

# 14. Cromatografía de filtración en gel de sangre de vaca y cerdo: formas redox de la hemoglobina

Concepción García Alfonso, Jose Antonio Bárcena Ruiz, Jesús Díez Dapena, Emilia Martínez Galisteo, C. Alicia Padilla Peña

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

La hemoglobina (Hb) transporta el oxígeno desde los pulmones, agallas o piel (dependiendo de la especie animal) hasta los tejidos. También transporta desechos del metabolismo desde los tejidos hasta los pulmones para eliminarlos. Existen distintas clases de Hb, oxihemoglobina, en forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de color rojo, unida al oxígeno y metahemoglobina, forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) incapaz de unirse al oxígeno y de color pardo. En esta práctica se aprenderá a manejar la técnica de cromatografía por filtración en gel, aprovechando las características diferentes de estas dos formas de Hb. En ella, la Hb oxidada (metahemoglobina) la separaremos de su oxidante artificial, reduciéndola a oxihemoglobina. Asimismo, se determinarán los espectros de absorción de las dos formas de hemoglobina citadas.

*Palabras clave:* desoxihemoglobina, metahemoglobina, oxihemoglobina.

*Abreviaturas empleadas.* CN-met-Hb: cianometahemoglobina; EDTA: ácido etilén diamino tetraacético; Hb: hemoglobina; met-Hb: metahemoglobina; (oxid): oxidado; (red): reducido

## 1. INTRODUCCIÓN

La sangre es un tejido orgánico en forma de líquido viscoso, de color rojizo, e integrado por elementos celulares libres (células sanguíneas) y por una sustancia fundamental líquida (plasma). De las células sanguíneas las que nos interesan son los eritrocitos, células anucleadas en forma de disco circular bicóncavo y superficie lisa, que contienen un 33% de hemoglobina. La **hemoglobina** es la molécula encargada de transportar el oxígeno a cada una de las células del organismo, por lo que juega un papel vital en el aspecto más importante del metabolismo, ya que los mecanismos más eficientes para generar energía en las células animales, requieren oxígeno molecular para la oxidación de los alimentos. También transporta una parte del  $\text{CO}_2$  producido en los tejidos hasta los pulmones. La hemoglobina es una proteína, con un peso molecular de **66.000 d**. Está formada por 4 cadenas polipeptídicas, cada una unida a un grupo hemo. Éste está formado por una porfirina unida a Fe que puede estar en forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o en forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La forma

reducida es la única capaz de unirse al O<sub>2</sub> y se denomina **oxihemoglobina** cuando está unida al O<sub>2</sub> (de color rojo vivo, es la que se encuentra en la sangre arterial). La sangre venosa (rojo oscuro) contiene bastante **desoxihemoglobina**, que no contiene oxígeno y sí CO<sub>2</sub> unido como carbamino-Hb. El átomo de hierro del grupo hemo se mantiene en todas estas formas en su forma reducida Fe<sup>2+</sup>. Si se oxida a Fe<sup>3+</sup> es incapaz de unirse al O<sub>2</sub> ni al CO<sub>2</sub> y se denomina **metahemoglobina** (de color pardo).

### 1.1. OBJETIVOS

- Comprender el mecanismo de la cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.
- Observar las diferentes formas redox de la hemoglobina y sus diferentes espectros de absorción

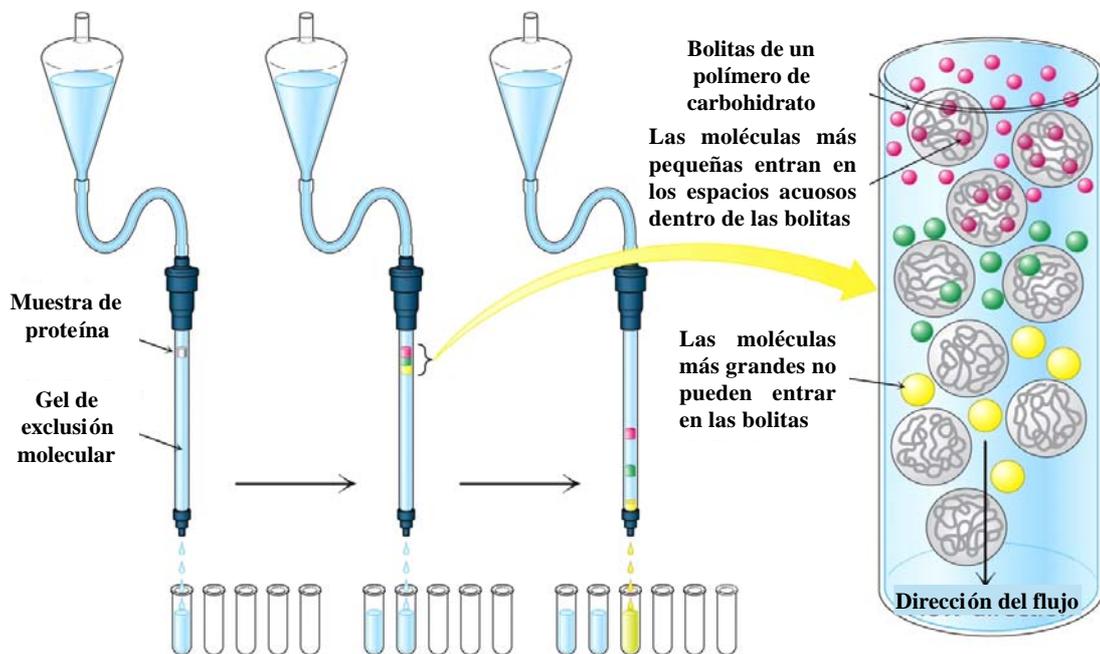
## 1ª Parte FILTRACIÓN EN GEL DE HEMOGLOBINA

### 1.- FUNDAMENTO

La cromatografía de filtración en gel o exclusión molecular, una de las modalidades de cromatografía en gel, es un proceso en que los componentes de una muestra se separan en función de su tamaño y su forma molecular.

La separación se realiza en una columna que contiene un gel formado por bolitas porosas compuestas de un polímero insoluble, pero altamente hidratado, tales como el dextrano y la agarosa (carbohidratos) o la poliacrilamida. Sephadex, Sepharosa y Biogel son preparaciones comerciales de estas bolitas usadas normalmente.

Los componentes a separar se establecen entre el disolvente que fluye por el exterior de estas bolitas (fase móvil) y el que se encuentra en el interior de las mismas (fase estacionaria). Las variables que determinan la distribución de los solutos entre ambas fases son fundamentalmente de tipo estérico.



**Figura 1. Filtración en gel**

Las moléculas pequeñas pueden entrar en estas bolitas, pero no las grandes. El resultado es que las moléculas pequeñas se distribuyen tanto en el interior de las bolitas como entre ellas, mientras que las moléculas grandes se localizan solamente en la disolución entre las bolitas. Las moléculas grandes fluyen más rápidamente a través de esta columna y salen antes porque disponen de un volumen accesible menor. Las moléculas que son de un tamaño intermedio y que pueden penetrar en las bolitas sólo parcialmente fluirán de la columna en una posición intermedia y las moléculas pequeñas, que siguen un camino más largo y tortuoso, saldrán las últimas.

Consecuentemente, el orden de elución de los distintos componentes de la mezcla será inverso al de su tamaño molecular.

## 2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

- Columna de Sephadex G-25.
- Vasos de precipitado de 50 ml.
- Tubos de vidrio de 10 ml.
- Pipetas de vidrio de 1 ml y 5 ml, y pipetas automáticas con puntas desechables.
- Tampón fosfato 20 mM pH 7.
- Agente Reductor: Ditionito sódico ( $S_2O_4Na_2$ ).
- Agente Oxidante: Ferricianuro potásico ( $Fe(CN)_6K_3$ ).
- Sangre de cerdo.
- Cubeta "semi-micro".
- Agua destilada.

### 3. PROTOCOLO A REALIZAR

Un paso previo consiste en la recolección de sangre. Para ello se añadirán agentes anticoagulantes con una concentración de 1 mg/ml de EDTA y 0,2 mg/ml de heparina. Una vez bien mezclada se repartirá en recipientes pequeños y se conservarán a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Este paso suele hacerlo el profesor.

#### 1. Paso primero: Preparación de la muestra

Para realizar la práctica se procederá de la siguiente forma:

**1.1.** Hemolizar la sangre para que se libere la hemoglobina que contiene al medio: se diluye **250  $\mu\text{l}$**  de sangre en **1 ml** de agua destilada.

**1.2.** Oxidar la hemoglobina a metahemoglobina: para ello se añaden **50  $\mu\text{l}$**  de ferricianuro potásico a **500  $\mu\text{L}$**  del hemolizado anterior, mezclando con agitación suave. El ferricianuro es un oxidante que convierte todas las formas de Hb en su forma oxidada o metahemoglobina. Se podrá observar como la sangre pasa de un color rojo intenso a un color pardo oscuro.

Una vez realizado este paso previo se realizará la cromatografía propiamente dicha.

#### 2. Paso segundo: Preparación de la cromatografía

**2.1.** Lavar la columna con tampón fosfato potásico 20 mM pH 7 con un volumen igual al doble del volumen total de la columna (llenar la columna hasta arriba y dejar que pase entero a través de la misma antes de añadirlo por segunda vez). Mientras tanto se deberá numerar los tubos de vidrio del 1 al 20.

**2.2.** Depositar una fina capa de **solución de ditionito, 200  $\mu\text{l}$** , en la superficie del lecho de la columna. Dejar que el ditionito pase por completo al interior de la columna.

**2.3.** Añadir **650  $\mu\text{l}$  de tampón** para que el ditionito se introduzca bien en la columna. Dejar que el tampón se introduzca por completo en el interior de la columna.

**2.4.** Aplicar una fina capa de **solución de metahemoglobina, 200  $\mu\text{l}$** , de forma uniforme. Dejar que la metahemoglobina pase a la columna.

**2.5.** Volver a llenar la columna con tampón hasta arriba. A partir de este momento y hasta el final de la cromatografía se recogerán **fracciones de 10 gotas** del líquido eluyente.

**2.6.** Añadir 5 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a cada tubo y medir la absorbancia a 420 nm de cada fracción, ajustando a 0 con  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Nota:** a las fracciones donde se eluye la hemoglobina (color rojo intenso) se añaden 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  en lugar de 5 ml.

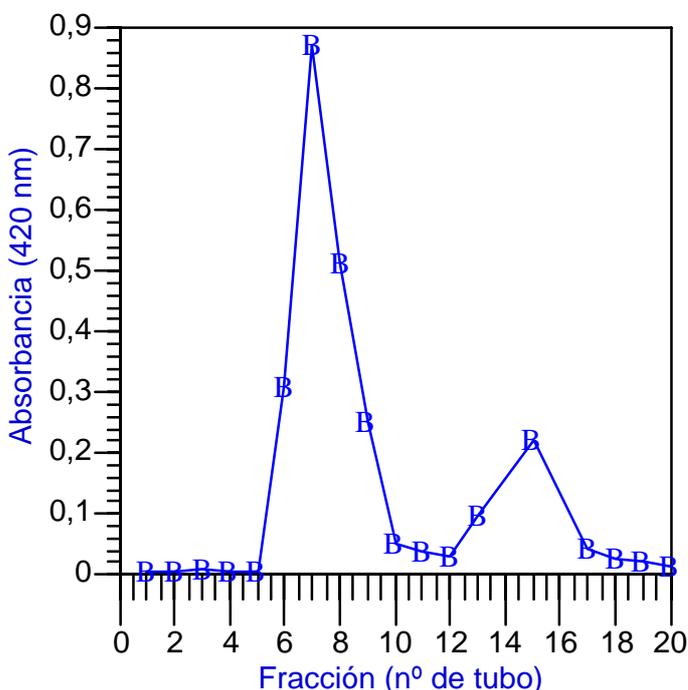
**2.7.** Volver a equilibrar la columna con tampón repitiendo el lavado del primer paso y dejándola llena de tampón y cerrada para su posterior utilización.

#### 4. RESULTADOS ESPERADOS

Al final de la práctica se realizará una gráfica en la que se representará el volumen de elución, número de fracción, (en el eje X) frente a unidades de densidad óptica o absorbancia a 420 nm (en el eje Y). De esta forma se obtendrá un **cromatograma** que indicará el "perfil de elución" de la hemoglobina y el ferricianuro potásico y el retraso que sufre este último frente a aquella. El ferricianuro sale de la columna detrás de la hemoglobina y se anotará en el cromatograma el tubo en el que hay un color amarillo más intenso, que corresponde al pico de elución del ferricianuro.

A continuación se muestran la **Figura 2** y **Tabla 2** como ejemplo aproximado del cromatograma correspondiente a los datos incluidos en la Tabla, que los alumnos tendrán que adaptar a sus propios resultados.

**Tabla 2**

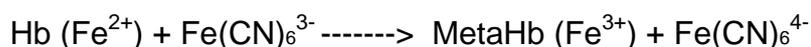


Nº tubo	Absorbancia a 420 nm.
	420 <sup>b</sup> (Visible)
1	0,004
2	0,006
3	0,007
4	0,005
5	0,003
6	0,307
7	0,870
8	0,514
9	0,251
Etc., etc.	

**Figura 2.** Perfil de elución de la hemoglobina y el ferricianuro potásico

#### EXPLICACIÓN DEL FENÓMENO

En presencia de ferricianuro potásico (oxidante), la hemoglobina reducida se oxida a metahemoglobina (de color pardo), cambiando el estado de oxidación del Fe del grupo hemo de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>.



Al eluir la muestra (metahemoglobina más ferricianuro) a través de la columna, las moléculas grandes de metahemoglobina pasan rápidamente entre las partículas de Sephadex G-25, mientras que las moléculas pequeñas de ferricianuro quedan retrasadas. Así, al final se separan en dos bandas distintas de diferente color (una amarilla correspondiente al ferricianuro y otra parda de

la metahemoglobina). Como la metahemoglobina emigra rápidamente acaba alcanzando a la banda de ditionito sódico (reductor, de bajo peso molecular por lo que eluye despacio). Entonces la metahemoglobina se reduce de nuevo a hemoglobina roja.

La hemoglobina regenerada puede entonces oxigenarse espontáneamente con el O<sub>2</sub> disuelto en el tampón para formar oxihemoglobina de un color rojo brillante característico (ver esquema).

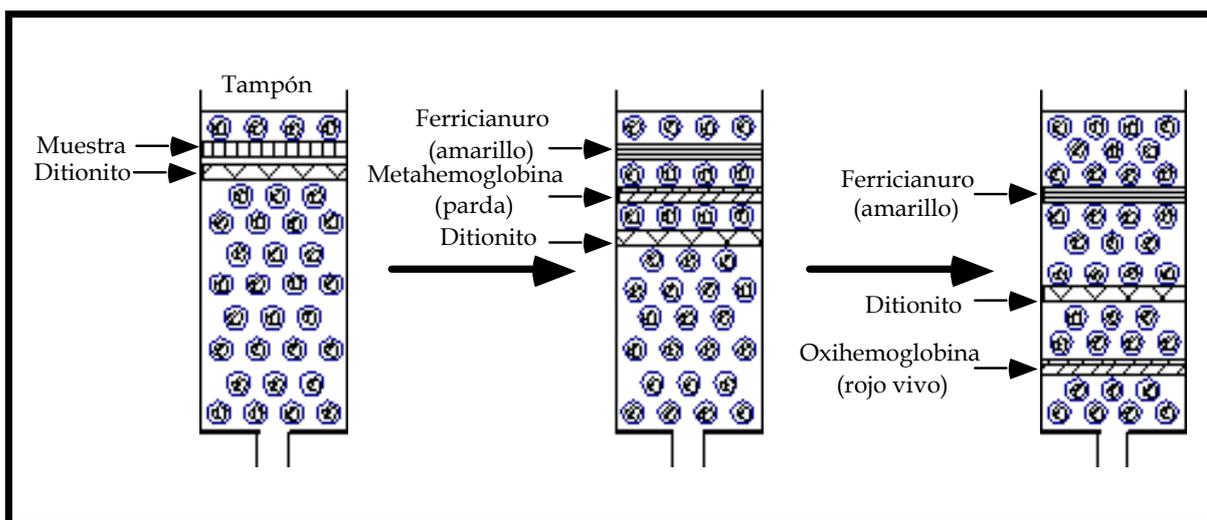
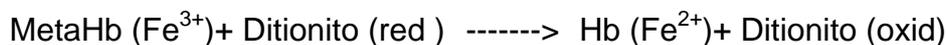


Figura 3: Esquema de la cromatografía del experimento realizado en la práctica

## 2ª parte

### ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE OXIHEMOGLOBINA Y METAHEMOGLOBINA

#### 1. FUNDAMENTO

Las distintas formas de Hb se distinguen por sus espectros de absorción, aunque todas absorben mucho entre 480 y 660 nm, de ahí su color rojo, y esta propiedad se usa para su medida.

Al cambiar el estado redox de la Hb, también cambian algunas de sus características físicoquímicas, como las longitudes de onda a las que absorbe más. Se realizarán los espectros de absorción de las dos formas de Hb empleadas, metaHb y oxiHb.

#### 2. PROTOCOLO A REALIZAR

**1. Paso primero:** Para el **espectro de absorción de la oxiHb** simplemente tomamos **100 µl** del hemolizado preparado en el apartado **1.1** de la **1ª** parte y

los diluimos 10 veces añadiendo **900 µl** de agua destilada. Obtenemos la gráfica que representa el espectro de absorción en el espectrofotómetro usando una cubeta “semi-micro” como la utilizada en la primera parte de esta práctica.

**2. Paso segundo:** A continuación obtenemos el **espectro de la metaHb** del mismo modo, diluyendo **100 µl** de la muestra oxidada con ferricianuro en el apartado 1.2 de la 1ª parte en **900 µl** de agua destilada y obteniendo la gráfica del mismo modo indicado arriba.

**3. Paso tercero:** Realizaremos a continuación la superposición y comparación de los dos espectros.

### 3. RESULTADOS ESPERADOS

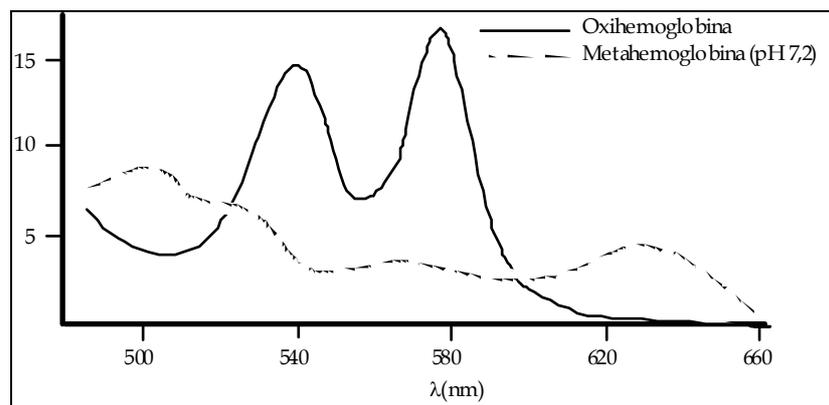


Figura 4. Espectro de absorción de la oxihemoglobina y metahemoglobina

### BIBLIOGRAFÍA

- Mathews CK, van Holde KE (1996): Capítulo 7: Protein function and evolution. En: “Biochemistry” 2ª ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. (California, EE.UU), pp 214-234.
- Nelson DL, Cox MM (2001): Capítulo 5: Aminoácidos, péptidos y proteínas En: . “Lehninger, Principios de Bioquímica”, 3ª ed. Ediciones Omega S.A. (Barcelona, España), pp 130-134.
- Wilson K and Walker J (1994): Capítulo 10: Chromatographic techniques. En: . “Principles and Techniques of Practical Biochemistry”, 4ª ed. Cambridge University Press (Somerset, Great Britain), pp 504-508.
- Williams LB, Wilson K (1981): Capítulo 3: Técnicas cromatográficas. En: “Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental”. Ediciones Omega S.A. (Barcelona, España), pp 84-90.

## ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

<b>Tabla anexo 3. Ditionito sódico (agente reductor)</b>	
(S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ) Peso molecular: 174,11 d	<b>Para 5 ml</b>
S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	200 mg
Tampón fosfato 20 mM pH 7	5 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

<b>Tabla anexo 4. Ferricianuro potásico (agente oxidante)</b>	
(Fe(CN) <sub>6</sub> K <sub>3</sub> ) Peso molecular: 329,26 d	<b>Para 5 ml</b>
Fe(CN) <sub>6</sub> K <sub>3</sub>	A saturación
Agua destilada	5 ml