con una solución estándar o patrón de concentración conocida.

Reactivos, Kit BioSystems



Reactivo para triglicéridos

Contiene lo necesario para la reacción:

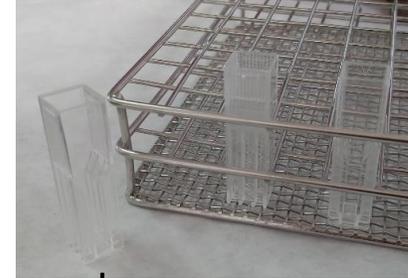
Lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-P-oxidasa, peroxidasa, 4-clorofenol, 4-aminoantipirina, ATP

Estándar o patrón de triglicéridos

Triglicérido 200 mg/dL ó 2,26 mmol/L

Protocolo

1- Se cogen 3 cubetas espectrofométricas donde se realizará la reacción y también se leerá en el espectrofotómetro: para **blanco**, **estándar** y **muestra**.



2- Se pipetea **1 mL** de **Reactivo de triglicéridos** previamente atemperado.



3-A- En la cubeta del **blanco** se pipetea **10 µL** de **agua destilada**.

-B- En la cubeta de **estándar** se pipetea **10 µL** de **estándar de triglicéridos**.

-C- En la cubeta de **muestra** se pipetea **10 µL** de **muestra** (plasma, suero).

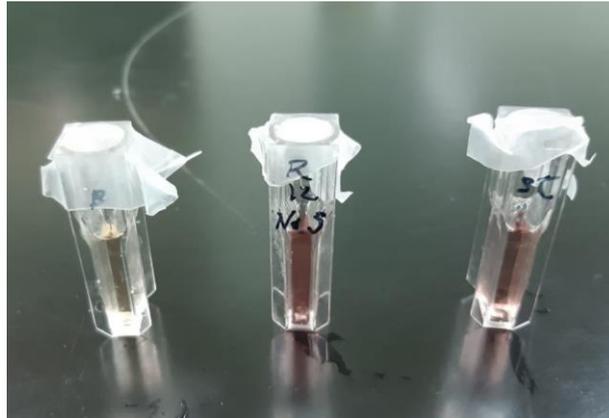
Todas estas sustancias previamente atemperadas.



4-Se incuban en un baño termostataado a **37 °C** durante **5 minutos**, en **agitación**.



5-Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a **500 nm**. El color es estable durante 2 horas.



6-Se calcula la concentración de la muestra comparándola con la curva estándar (formada por el blanco y el estándar).

$$\text{concentración muestra (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar triglicérido}} * 200 \text{ mg/dL (conc estándar)}$$



Universidad
de La Laguna



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta

