

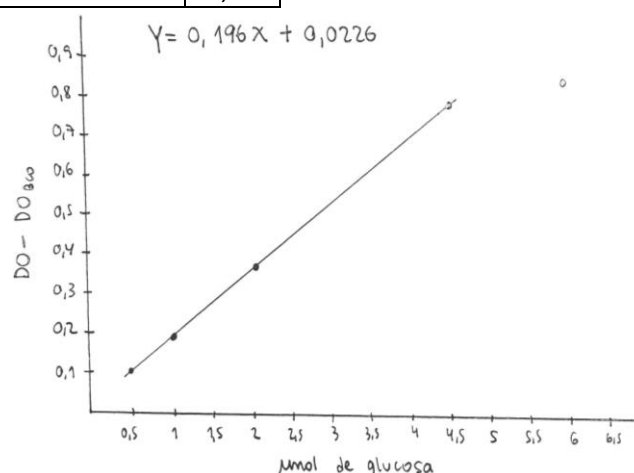
2DO PARCIAL – BIOLÓGICA 2025

En un laboratorio se está probando un nuevo compuesto que podría actuar sobre el metabolismo lipídico y glúcido en animales. El compuesto ABX se inyecta a 3 ratas (grupo T) y a otras 3 ratas se les inyecta el mismo volumen de solución fisiológica como control (grupo C). Al finalizar el ensayo, de cada rata se extrajo una muestra de sangre (2,5 ml) que se dividió en 2 partes iguales. Una se utilizó para obtener el suero y la otra para obtener extracto lipídico. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Condición		Alícuotas de suero (ml)	Azúcares reductores (DO-DO _{blco})	Alícuotas extracto lipídico (ul)	AGL (mg)
3 ratas control	C1	0,1	0,030	200	--
	C2	0,3	0,420	200	0,5
	C3	0,8	0,997	200	--
3 ratas tratadas	T1	0,2	0,354	200	--
	T2	0,2	0,546	200	--
	T3	0,8	0,987	200	0,95

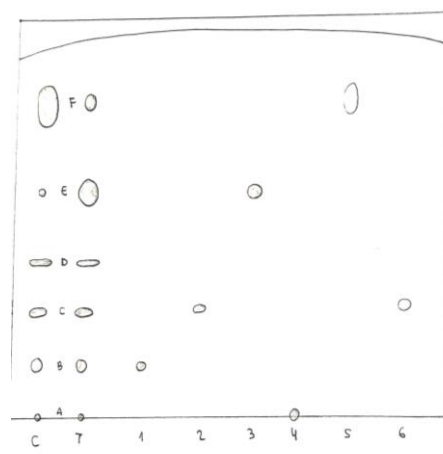
(--): no cuantificado

Para la cuantificación se usó un estándar de Glucosa (10 umol/ml) y se cuantificó por un método colorimétrico.



- 1) Qué tipo de ensayo se realizó para estudiar el efecto del compuesto ABX? Justifique
- 2) Qué método cree que se utilizó para cuantificar azúcares reductores? Explique el fundamento del mismo
- 3) Calcule los umoles de glucosa/ml de suero y mg de AGL/ml de sangre
- 4) Grafique el porcentaje de efecto en ambos parámetros evaluados en función de las condiciones, en el mismo gráfico.
- 5) Calcule la magnitud del efecto del compuesto ABX sobre los niveles de glucosa y AGL
- 6) De acuerdo a los valores obtenidos para la glucosa, qué vía metabólica considera que se activó? Justifique
- 7) En el ensayo experimental se inyectaron 250 ul de una solución stock del componente ABX (1×10^{-3} M). Si consideramos que el volumen de sangre total de rata es de 14 ml:
 - a. Cuál es la [] final del componente ABX en sangre inmediatamente después del tratamiento?
 - b. Cuál es el factor de dilución empleado?
- 8) Para cuantificar los AGL se utilizó un método colorimétrico pero primero se debió realizar la extracción de lípidos totales en 1,2 ml de sangre. Qué método utilizaría? Por qué? Indique reactivos, proporciones y volúmenes.
- 9) Paralelamente se sembró en una TLC monodimensional la misma cantidad de extracto lipídico obtenido de una rata control y de una rata con ABX. Se sembraron estándares PL, MG, DG, Col, TG, AGL, pero no fueron rotulados en la placa. Observe la siguiente placa y rotule los estándares completando la tabla teniendo en cuenta que se trabajó en las mismas condiciones de corrida que en el TP. Explique por qué considera que los lípidos migran en ese orden en la placa.

Mancha	Se comporta como el estándar N°	Identificación del estándar (nombre)
A	4	
B	1	
C	2 y/o 6	
D	--	
E	3	
F	5	



- 10) Basándose en el punto anterior, explique cómo haría para determinar la composición lipídica de la sangre. Ejemplifique con datos concretos utilizando la mancha F de la condición C
- 11) Con los datos obtenidos hasta el momento, considera que el compuesto ABX generó algún cambio en el metabolismo lipídico de las ratas? Justifique
- 12) Para la TLC monodimensional se preparó una fase móvil de hexano, éter, ácido acético en una proporción 35:65:2,6. ¿Qué volumen de cada solvente debe agregarse para preparar 260 ml de fase móvil?

Luego del ensayo se sacrifican las ratas y se procesó el tejido hepático para evaluar otros parámetros. Partiendo de 5 g de hígado de rata control y una rata tratada, se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción nuclear y microsomal. La primera fracción se utilizó para cuantificar ADN con el fin de evaluar la proliferación celular. En la fracción microsomal se realizó una extracción de lípidos totales y este extracto se sometió a cromatografía para estudiar la vía de la Fosfolipasa C (PLC)

- 13) ¿Qué método utilizaría para extraer los lípidos totales del pellet de la fracción microsomal? ¿Por qué?
- 14) ¿Qué tipo de cromatografía utilizaría para evaluar los niveles de sustrato de la PLC? ¿Por qué?
- 15) Esquematice el resultado de la cromatografía del inciso 14 luego del revelado, asumiendo que se activó la vía de PLC por acción del compuesto ABX. NOTA: considere que se sembró la misma cantidad de muestra C y T y que luego del revelado se encuentran 3 manchas distintas en cada condición.
- 16) Teniendo en cuenta el protocolo completo de extracción de ADN total, responda:
 - a. Durante la extracción de ADN se omite el agregado de citrato de sodio al buffer, ¿considera que esto tiene alguna consecuencia en la muestra obtenida? ¿Cómo puede evaluarlo?
 - b. ¿Cómo haría para precipitar el ADN?
 - c. ¿Cómo hace para separar las protaminas e histonas del ADN?

Para cuantificar el ADN, la fracción nuclear obtenida (0,125 g para cada condición) se homogeniza en 10% de Buffer. Se procesó todo el volumen del homogenato y se extrajo el ADN, el cual se resuspendió en 200 µl de buffer TE. Para cuantificar se tomó alícuota de 40 µl en muestra C y 20 µl en muestra T y se llevó cada una a un volumen final de 300 µl con agua. Los resultados fueron:

	Abs260	Abs 280	260/280
Control		0,156	1,79
Tratado	0,561		1,89

- 17) Complete la tabla y calcule el ADN por gramo de fracción nuclear de las condiciones ensayadas e indique si el compuesto tuvo algún efecto en la proliferación de células hepáticas
- 18) El protocolo de extracción de ADN fue propuesto por Juan pero Pablo no estaba muy convencido de su eficacia. Por eso le apostó a Juan que la pureza del ADN extraído sería bajo. De acuerdo a los resultados obtenidos, ¿quién crees que ganó la apuesta? Justifique
- 19) Investigaciones realizadas por otro grupo determinaron que el compuesto ABX aumenta la expresión de un gen cuya secuencia es: 5' ACGATCATGAGGT 3'
 - a. ¿Qué proporción de purina posee la hebra?
 - b. ¿Cuál es la secuencia de la hebra de ADN complementaria?
 - c. ¿Cuál es la secuencia de la hebra de ARN obtenida por transcripción?