

- Se desea investigar en el laboratorio el mecanismo de acción del malonato sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH). Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular a partir de 1,5 g de músculo esquelético de rata en buffer al 20%. La fracción mitocondrial obtenida se resuspendió en 3 ml de buffer y se dividió en partes iguales; una se reservó para hacer el estudio enzimático y la otra para cuantificar proteínas, obteniéndose los siguientes valores:

Volumen final luego del agregado de NaOH	Alícuota (µl)	Absorbancia
2,5 ml	50	0,110
	150	0,328
	250	0,475

Datos para la curva de calibrado:

Absorbancia	0,0050	0,0585	0,1130	0,2260	0,4540	0,4550
Albúmina (mg)	0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	3,00

Resolver los siguientes incisos y adjuntar el/los archivos/s:

a- Diseñe un protocolo donde se indiquen los pasos que se debieron tener en cuenta para obtener la fracción mitocondrial especificando volumen de buffer utilizado y características del mismo, el tipo de homogeneización y separación.

b- Grafique la curva de calibrado. ¿Se cumple la Ley de Lambert y Beer en todo su rango? Justifique.

c- Calcule la cantidad de proteínas de la fracción mitocondrial expresado en mg/ml y en mg/g de tejido.

-El efecto inhibitorio del malonato sobre la actividad catalítica de la SDH se estudió a partir de extractos de mitocondria de musculo esquelético. Dado los resultados obtenidos en la siguiente tabla, realice los cálculos correspondientes y determine gráficamente los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{máx}$  en ausencia y presencia del inhibidor.

La experiencia se realizó durante 5 minutos utilizando 0,3 ml de extracto mitocondrial diluido en buffer cinético (pH 7,4) para cada condición. El volumen final del ensayo fue de 2 ml, la concentración del stock de succinato fue de 15 mM y la del malonato durante toda la reacción fue de 80 mM.

Reacción: Succinato + FAD+ -----> Fumarato+ FADH<sub>2</sub>

Succinato(ml)	0,20	0,27	0,40	0,53	1,07
mmoles FADH <sub>2</sub> /5 min sin malonato	0,65	0,75	0,84	0,99	1,20
mmoles FADH <sub>2</sub> /5min con malonato	0,25	0,33	0,42	0,56	0,71

Resolver y adjuntar archivo con resolución gráfica, determinación de km en ausencia y presencia inhibidor y Vmax.

- Se utiliza centrifugación diferencial.
- No se cumple la ley en todo su rango debido que pierde la linealidad.

Las estatinas son inhibidores de la HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) y son importantes para la prevención de Hipercolesterolemia y enfermedades relacionadas. En el laboratorio se quiere implementar un nuevo protocolo de tratamiento para la Rosuvastatina (RST). Para evaluar el efecto de este compuesto sobre los niveles de colesterol, se emplearon 4 lotes de ratas, alimentados con una dieta rica en grasas, a los cuales se les suministró RST en el agua de bebida a distintas concentraciones durante 2 meses. Posteriormente, se procedió a separar el colesterol en sangre por cromatografía en capa fina y se cuantificó por un método colorimétrico.

Lote	Control	Dosis I	Dosis II	Dosis III
<b>RST 1mM (stock diluido en agua de bebida)</b>	0	1/100	1/50	1/10
<b>D.O. - Bco</b>	0,230	0,130	0,025	0,050
	0,340	0,125	0,085	0,029
	0,200	0,140	0,075	0,055
<b>Estándar de Col(2 mg/ml) (µl)</b>	10	30	60	95
<b>D.O.- Bco</b>	0,031	0,077	0,155	0,233

a- La obtención del colesterol se realizó a partir de 1,5 ml de sangre extraída de cada animal y luego se tomaron alícuotas de 0,1 ml para la cuantificación del colesterol. Determine los niveles de colesterol en sangre en los distintos grupos y exprese los resultados en mg/dl. Calcule la magnitud del efecto de RST sobre los niveles de colesterol en sangre

b- Grafique los niveles de colesterol en sangre (mg/dl) vs. concentración de RST (µM).

c- Indique el método de aislamiento de lípidos totales, adecuado para valorar el colesterol en sangre, y esquematice el protocolo de extracción sabiendo que el volumen de muestra fue de 1,5 ml. Especifique tipo de solventes, proporción y volúmenes a utilizar en todos los pasos.

d- Si la solución stock de RST fue de 1mM, calcule los ml de la solución stock que se necesitan para lograr la concentración final del compuesto en el agua de bebida (250 ml) para cada tratamiento.

Algunos reportes indican que las estatinas promueven la proliferación (aumento del número de células) de células endoteliales progenitoras de médula ósea (MO). Para evaluar esto, se testeó el efecto del RST (100 $\mu$ M) en células endoteliales extraídas de MO de ratas. Como medida de la proliferación, se cuantificó la cantidad de ADN total proveniente de 0,2 mg de células. El ADN obtenido según el protocolo se colectó en 2 ml de buffer TE:

Tiempo de tratamiento con RST (días)	Dilución de ADN	Abs. 260	Abs. 280
0	4/7	0.110	0.058
1	1/3	0.125	0.066
3	1/6	0.107	0.056

a- Calcule el contenido total de ADN como medida de la proliferación.

b- Grafique  $\mu$ g ADN /mg de célula inducido por RST en función del tiempo.