

21:22



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**“DESARROLLO Y TECNOLOGIA NACIONAL
PARA LA SUSTITUCION DE TIRAS
REACTIVAS PARA EL DIAGNOSTICO
RAPIDO DE DIABETES MELLITUS”.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Patricia Curiel López

EXEMPLAR DEPOSITADO EN LAS
BIBLIOTECAS DE LA FACULTAD DE QUIMICA



México, D. F.

1989

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES SOBRE DIABETES MELLITUS	
Definición	4
Metabolismo intermedio normal	4
Clasificación	11
Diagnostico	13
Prueba Oral de tolerancia a la glucosa	15
Características clínicas de la diabetes dependiente de insulina (IDDM) y de la no dependiente de insulina (NIDDM) y otras categorías de intolerancia a la glucosa.	18
Metodología para la valoración de Cuerpos Cetónicos	26
Metodología para la valoración de glucosa	36
MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS	
Cuerpos Cetónicos	52
Glucosa	87
DISCUSION DE RESULTADOS	
Cuerpos Cetónicos	82
Glucosa	97
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El trabajo experimental fue desarrollado en el Instituto Nacional de Pediatría (I.N.P.) con base al proyecto PCSABNA-022168 del Departamento de Ciencias de la Salud y Excelencia de CONACyT.

La inquietud de desarrollar tecnología nacional como un método alternativo a las "tiras y tabletas reactivas" que detectan cuerpos cetónicos y glucosa, surgió por el conocimiento del elevado costo que tienen estos productos en el comercio y de la necesidad que tienen los pacientes diabéticos y en el laboratorio clínico de los mismos.

Así, en el laboratorio clínico se utilizan con frecuencia las "tiras y tabletas reactivas" cuando llegan muestras de individuos diabéticos que pueden estar cursando con una cetoacidosis diabética o bien con un coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico, en cuyos casos la evaluación inmediata de glucosa y de cuerpos cetónicos es vital para iniciar el tratamiento adecuado.

Los pacientes diabéticos también usan con frecuencia las tiras y tabletas reactivas para llevar a cabo un registro diario de la concentración de glucosa y de cuerpos cetónicos, que les permita controlar su nivel de azúcar en la sangre.

Con el desarrollo de tecnología a bajo costo que sustituya lo ya existente, el paciente resultará grandemente beneficiado pudiendo así llevar un autocontrol que le redituará un bienestar físico.

Por otro lado, debido a la importancia que representa la diabetes mellitus en nuestro medio, creimos conveniente el proporcionar al químico clínico la clasificación y los criterios diagnósticos actuales de dicha enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Buscar un método alternativo al que utiliza las tiras reactivas existentes para la determinación rápida de cuerpos cetónicos y glucosa que reúna los requisitos de especificidad, sensibilidad y bajo costo, utilizando tecnología nacional y materia prima de fácil acceso.
2. Facilitar a pacientes diabéticos el efectuar un autocontrol diario que les indique cuando se encuentran en estado de descompensación metabólica.
3. Proporcionar al químico clínico la clasificación, así como los criterios que se emplean actualmente en el diagnóstico de la diabetes mellitus.

**GENERALIDADES
SOBRE
DIABETES MELLITUS**

DIABETES MELLITUS

DEFINICION

La diabetes mellitus es un síndrome que se caracteriza por una deficiencia absoluta o relativa de insulina, la cual provoca hiperglucemia, un conjunto de anomalías metabólicas debidas a las alteraciones hormonales y una serie de complicaciones a largo plazo que afectan la mayor parte de aparatos y sistemas. (1, 2).

METABOLISMO INTERMEDIO NORMAL

Debido a que la diabetes mellitus se caracteriza por alteraciones de los principales combustibles del metabolismo (carbohidratos, grasas y proteínas), y como se asocia con trastornos primarios y secundarios de la secreción de diversas hormonas se describe una breve revisión de la fisiología normal de estos sustratos y hormonas.

1. Metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. (1, 5, 6, 7, 8)

Las necesidades de energía del cuerpo suelen satisfacerse por los alimentos ingeridos. En relación a los carbohidratos sabemos que a pesar de las formas y origen diverso de éstos, los productos finales de la digestión absorbidos en el intestino son las hexosas, siendo por mucho la glucosa el azúcar más simple e importante.

En el interior de la célula existe muy poca glucosa libre, debido a que es convertida en glucosa-6-fosfato por la actividad

enzimática de hexocinasa y de glucocinasa; los principales caminos que puede seguir ahí son:

- 1) Almacenamiento como glucógeno
- 2) Glucólisis anaerobia
- 3) Oxidación por la vía de los ácidos tricarbónicos, aerobio o en menor grado por la de las pentosas.
- 4) Conversión en ácidos grasos y
- 5) Liberación desde las células como glucosa.

Lo anterior se muestra en la figura 1.

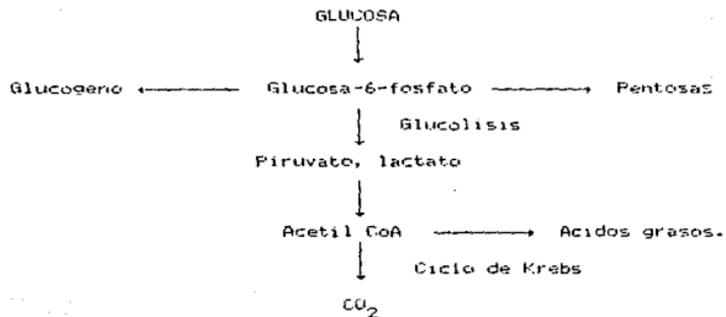


Fig. 1. Posibles rutas que sigue la glucosa en el interior de la célula.

Las fases anabólicas y catabólicas del metabolismo están determinadas por hormonas. La insulina es la hormona anabólica primaria en tanto que el aumento del nivel del glucagón es característico de la fase catabólica.

A. FASE ANABOLICA

Después de la ingestión de carbohidratos, los azúcares absorbidos penetran en la vena porta y se transportan al hígado, (en respuesta al aumento de glucosa plasmática, se secreta insulina en las células B del páncreas), una vez que llega al hígado, más de la mitad de la glucosa es captada y se almacena como glucógeno (glucogénesis).

El aumento de los niveles de insulina además de incrementar la transformación de glucosa en glucógeno en el hígado, va a facilitar su penetración en el músculo y en el tejido adiposo. En el músculo, una parte de la glucosa se oxida durante la glucólisis para formar piruvato, e ingresa en la mitocondria para producir ATP en el ciclo de Krebs, el resto se almacena como glucógeno.

Tanto en hígado como en tejido adiposo, la glucosa puede transformarse también en grasa, después de convertirse en citrato en la mitocondria. Los ácidos grasos así transformados se esterifican con glicerol para formar triacilglicéridos.

Los aminoácidos que se obtienen de las proteínas ingeridas, también pasan inicialmente por el hígado a través de la vena porta; éstos estimulan la liberación de insulina y glucagón a

partir del páncreas. El hígado en forma selectiva libera una mezcla de aminoácidos enriquecida con aminoácidos de cadena ramificada (en especial leucina), lo que estimula la síntesis de proteínas en el músculo.

En las células de la mucosa intestinal, se sintetizan triacilglicéridos después de la absorción de ácidos grasos de cadena larga en el aparato digestivo, posteriormente estos triacilglicéridos son empacados en quilomicrones, los cuales a través de los conductos linfáticos llegan a la circulación general, sitio en el cual por acción de la lipasa de lipoproteína proveniente de tejido adiposo y de capilares musculares, son convertidos en ácidos grasos libres, los cuales pueden ser utilizados para obtener energía o bien se esterifican de nuevo para almacenarse en forma de triacilglicéridos.

En el tejido adiposo, la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos y la formación de triacilglicéridos e inhibe la lipólisis.

B. FASE CATABOLICA

La fase catabólica suele comenzar en forma gradual varias horas después de la ingestión del alimento, observándose con claridad por los cambios que ocurren después de un ayuno de 10 a 12 h durante la noche. Dado que el sistema nervioso central puede usar sólo glucosa o cuerpos cetónicos como fuente de energía en la fase inicial durante el ayuno debe conservarse glucosa plasmática, para lo cual el hígado libera glucosa derivada del

glucógeno (glucogenolisis) y luego forma glucosa a partir de precursores (gluconeogénesis). Suele haber glucógeno suficiente almacenado en el hígado para conservar la glucosa plasmática solo durante 12 ó 24 horas. Fig. 2.

Los sustratos gluconeogénicos son: lactato, que se produce por glucogenólisis muscular; glicerol, que se deriva de la lipólisis en el tejido adiposo; y como sustrato principal se usan los aminoácidos del músculo, la alanina es el aminoácido principal que se usa en hígado, mientras que la glutamina es el sustrato más importante del riñón.

Al disminuir la glucosa plasmática durante el ayuno, se reducen los niveles de insulina y aumentan los niveles de glucagón, lo que estimula la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis. (Al provocarse con rapidez la hipoglucemia, la adrenalina también funciona como hormona importante de contrarregulación, que complementa el efecto del glucagón). (11)

Durante la fase catabólica, los triacilglicéridos del tejido adiposo se hidrolizan para formar ácidos grasos libres y glicerol, por medio de una lipasa intracelular diferente de la lipasa de lipoproteínas del endotelio capilar. La insulina inhibe la enzima, mientras que las catecolaminas incrementan su actividad. Si hay disminución del tejido adiposo o los ácidos grasos no se pueden oxidar en forma normal, las reservas menos abundantes de proteína deben usarse como fuente única de energía para impedir la hipoglucemia.

Dado que el cerebro en ayuno prolongado, puede utilizar

cuerpos cetónicos como fuente de energía, la formación de estos es vital y está regulada por hormonas de la fase catabólica; así, con la disminución de los niveles de insulina desaparece el bloqueo de la lipólisis en el tejido adiposo, lo cual asegura el suministro de ácidos grasos al hígado, el cual los metaboliza para formar acetil CoA en la mitocondria.

Con el aumento de los niveles de glucagon se inhibe la formación de malonil CoA y se incrementan los niveles de carnitina, facilitándose así, el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria, la oxidación excesiva de estos produce exceso de acetil-CoA que no se consume por el hígado, convirtiéndose en cuerpos cetónicos.

GLUCOSA, COMBUSTIBLE METABOLICO PRINCIPAL

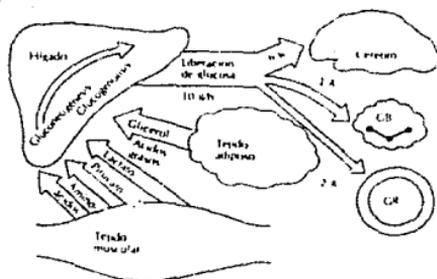


Fig. 2. Dado que el cerebro requiere glucosa como combustible metabólico principal, los niveles de insulina disminuyen de tal modo que es muy escasa la cantidad de glucosa transferida al músculo y al tejido adiposo desde la sangre. Existe una transferencia pasiva al cerebro de aproximadamente 6 gramos de glucosa por hora, y una cantidad moderada es utilizada por los eritrocitos y los leucocitos. (8)

CLASIFICACION DE LA DIABETES MELLITUS (22, 24)

El problema para determinar la verdadera frecuencia de la diabetes mellitus en la población general se debe a la amplia variación de los criterios que se usan para establecer el diagnóstico.

Por ello a continuación se presentan los criterios que el National Institutes of Health ha propuesto para la clasificación y diagnóstico de diabetes mellitus y otras categorías de intolerancia a la glucosa, con el fin de que estos se unifiquen en todos los sitios donde se estudie dicha enfermedad.

1. Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (IDDM) ó Tipo I

- Insulino dependiente
- Propensión a cetosis
- Puede presentarse a cualquier edad
- No designarla como juvenil

2. Diabetes Mellitus no Insulino Dependiente (NIDDM) ó Tipo II

- No insulino dependiente
- Sin propensión a cetosis
- Heterogénea, puede ser subdividida a causa de obesidad y no obesidad, por terapia, otras.

3. Diabetes asociada con ciertas condiciones y síndromes

- Secundaria a otros desórdenes
- Esta subclase ha sido dividida de acuerdo al conocimiento o sospecha de relaciones etiológicas
 - a. Enfermedades pancreáticas
 - b. Hormonal
 - c. Provocada por medicamentos
 - d. Receptores anormales de insulina
 - e. Asociada con síndromes genéticos complejos

4. Diabetes Gestacional

Término reservado a mujeres que desarrollan intolerancia a la glucosa durante el embarazo

5. Trastorno de Tolerancia a la Glucosa

- Concentración de glucosa en sangre, intermedia entre lo considerado "normal" y "diabético"
- No denominarla diabetes química, latente, asintomática o subclínica

6. Anormalidad Previa de Tolerancia a la Glucosa

- Espontánea o causada por una hiperglucemia transitoria
- No denominarla prediabetes

7. Anormalidad Potencial de Tolerancia a la Glucosa

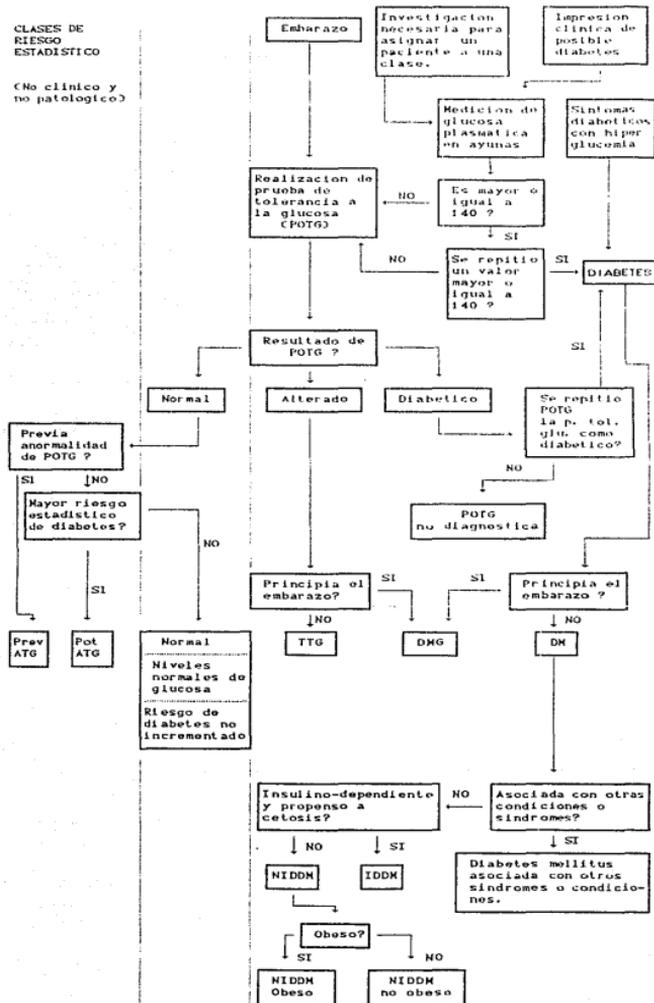
- Individuos con riesgo
- No denominarla prediabetes

PROCEDIMIENTO PARA CLASIFICAR A INDIVIDUOS DIABETICOS

CLASES CLINICAS

CLASES DE RIESGO ESTADISTICO

(No clinico y no patologico)



Donde:

POGT

TTG

DMG

DM

Prev ATG

Pot ATG

NIDDM

IDDM

Prueba oral de tolerancia a la glucosa

Trastorno de tolerancia a la glucosa

Diabetes mellitus gestacional

Diabetes mellitus

Previa anomaliam de tolerancia a la glucosa

Potencial " " " "

Diabetes mellitus no insulino dependiente

Diabetes mellitus insulino dependiente

DIAGNOSTICO

Los criterios que utiliza el clínico para el diagnóstico de la diabetes, se basan en la demostración de hiperglucemia, mediante la determinación de glucosa plasmática en ayunas o con la prueba de tolerancia a la glucosa. (8, 9, 22, 24)

A) En adultos

Se hace el diagnóstico de diabetes en adultos no embarazados cuando:

- Los individuos muestran los síntomas clásicos de la diabetes e hiperglucemia.
- Las concentraciones de glucosa plasmática venosa en ayuno son mayores o iguales a 140 mg/dl (7.8 mmol/L) en más de una ocasión.
- La concentración de glucosa plasmática en ayuno es menor a 140 mg/dl (7.8 mmol/L) pero se observan valores mayores o iguales a 200 mg/dl (11.1 mmol/L) 2 horas después de la ingestión de glucosa en la prueba oral de tolerancia a la glucosa o también si alcanza estos valores entre el tiempo cero y las 2 horas de la prueba.

B) En niños.

El diagnóstico de diabetes en niños puede hacerse cuando:

- Hay existencia de los síntomas clásicos de diabetes (poliuria, polidipsia, cetonuria, glucosuria) y la

determinación al azar de glucosa plasmática es mayor de 200 mg/dl (11.1 mmol/L)

En estos individuos no se requiere efectuar la prueba oral de tolerancia a la glucosa para efectuar el diagnóstico. Además, en niños asintomáticos y que no presentan glucosuria, la prueba de rutina de tolerancia a la glucosa no es indicativa para la detección o diagnóstico de diabetes.

El diagnóstico de la diabetes en niños a los que se les hizo la prueba oral de tolerancia a la glucosa, únicamente se hace si:

- La glucosa plasmática en ayuno es mayor de 140 mg/dl (7.8 mmol/L).
- Los valores de glucosa a las 2 horas son mayores o iguales a 200 mg/dl (11.1 mmol/L).
- Los valores entre el tiempo cero y las 2 horas son también mayores o iguales a 200 mg/dl (11.1 mmol/L).

En niños, se designa el trastorno de tolerancia a la glucosa cuando:

- Los valores de glucosa plasmática en ayuno son menores de 140 mg/dl (7.8 mmol/L)
- Los valores de glucosa plasmática a las 2 horas de ingerida la glucosa (prueba oral de tolerancia a la glucosa) son mayores de 140 mg/dl (7.8 mmol/L) y
- Los valores a las 2 horas son mayores de 200 mg/dl (11.1 mmol/L).

PRUEBA ORAL DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Para estandarizar la prueba oral de tolerancia a la glucosa, se deben seguir las siguientes recomendaciones: (21 - 23).

1. La prueba debe hacerse en la mañana.
2. El individuo no debera haber tenido una dieta restringida cuando menos tres dias antes de la prueba (dieta mayor o igual a 150 g de carbohidratos/día).
3. Es necesario que el individuo tenga tres dias de actividad antes de efectuar la prueba.
4. El sujeto debe estar en ayuno minimo de 10 horas pero no mayor a 16 horas. El agua es permitida durante este periodo.
5. El sujeto debe permanecer sentado y no fumar durante la prueba.
6. La prueba unicamente debe hacerse a pacientes "sanos", ambulantes y que no esten bajo tratamiento con fármacos que elevan la glucosa plasmática o bien que interfieran con la determinación de glucosa.
7. La carga de glucosa administrada por via oral debe ser de 75 g para adultos y de 1.75 g/kg de peso sin rebasar 75 g en niños.

Para efectuar la prueba oral de tolerancia a la glucosa se procede de la siguiente manera:

Se toma una muestra de sangre del paciente en ayuno, después

se le da a beber una solución de glucosa en agua con una concentración no mayor de 25 g/dl, la cual deberá ingerir en alrededor de 5 minutos. A continuación se toman muestras de sangre a intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

Para hacer la cuantificación de glucosa se prefiere utilizar como muestra plasma venoso, para lo cual se recomienda utilizar como anticoagulante 30 mg de NaF para 5.0 ml de sangre completa, separar el plasma de las células en un tiempo no mayor de 4 horas después de haber obtenido la muestra y efectuar el análisis lo más rápidamente posible.

La interpretación de los resultados obtenidos a las 2 horas de iniciada la prueba oral de tolerancia a la glucosa se hace de la siguiente manera:

	CONCENTRACION DE GLUCOSA
Diabetes	200 mg/dl (11.1 mmol/L)
Normal	140 mg/dl (7.8 mmol/L)
Trastorno de tolerancia a la glucosa.	140 - 200 mg/dl (7.8 - 11.1 mmol/L)

Los métodos que se recomienda usar para la determinación de glucosa son:

- Glucosa - oxidasa
- Hexocinasa
- Orto-toluidina
- Ferricianuro (Autoanalizador)
- Neocuproina (Autoanalizador)

DIABETES GESTACIONAL

Los miembros del Instituto Nacional de Salud (NIH), no han comunicado recomendaciones nuevas para el diagnóstico de diabetes gestacional, por lo cual, los criterios utilizados son los establecidos en 1964 por O'Sullivan y Mahan.

Se diagnostica diabetes gestacional, cuando ocurren o se rebasan dos o más de las cifras siguientes de glucosa en plasma, con una carga oral de 100 g de glucosa.

En ayuno	105 mg/dl	(5.8 mmol/L)
1 hora	190 mg/dl	(10.6 mmol/L)
2 horas	165 mg/dl	(9.2 mmol/L)
3 horas	145 mg/dl	(8.1 mmol/L)

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LA DIABETES DEPENDIENTE DE INSULINA (IDDM o TIPO I), DE LA NO DEPENDIENTE DE INSULINA (NIDDM o TIPO II) Y OTRAS CATEGORIAS DE INTOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Clase	Factores asociados	Características clínicas	Criterios diagnósticos
IDDM o Tipo I	Las evidencias sugieren factores genéticos y ambientales o adquiridos, asociación con ciertos tipos HLA y respuesta inmune anormal incluyendo reacciones autoinmunes.	Las personas de esta subclase son dependientes de insulina para prolongar la cetoacidosis y preservar la vida, aunque puede haber en la historia natural de la enfermedad periodos no insulino-dependientes, no cetóticos. Preponderantemente, se presenta en la juventud, pero puede detectarse a cualquier edad. Es caracterizada por insulinoopenia. Los anticuerpos contra las células B del páncreas, están presentes frecuentemente.	El diagnóstico de diabetes en adultos debe basarse en: 1) Elevación inequívoca de la concentración plasmática de glucosa junto con los síntomas clásicos de diabetes, o 2) Concentración elevada de glucosa plasmática en ayunas, en más de una ocasión, o 3) Concentración elevada de glucosa plasmática después de una carga oral de glucosa, en más de una ocasión. El diagnóstico de diabetes en niños requiere de 1) o 2) y 3).

Clase	Factores asociados	Características clínicas	Criterios diagnósticos
NIDDM o Tipo II	<p>Hay probablemente múltiples etiologías para esta clase, la consecuencia común es algún trastorno del metabolismo de carbohidratos. La evidencia de agregación familiar de diabetes implica factores genéticos; esta clase incluye diabetes de niños y adultos en los cuales la herencia ha sido establecida claramente. Los factores ambientales sumados a la susceptibilidad genética se encuentran involucrados en la NIDDM. La obesidad se considera como factor etiológico y se recomienda tomarla en cuenta para dividir a la NIDDM en dos subclases de acuerdo a la presencia o ausencia de obesidad.</p>	<p>Las personas de esta subclase son no insulino dependientes o propensas a cetosis, aunque pueden utilizar insulina para corregir los síntomas o la hiperglucemia persistente; pueden desarrollar cetosis bajo ciertas condiciones especiales tales como infección o estrés. Los niveles de insulina pueden ser normales, altos o bajos. En la mayoría de los casos se presenta después de los 40 años, pero se sabe que puede aparecer a cualquier edad. Del 60 al 90 % de sujetos con NIDDM son obesos y constituyen un subtipo de NIDDM, en esos pacientes la tolerancia a la glucosa puede mejorar por pérdida de peso; la hiperinsulinemia y la resistencia a insulina caracteriza a algunos pacientes de este subtipo.</p>	<p>Los criterios diagnósticos empleados para este tipo de diabetes, son los mismos que se emplean para IDDM.</p>
1. NIDDM de no obesos.			
2. NIDDM de obesos.			

Clase	Factores asociados	Características clínicas	Criterios diagnósticos
Otros tipos, incluyendo diabetes mellitus asociada a ciertas condiciones y síndromes.	Esta subclase contiene una variedad de tipos de diabetes, en algunos de los cuales es conocida la relación etiológica (por ejemplo, diabetes secundaria a enfermedad pancreática, enfermedad endocrina o administración de ciertos medicamentos). En otros se sospecha una relación etiológica, debido a la alta frecuencia de asociación de la diabetes con un síndrome o condición (por ejemplo, diferentes síndromes genéticos).	En adición a la presencia de condiciones o síndromes específicos, también está presente la diabetes mellitus.	Para clasificar a un individuo en la subclase de otros tipos, debe presentarse: a) Diabetes y la b) Presencia de un síndrome o condición asociado.
1. Enfermedad pancreática.			
2. Hormonal			
3. Inducida por medicamentos o agentes químicos.			
4. Anormalidades en receptores de insulina.			
5. Ciertos síndromes genéticos.			
6. Otros tipos.			

Clase	Factores asociados	Características clínicas	Criterios diagnósticos
Trastorno de tolerancia a la glucosa. (TTG)	La intolerancia moderada a la glucosa en sujetos de esta clase puede ser atribuible a una variación normal de tolerancia a la glucosa dentro de una población. En algunos sujetos, el trastorno de tolerancia a la glucosa puede representar una etapa en el desarrollo de NIDDM o IDDM, aunque la mayoría de las personas con trastorno de tolerancia a la glucosa, permanecen en esta clase por varios años o regresan a una tolerancia normal a la glucosa.	Los niveles de glucosa en ayuno no son diagnósticos y la concentración de glucosa en sangre está entre lo considerado normal y diabético. Algunos estudios han mostrado incremento de síntomas de enfermedad arterial y electrocardiogramas anormales, así como aumento a la susceptibilidad de padecer enfermedad aterosclerótica asociada con el conocimiento de factores de riesgo, incluyendo hipertensión, hiperlipidemia, adiposidad y la edad.	Si después de la determinación de glucosa plasmática en ayuno la concentración del azúcar es menor a 140 mg/dl, el diagnóstico se basa en la prueba oral de tolerancia a la glucosa.
1. TTG de no obesos.			
2. TTG de obesos.			
3. TTG asociada con ciertos síndromes; los cuales pueden ser:			
<ul style="list-style-type: none"> a) Enfermedad pancreática. b) Hormonal c) Inducida por medicamentos o agentes químicos. d) Receptores anormales de insulina. e) Ciertos síndromes genéticos. 			

Clase	Factores asociados	Características clínicas	Criterios diagnósticos
Diabetes gestacional.	<p>La intolerancia a la glucosa que se presenta en el embarazo, se cree que es debida a cambios complejos metabólicos y hormonales que no son entendidos por completo.</p> <p>La resistencia a la insulina puede ser responsable en parte de la diabetes gestacional.</p>	<p>La intolerancia a la glucosa es reconocida durante el embarazo. Así, las diabéticas que se embarazan no se incluyen en esta clase.</p> <p>Hay asociación con el aumento de complicaciones perinatales y con el aumento de riesgos por la progresión de la diabetes dentro de los 5 - 10 años siguientes al parto.</p> <p>Requiere reclasificación después que el embarazo ha terminado, dentro de anomalía previa de tolerancia a la glucosa, diabetes mellitus o trastorno de tolerancia a la glucosa.</p>	<p>El diagnóstico está basado en la prueba oral de tolerancia a la glucosa.</p> <p>Los criterios utilizados son de O' Sullivan y Mahan (1964).</p> <p>En otras partes del mundo se utilizan otros criterios diagnósticos.</p>

Clase	Descripción
Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa	<p data-bbox="739 215 1057 227">Clases estadísticas de riesgo</p> <p data-bbox="628 263 1166 360">Esta clase es restringida a aquellas personas quienes ahora tienen tolerancia normal a la glucosa, pero que tuvieron hiperglucemia diabética o bien trastorno de tolerancia a la glucosa, ya sea espontáneamente o en respuesta a un estímulo identificable.</p> <p data-bbox="628 363 1166 493">Individuos que han tenido diabetes gestacional y regresan a una tolerancia normal a la glucosa después del parto, forman una subclase de anormalidad previa de tolerancia a la glucosa. Otro grupo pequeño pero importante de individuos es esta clase, son los que fueron diabéticos por obesidad y cuya tolerancia a la glucosa volvió a ser normal después de bajar de peso.</p> <p data-bbox="628 496 1166 557">Estudios clínicos han demostrado que muchos pacientes bajo estrés metabólico agudo debido a trauma o lesión experimentan hiperglucemia transitoria.</p> <p data-bbox="628 560 1166 737">Aparte de los estudios en personas que padecieron diabetes gestacional, se ha hecho una reducida investigación sistemática a personas con susceptibilidad tardía que han mostrado intolerancia a la glucosa para desarrollar diabetes. Sin embargo, es factible que esto se incremente y que sea útil incluir por separado a todos aquellos sujetos con antecedentes de intolerancia a la glucosa, ahora normal, en esta clase de "Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa".</p>

Clase	Descripción
Anormalidad potencial de tolerancia a la glucosa.	<p data-bbox="735 213 1051 227">Clases estadísticas de riesgo</p> <p data-bbox="628 246 1147 308">Esta clase incluye personas que nunca han presentado tolerancia anormal a la glucosa, pero quienes tienen sustancialmente el riesgo de desarrollar diabetes.</p> <p data-bbox="628 311 1147 339">Los individuos que tienen riesgo incrementado de IDDM, incluyen: (en orden decreciente de riesgo)</p> <ul data-bbox="628 342 1160 438" style="list-style-type: none"> - Personas con anticuerpos contra células B del páncreas. - Gemelo monocigoto de un diabético IDDM. - Hermano de un diabético IDDM, especialmente uno con haplotipos HLA idénticos. - Hijo de un IDDM diabético. <p data-bbox="628 456 1147 519">Los individuos que tienen riesgo incrementado de padecer NIDDM, incluyen: (en orden decreciente de riesgo)</p> <ul data-bbox="628 522 1147 650" style="list-style-type: none"> - Un gemelo monocigoto del NIDDM diabético. - Un pariente de primer grado de un NIDDM diabético (hermano, padre, hijo). - Madre de un neonato que pesa más de 4 kg. - Individuos obesos. - Miembros de un grupo racial o étnico con alto riesgo de diabetes. (por ejemplo, un número de tribus indias americanas). <p data-bbox="628 669 1147 697">El grado de riesgo para cualquiera de estas circunstancias aun no ha sido bien establecido.</p>

METODOLOGIA PARA LA VALORACION DE CUERPOS CETONICOS

La búsqueda de cetonuria está registrada desde 1865 con la prueba de Gerhardt, la cual detecta ácido acetoacético.

En 1942 Friedmann y colaboradores revisaron las diferentes maneras en las cuales la reacción de nitroprusiato de sodio puede ser usada para detectar cuerpos cetónicos y pusieron atención a la diversidad de métodos y sensibilidad de los mismos.

Stanley (1943) y King (1951) opinaron que la reacción de color del nitroprusiato con los cuerpos cetónicos se debe principalmente a la presencia de acetona. Mientras que Harrison en 1947 indicó que se debe tanto a la acetona como al ácido acetoacético.

Todas las investigaciones de este tema están de acuerdo con que el ácido beta-hidroxibutírico no da reacción con el nitroprusiato de sodio. (33, 36)

CETOSIS

Los cuerpos cetónicos que incluyen ácido acetoacético, acetona y ácido beta-hidroxibutírico se forman durante el metabolismo de ácidos grasos en el hígado.

La concentración de cuerpos cetónicos totales en la sangre de mamíferos bien alimentados no excede normalmente de 5 a 30 mg/L como equivalentes de ácido acetoacético y acetona (3, 36). Cantidades más altas que las normales, presentes en la sangre o en la orina constituyen la cetonemia o la cetonuria, respectivamente.

A este estado se le denomina cetosis, el cual en la mayoría de las veces esta relacionado con un descontrol metabólico como sucede en la diabetes mellitus.

En la cetonuria las proporciones de los cuerpos cetónicos son: ácido acetoacético 20 %; acetona 2 % y ácido beta-hidroxibutírico 78 % (26, 38, 39).

INVESTIGACION CUALITATIVA DE CUERPOS CETONICOS.

1. REACCION DE LEGAL (1883)

La acetona y el acido acetoacético reaccionan con una solución saturada de nitroprusiato de sodio en medio alcalino (para lo cual se usa una solución de hidróxido de sodio al 10 %), produciendo una coloración roja violácea (34).

2. REACCION DE IMBERT

El nitroprusiato de sodio disuelto en acido reacciona en medio alcalino con el acido acetoacético y con la acetona, formándose un anillo de color violáceo en el tubo de reacción. (34)

Esta reacción es una modificación de la de Legal, se utiliza amoníaco como medio alcalino y tiene como ventaja la mejor conservación del nitroprusiato de sodio.

3. REACCION DE FROMMER

La acetona reacciona con una solución de aldehído salicílico en medio alcalino y bajo calor, produciéndose una coloración anaranjada que vira a rojo obscuro. (34, 38)

Esta reacción es positiva sólo para la acetona.

4. REACCION DE GERHARDT (1865)

El acido acetoacético produce color rojo cerezo o rojo vino (conocido como rojo Bordeaux) con una solución de cloruro férrico. (33, 36, 38, 39)

Esta reacción es positiva solo para el ácido acetoacético.

Esta prueba tiene baja sensibilidad (25 - 50 mg/dl) para el ácido acetoacético.

5. REACCIÓN DE HART

La muestra a examinar se hierve con objeto de eliminar la acetona y el ácido acetoacético, para hacer la determinación de ácido beta-hidroxibutírico.

Después del calentamiento se restituye con agua al volumen original y a continuación se agrega peróxido de hidrógeno al tubo de reacción y se hace en el la reacción de Legal. Si la reacción es positiva indica la presencia de ácido beta-hidroxibutírico que fue oxidado a acetona.

Esta prueba resulta ser de gran utilidad cuando se requiere conocer la presencia de ácido beta-hidroxibutírico en pacientes con cetoacidosis diabética.

6. PRUEBA DE ROTHERA (1908)

Tanto la acetona como el ácido acetoacético producen un color púrpura con el nitroprusiato de sodio alcalino. La prueba permite reconocer acetona aun en dilución 1 a 100 y el ácido acetoacético en dilución 1 a 1250. (33, 35, 37, 38)

No se conoce la estructura del complejo resultante; la reacción que se cree se lleva a cabo es la siguiente:



Donde R = CH₃ (acetona) o -CH₂-COOH (ácido acetoacético)

Esta prueba está basada en la reacción de Legal y se considera como un método semicuantitativo para la detección de cuerpos cetónicos.

La reacción no es específica, sin embargo, el ácido acetoacético y la acetona son prácticamente las únicas sustancias con grupo cetónico enolizable que se presentan en la orina.

La prueba de Rothera se puede efectuar en orina, suero o plasma y la interpretación de los resultados es la siguiente: (33, 38)

COLOR DE COMPARACION	CONCENTRACION DE ACIDO ACETOACETICO	CONCENTRACION DE ACETONA
Trazas de color púrpura	5 mg/dl	20 mg/dl
Moderadamente púrpura	30 mg/dl	250 mg/dl
Fuertemente púrpura	80 mg/dl	800 mg/dl

La principal desventaja que presenta esta prueba es que no puede detectar ácido beta-hidroxiabútirico y es de 5 a 10 veces menos sensible para acetona que para ácido acetoacético.

Se obtienen resultados falsos positivos con muestras de personas tratadas con dosis altas de L- dopa.

La principal ventaja que presenta es su relativa facilidad lo cual la hace la prueba rápida de selección para cetonas.

MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE CUERPOS CETONICOS

1. MÉTODO DE PRECIPITACION.

Se precipita la acetona con una solución alcalina que contiene cianuro mercurico, el precipitado se redisuelve con ácido nítrico y se determina el mercurio por titulación con sulfocianuro. (38)

Este método presenta como desventaja que sólo mide acetona, además de ser sumamente laborioso.

2. MÉTODO DE SHIPLEY Y DUMM.

En este método se hacen diferentes diluciones de la orina, las cuales se hacen reaccionar con Reactivo de Rothera, la última dilución positiva multiplicada por el factor de dilución dará aproximadamente el contenido de cuerpos cetónicos en mg/dl contenidos en la muestra analizada. (34)

3. MÉTODO DE ACETONA EN SANGRE. (HENRY, 1964)

Mediante calor, se desplazan a una solución alcalina del aldehído aromático vainillina, tanto la acetona presente inicialmente en la muestra como la liberada por desdoblamiento de

ácido acetoacético; se forma un compuesto pardo rojizo que puede ser divainillilacetona. (35, 38, 44)

Este color se compara con un patrón de acetona en condiciones idénticas.

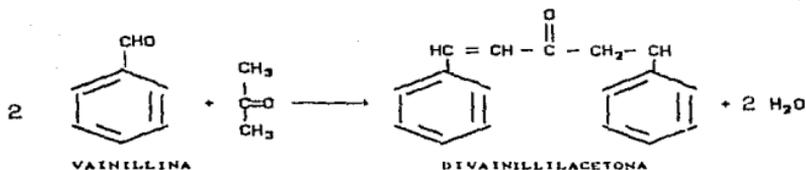


Fig. 3. Reacción de Acetona con Vainillina

El método de la vainillina es cuantitativo y bastante específico pero solo detecta acetona, su precisión es de 15 % para niveles de acetona dentro de los límites normales.

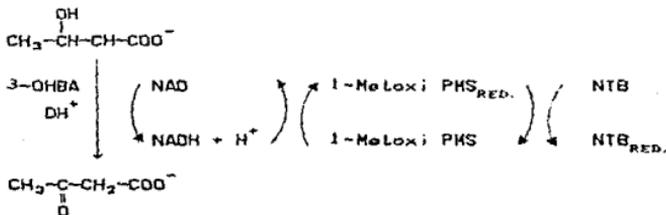
4. DETERMINACION DE LA ACETONA Y DEL ACIDO BETA-HIDROXIBUTIRICO EN LA SANGRE.

De una muestra de suero desproteinizada, se destila primero la acetona preformada, luego la procedente del ácido acetoacético y por último la acetona resultante de la oxidación del ácido beta-hidroxibutirico con ácido crómico. La acetona se determina yodometricamente. (38, 40)

Es un procedimiento sumamente laborioso, que incluye filtración, destilación de la sangre y titulación de la acetona con tiosulfato de sodio usando como indicador almidón.

5. METODO ENZIMATICO PARA LA DETERMINACION DE BETA-HIDROXIBUTIRATO

El ácido beta-hidroxibutírico es convertido enzimáticamente en ácido acetoacético por medio de la enzima 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y de la coenzima NAD; el NADH generado reduce el metasulfato de fenazina, el cual al oxidarse espontáneamente cede su protón al nitroazul de tetrazolium oxidado, dicho colorante reducido desarrolla un color púrpura que se mide a 600 nm. (38, 41, 43)



Donde PHS = metasulfato de fenazina

NTB = nitroazul de tetrazolium

Este método es específico para el ácido beta-hidroxibutírico y por lo tanto resulta ideal para cuantificar dicho ácido en el plasma o suero.

Presenta como principal desventaja que el ácido láctico produce interferencias con el color, además de ser un método muy costoso.

LA QUIMICA SECA EN LA DETERMINACION DE CUERPOS CETONICOS

Varias casas comerciales han desarrollado en los últimos años reactivos denominados "Reactivos de Química Seca", los cuales contienen los componentes necesarios en forma de tabletas o de tiras reactivas para la determinación rápida (30 seg - 2 min), cualitativa o semicuantitativa de uno o varios metabolitos.

Las "tabletas reactivas" permiten determinar un solo metabolito, mientras que las "tiras reactivas" tienen zonas de prueba para determinar uno o de 2 a 9 metabolitos.

La elección del tipo de tira o pastilla reactiva que se utilizan, depende de los metabolitos que se requieren determinar; las que a nosotros nos interesan son las que miden cuerpos cetónicos y glucosa ya que son los parámetros utilizados en el seguimiento de pacientes diabéticos.

USO DE TIRAS REACTIVAS PARA LA INVESTIGACION DE CUERPOS CETONICOS.

La prueba está basada en la reacción de nitroprusiato sódico.

La tira plástica tiene en el extremo una zona de celulosa fijada mediante un reticulado finísimo, dicha zona contiene nitroprusiato sódico, glicina y un amortiguador alcalino.

El Ácido acetoacético y la acetona, en medio alcalino forman un complejo colorido violeta con el nitroprusiato. La lactosa sirve para intensificar la coloración.

Los resultados positivos se observan a través del cambio de color beige a violeta y se compara con la escala de colores que proporcionan los fabricantes. (36, 37, 39, 42)

Sensibilidad. El reactivo permite detectar cantidades de 5 a 10 mg/dl de ácido acetoacético en orina. la prueba responde mucho más débilmente a la acetona.

Especificidad. La reacción del nitroprusiato no es específica para acetona y ácido acetoacético, sin embargo estas sustancias son las únicas con grupos cetónicos enolizables que se presentan en la orina.

Estabilidad. En general las tiras son sensibles a la humedad, si después de retirar las tiras del envase este se cierra inmediatamente la estabilidad se mantendrá hasta la fecha de caducidad.

USO DE TABLETAS ACETEST^R PARA LA INVESTIGACION DE CUERPOS CETONICOS.

En la actualidad se dispone de tabletas denominadas Acetest^R las cuales contienen nitroprusiato de sodio, glicina y un amortiguador alcalino. (33, 36, 37, 38)

Estas tabletas pueden emplearse en muestras de plasma, suero u orina para la identificación de acetona y ácido acetoacético.

La casa comercial proporciona las indicaciones de la prueba y la escala de colores con la cual habrán de compararse los resultados.

La sensibilidad de Acetest^R permite detectar de 5 a 10 mg/dl de ácido acetoacético y de 20 a 25 mg/dl de acetona en orina.

La especificidad es la misma que la que proporciona el Reactivo de Rothera.

METODOLOGÍA PARA LA VALORACION DE GLUCOSA

A lo largo de los años se han desarrollado diversos métodos para la detección de la glucosa tanto en suero, plasma, sangre total como en orina, con el objeto de apoyar el diagnóstico y evaluar el tratamiento en pacientes diabéticos.

Los métodos desarrollados caen dentro de dos grupos: Químicos y Enzimáticos; los primeros se basan en las propiedades reductoras de la molécula de glucosa, mientras que los segundos se basan en la especificidad de algunas enzimas como la glucosa-oxidasa y la hexocinasa para reaccionar con la glucosa, por lo cual estos métodos resultan ser de elección para la determinación de dicho carbohidrato.

GLUCOSA SANGUINEA

En la actualidad sin importar el método que se utilice, se sabe que la muestra de elección para la determinación de glucosa es suero o plasma, libres de hemólisis. No se recomienda usar sangre completa porque las sustancias reductoras de los eritrocitos (sacáridos) producen interferencia, además, los valores de glucosa varían con el hematocrito, y es necesario usar un inhibidor de la glucólisis como fluoruro de sodio. (26)

MÉTODOS QUÍMICOS

En general las determinaciones químicas de glucosa, están basadas en sus propiedades reductoras; la glucosa es una aldohexosa, la cual se presenta formando un equilibrio entre la

forma aldehídica y la enediólica, esta última es la que da a la glucosa sus propiedades reductoras además de ser la estructura favorecida a pH fisiológico. Fig 4.

Otros azúcares como la manosa y la fructosa forman el mismo enediol, lo que representa una desventaja para los métodos en que se utiliza la propiedad reductora de la glucosa, ya que producen interferencias como sustancias reductoras y algunos reactivos involucrados son carcinogénicos (26), por lo cual tienden a dejar de utilizarse.

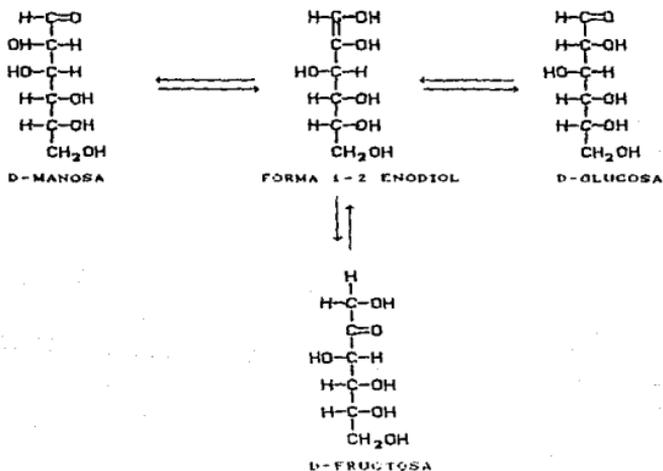


Fig. 4. Equilibrios que forma la glucosa

Los metodos utilizados son:

1. METODO DE FOLIN - WU (1920)

La glucosa presente en una muestra de sangre total tratada previamente con ácido tungstico (agente precipitante de proteínas) en presencia de una solución alcalina de cobre, reacciona con los iones cupricos (Cu^{++}) reduciéndolos a iones cuprosos.

Los iones cuprosos así producidos, en presencia de calor forman óxido cuproso (Cu_2O) el cual se mide por adición de un exceso de ácido fosfomolibáico, formándose azul de molibdeno que es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra. (8, 26)

Los constituyentes de los eritrocitos denominados sacaroides (glutación, ácido glucurónico, ergotioneína y ácido ascórbico) así como otros azúcares reductores también reducen el ión cuprico con lo cual se produce una sobrevaloración de la glucosa.

2. METODO DE SHAFFER - HARTAMANN (1921).

A una muestra de suero o plasma se le adiciona reactivo de cobre que contiene yoduro de potasio, después del calentamiento (durante el cual se forma óxido cuproso por el efecto reductor de la glucosa) la mezcla se acidifica y se libera yodo libre.

El óxido cuproso reacciona de inmediato con parte de este yodo formándose yoduro; se mide la cantidad de yodo restante mediante titulación con tiosulfato (empleando almidón como indicador), la diferencia del título que se obtiene entre el

problema y un blanco tratado en forma similar es proporcional a la cantidad de yodo transformado en yoduro por el óxido cuproso, y por lo tanto, a la cantidad de azúcares reductores iniciales. (9, 38).

3. METODO DE HOFFMAN (REACCION DEL FERRICIANURO ALCALINO)

La glucosa en medio alcalino produce la reducción del ferricianuro amarillo a ferrocianuro incoloro.

Inicialmente se medía con el fotómetro la disminución del color amarillo por producción de ferrocianuro incoloro y esto se correlacionaba con la concentración de glucosa.

Posteriormente en las décadas 1960-1970 se efectuaron adaptaciones para medir directamente el ferrocianuro producido; este último se hace reaccionar con un exceso de iones ferricos, para formar ferrocianuro ferrico, desarrollándose un color azul de prusia. (9, 26, 35)

4. METODO DE NELSON SOMOGYI (1944)

Este método es una modificación del Folin-Wu.

El principio es el mismo que el de Folin-Wu, solo que este autor precipita las proteínas con hidróxido de bario y sulfato de zinc del suero o plasma.

El ión cuproso formado por acción de la glucosa sobre las soluciones alcalinas de cobre se une al ácido arsenomolibdico y se cuantifica el color azul de molibdeno formado. (26, 27)

Aunque con este método se elimina la medición de sacaridos.

no se elimina la inespecificidad, ya que cualquier compuesto reductor produce la reacción.

5. METODO DE REDUCCION DEL COBRE (NEOCUPROINA)

La glucosa presente en una muestra de suero o plasma, reduce los iones cupricos a cuprosos.

La neocuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) puede ser reducida también por los iones cuprosos (Cu^+), formando un complejo intensamente colorido.

6. METODO DE LA ORTO-TOLUIDINA (DUBOWSKI, 1962)

Varias aminas aromáticas entre ellas la orto-toluidina se condensan en medio ácido y con calor, con el grupo aldehído de la glucosa para formar una glucosamina. El producto inicial de la reacción es un N- glucosido inestable, que está en equilibrio con la base de Schiff. Fig 5.

El color verde que aparece se mide e espectrofotométricamente.

(8. 26, 27, 38)

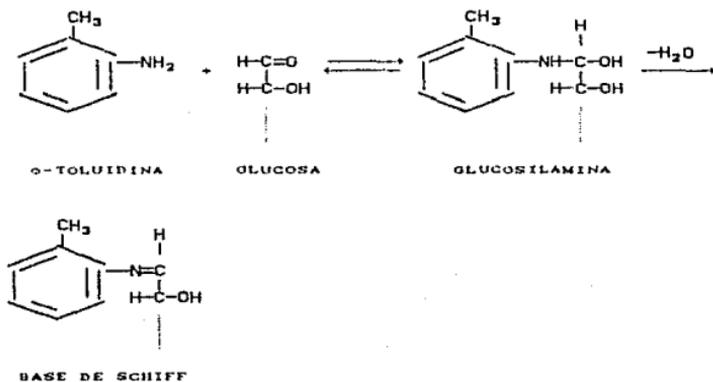


Fig. 5. Reaccion de glucosa con orto-toluidina

El método tiene como ventaja mostrar exactitud, sensibilidad y precisión relativamente buenas, además se puede usar en plasma, orina o L.C.R. sin tener que precipitar las proteínas.

Muestra como desventaja el que la orto-toluidina sea una

sustancia carcinogénica y además da interferencias con urea y otros azúcares especialmente con manosa y galactosa.

METODOS ENZIMATICOS

El uso de métodos enzimáticos para la determinación de glucosa sanguínea muestra mayor especificidad y sensibilidad comparados con los métodos químicos.

Estos métodos incluyen el uso de las siguientes enzimas: Glucosa oxidasa, Hexocinasa y Glucosa deshidrogenasa.

1. METODO DE LA GLUCOSA OXIDASA.

En general los diferentes métodos de glucosa oxidasa emplean una secuencia de dos reacciones enzimáticas, siendo la primera reacción la específica y la segunda la indicadora.

La glucosa oxidasa posee un grupo prostético de flavin-adenin-dinucleótido (FAD) el cual es el aceptor de hidrógeno inicial para la oxidación de la glucosa a gluconolactona, mientras el FAD reducido es reoxidado por el oxígeno molecular disuelto en la solución produciéndose peróxido de hidrógeno como resultado de la reacción.

En presencia de un exceso de peroxidasa y un cromógeno apropiado, el peróxido de hidrógeno se reduce rápidamente a agua y el cromógeno es oxidado a una sustancia colorida.

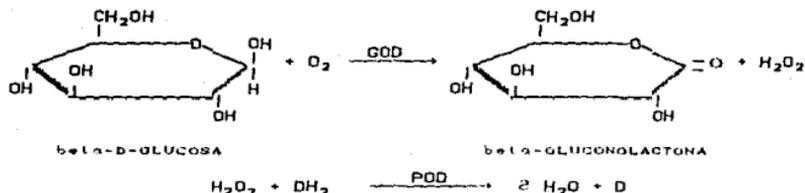


Fig. 6. Reacción que lleva a cabo la glucosa oxidasa.

Las sustancias cromogénicas más utilizadas incluyen: orto-toluidina, orto-dianisidina, 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona/N,N-dimetilanilina (MBTA/DMA) y fenilaminofenazona (PAP) conocida como reactivo de Trinder. (8, 26, 35, 38)

La glucosa oxidasa es altamente específica para la beta-D-glucosa por lo que cualquier cantidad de glucosa presente en la forma alfa debe transformarse en su forma beta antes de la reacción, para lo cual algunos equipos de trabajo traen incluida la enzima mutarrotasa, la que acelera el proceso.

Se ha observado que la glucosa oxidasa produce la oxidación significativa de la 2-desoxi-glucosa, mientras que la manosa y la ribosa se oxidan lentamente. (55, 42) Sin embargo, los resultados inespecíficos de la reacción se producen especialmente porque la reacción indicadora que se utiliza es una reacción redox y por tanto, inespecífica.

Así, muchos compuestos presentes en suero u orina como bilirrubina, ácido ascórbico y ácido úrico, son oxidados por la peroxidasa, la cual transfiere el átomo de oxígeno del peróxido de hidrógeno a dichas sustancias. La oxidación y con ello el cambio de color del cromógeno, no tiene lugar o bien tan solo después de que el competidor más potente se ha oxidado por completo.

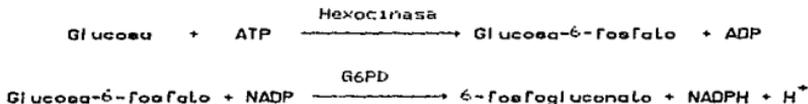
La ventaja que presenta el método es el ser sensible y reproducible.

2. METODO DE LA HEXOCINASA

El método de la hexocinasa al igual que el de la glucosa oxidasa son considerados los métodos de referencia para la determinación de glucosa. (8)

El método de la hexocinasa consiste de una secuencia de dos reacciones enzimáticas.

En la primera reacción la hexocinasa utilizando ATP como sustrato fosforila a las hexosas, la glucosa-6-fosfato producida reacciona con glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, dando una mol de NADPH por cada mol de glucosa oxidada. El aumento de NADPH producido así se determina espectrofotométricamente. (26, 35, 38)



Aunque otros azúcares de 6 carbonos pueden interferir en la

reacción de la hexocinasa, las concentraciones normales de estos no producen interferencia significativa.

3. METODO DE LA GLUCOSA DESHIDROGENASA

La Gluc-DH reacciona directamente con glucosa y transfiere el átomo de hidrogeno situado en el carbono 1 de la glucosa directamente al NAD.

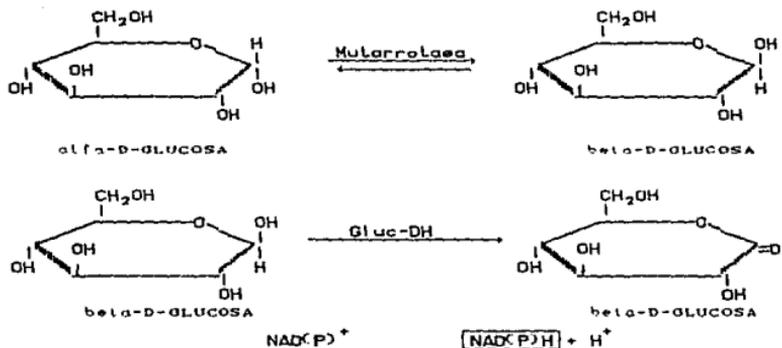


Fig. 7. Reacción que lleva a cabo la Glucosa Deshidrogenasa

La cantidad de NADH formada que se mide en el U.V., es directamente proporcional a la concentración de glucosa. (35, 45)

Este método resulta ser el primer procedimiento para la determinación de glucosa que hace posible la medida espectrofotométrica directa de la glucosa sin una segunda reacción indicadora.

La glucosa DH es específica para la beta-D-glucosa contenida en los líquidos corporales, por lo cual se requiere de la enzima mutarrotasa para que transforme a la alfa-D-glucosa en la forma beta-D-glucosa.

GLUCOSA URINARIA

Aunque comúnmente se menciona que la orina de un individuo normal no contiene glucosa, el estudio de metodologías enzimáticas ha puesto de manifiesto que aún en condiciones normales y con reabsorción tubular normal, a la orina final llega una pequeña cantidad de glucosa, aceptándose como valores límites hasta 30 mg/dl. (42)

La presencia de cantidades apreciables de glucosa en orina se define como glucosuria, la cual puede producirse por una disminución de la reabsorción de glucosa por parte de los tubulos renales (descenso del umbral renal), o por un incremento de la cantidad de dicho carbohidrato que llega a dichos tubulos (estado de hiperglucemia) o por ambos mecanismos asociados.

Aunque la determinación de glucosuria por si sola no sirve para diagnosticar diabetes, sirve como un signo guía, el cual aunado a hiperglucemia pueden sugerir dicha enfermedad por ser ambos patognomónicos de la diabetes mellitus.

PRUEBAS CUALITATIVAS PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA EN LA ORINA.

METODOS BIOLOGICOS.

1. PRUEBA DE FERMENTACION

Las levaduras activas fermentan la glucosa y la fructosa produciendo bióxido de carbono. No hay fermentación de la lactosa, la galactosa ni de pentosas.

De la muestra a analizar deben excluirse las bacterias (para lo cual se hierva la orina) pues éstas podrían fermentar azúcares no atacados por levaduras dando resultados falsos positivos.

Si existe glucosa, fructosa o ambos, el tubo de fermentación presenta una gran burbuja de CO_2 , a las 2 o 4 horas. (9, 39)

Es un método que requiere hasta 24 horas para la obtención de resultados; además se requiere realizar como prueba adicional la prueba de Selivanoff para descartar la presencia de fructosa (esta se basa en la formación de un color rojo al reaccionar la fructosa con resorcinol en medio ácido).

METODOS QUIMICOS

1. METODO DE FEHLING. (1848)

Se basa en la reducción de óxidos metálicos por acción de azúcares reductores.

Se mezclan cantidades de Reactivo de Fehling que contiene sulfato de cobre y tartrato doble de sodio y potasio con orina y se calienta la mezcla.

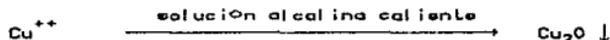
Si la orina contiene glucosa se reducirá la sal de cobre formando un precipitado color rojo o rojo amarillo. (27, 34)

El añadir tartrato a la solución alcalina de cobre evita la precipitación del hidróxido cuproso y del óxido cuproso.

Esta prueba además de ser cualitativa es inespecífica ya que cualquier compuesto reductor la da positiva.

2. METODO DE BENEDICT. (1911)

En una muestra de orina la glucosa presente reduce el reactivo alcalino azul de sulfato de cobre (Reactivo de Benedict) a un precipitado rojo de óxido cuproso, de acuerdo a la siguiente reacción. (26, 34, 37, 38)



Se forma un precipitado y color verde, amarillo o naranja, según la cantidad de glucosa y de otras sustancias reductoras presentes.

En este método Benedict cambió el tartrato por citrato y el hidróxido de potasio por carbonato de sodio, obteniéndose así un reactivo 10 veces más sensible que el de Fehling y algo "menos" influido por la reducción inespecífica de otras sustancias urinarias.

La sensibilidad de este método es de 50 a 80 mg de glucosa/dl.

3. METODO DE NYLANDER

Se aprovecha el poder reductor de la glucosa sobre una sal de

bismuto . La solución se oscurece si hay glucosa, debido a la precipitación del bismuto metálico. (34)

Para efectuar la prueba es necesario separar primero la albumina presente en la orina.

4. FORMACION DE OSAZONAS

La formación de osazonas se debe a que las sustancias que tienen un grupo carbonilo (aldosas o cetosas) reaccionan con la fenilhidracina para formar fenilhidrazonas, las cuales se combinan con el exceso de reactivo y fijan un segundo grupo fenilhidracina, con ello se forman cristales de osazona característicos. (6)

La prueba no es confiable si la concentración de sustancia reductora es menor de 250 a 500 mg/dl.

La principal desventaja que presenta este método es el hecho de que la glucosa, la fructosa y la manosa dan origen a la misma osazona.

PRUEBAS CUANTITATIVAS PARA LA DETERMINACION DE GLUCOSA EN LA ORINA

1. METODO DEL ACIDO DINITROSALICILICO. (Summer 1924)

En solución alcalina caliente, la glucosa reduce el ácido dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo. El color producido es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la solución.

La reacción obedece la ley de Beer cuando la concentración en la orina diluida es menor de 300 mg/dl.

Otras pruebas utilizadas para la cuantificación de glucosa en orina son:

2. Metodo de Fehling
3. Método de Benedict
4. Metodo de la orto-toluidina

Los fundamentos de estos ya fueron descritos.

LA QUIMICA SECA EN LA DETERMINACION DE GLUCOSA.

A continuación se describen las principales características de las tabletas y tiras reactivas que permiten determinar glucosa tanto en suero como en orina.

* Tiras reactivas

Las tiras reactivas destinadas a la detección de glucosa emplean el método de la glucosa oxidasa/peroxidasa.

En este método se emplea una doble reacción enzimática secuencial. Las diversas casas comerciales las distinguen utilizando diferentes cromógenos, amortiguadores y colorantes de fondo.

Constitución de la tira. La tira de plástico tiene en un extremo sólidamente fijada la zona de prueba con ayuda de un reticulado finísimo. Esta zona contiene las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, el cromógeno, el sistema amortiguador y el colorante de fondo. (26, 39, 48, 49, 50)

Especificidad. Puede atribuirse a la enzima glucosa oxidasa una especificidad casi absoluta, sin embargo, pueden producirse resultados inespecíficos porque la reacción indicadora es una reacción redox y por lo tanto inespecífica.

Es importante considerar que se pueden producir reacciones

reaccion redox y por lo tanto inespecifica.

Es importante considerar que se pueden producir reacciones negativas falsas por agentes inhibidores de las enzimas. además influye la temperatura y el tiempo de reacción.

* Prueba de reducción del cobre con tabletas (Clinitest^R).

La prueba de Benedict ha sido altamente comercializada, y se encuentra en el mercado con el nombre "Clinitest" ; dichas tabletas contienen sulfato de cobre, hidróxido de sodio, carbonato de sodio y ácido cítrico; las instrucciones de la prueba indican adicionar a un tubo de ensaye 5 gotas de orina y 10 de agua añadiendo a continuación una tableta. El hidróxido de sodio al reaccionar con el agua proporciona el calor que se requiere para que se lleve a cabo la reacción. El color desarrollado se compara con una escala de colores.

Las tiras reactivas y las tabletas son de gran utilidad, porque le permiten al paciente diabético evaluar niveles de glucosa en sangre y orina en su casa, por medio de un método sencillo, además son empleadas en el laboratorio clínico como un procedimiento rápido de identificación inicial de glucosa. (26, 37, 46, 47)

**MATERIAL
METODOS
Y
RESULTADOS**

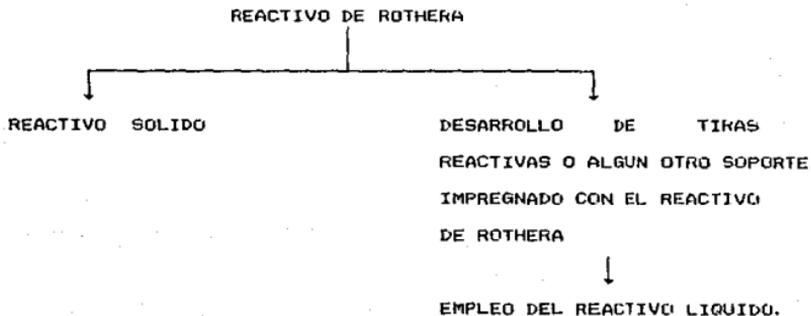
CUERPOS CETONICOS

ESQUEMA GENERAL DE LOS METODOS EMPLEADOS PARA LA DETECCION DE CUERPOS CETONICOS

Diversos productos comerciales ya sea en forma de tabletas o de "tiras reactivas" emplean el reactivo de Rothera para detectar cuerpos cetónicos. Por esta razón se eligió dicho reactivo para elaborar un método alternativo para el uso de estos productos.

Las posibilidades que se presentaron para este fin fueron:

- I. Empleo de un reactivo sólido .
- II. Desarrollo de tiras reactivas u otros soportes impregnados con el Reactivo de Rothera.
- III. Empleo del Reactivo de Rothera líquido.



MATERIAL Y EQUIPO

Aplicadores de madera

Agitadores de vidrio

Capilares (diámetro de 1.5 - 1.6 mm y 75 mm de longitud)

Espátula

Frascos color ámbar

Hisopos

Papel filtro Whatman No. 42

Pipetas

Mortero

Tubos de ensayo

Varillas de papel comprimido

Vasos de precipitado

Vortex

Balanza analítica

REACTIVOS

Acido clorhídrico	R.A.
Amortiguador de fosfatos	pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5
Amortiguador de tetraborato	pH 8.1
Amortiguador TRIS	pH 8.0
Bicarbonato de sodio	R.A.
Carbonato de sodio anh.	R.A. y Grado técnico
Hidróxido de sodio	R.A.
Glicina	R.A. y Grado técnico
Lactosa	R.A.

Nitroprusiato de sodio

R.A.

Sulfato de amonio

R.A. y Grado técnico

ACETEST^R

(Laboratorios Miles de México)

BILI-LABSTIX^R

(Laboratorios Miles de México)

MULTISTIX^R

(Laboratorios Miles de México)

MATERIAL BIOLÓGICO

Orina de pacientes diabéticos valorada para cuerpos cetónicos.

Orina de pacientes no diabéticos.

I. EMPLEO DEL REACTIVO DE ROTHERA SOLIDO

En general en la bibliografía que revisa la metodología utilizada para la detección de cuerpos cetónicos, no se indican las cantidades exactas en que deben estar los componentes del Reactivo de Rothera. Frecuentemente se menciona que deben utilizarse "cristales" de nitroprusiato de sodio, o bien "gotas" de una solución saturada de este compuesto (9, 34); en otros casos también se menciona que la concentración del nitroprusiato de sodio debe ser menor que la del sulfato de amonio y del carbonato de sodio, así como que la concentración de estos dos compuestos debe ser similar (33, 39).

Por este motivo, lo primero que se estudió fue la composición exacta del reactivo que permite apreciar la concentración de cuerpos cetónicos. Se tomó como base la composición de uno de los productos comerciales utilizados con mayor frecuencia, el cual está compuesto de Nitroprusiato de sodio, glicina y carbonato de sodio (27, 42); adicionalmente, se estudió el efecto de lactosa sobre la sensibilidad obtenida con el reactivo de esa composición (26, 42).

Por otra parte se consideró la composición indicada en la bibliografía (33, 36), en la cual el Reactivo de Rothera se compone de Nitroprusiato de sodio, sulfato de amonio y carbonato de sodio.

Siendo de interés desarrollar un reactivo al menor costo posible se preparó también el Reactivo de Rothera en composición similar a productos comerciales pero utilizando reactivos grado

técnico.

TECNICA

1. COMPOSICION DEL REACTIVO DE ROTHERA SOLIDO.

Se preparo Reactivo de Rothera solido de diferente composición y concentración segun se indica en las Tablas No. 1 (Reactivo A) y 2 (Reactivo B). En ambos casos se utilizaron reactivos grado analítico, para lo cual los cristales de nitroprusiato de sodio se pulverizaron finamente en un mortero, mezclándolos posteriormente en el orden indicado con los demas reactivos.

En la Tabla 3 se indica la composición del Reactivo de Rothera (Reactivo C), la cual es similar a la del Reactivo B, pero en este caso, con el fin de observar si la lactosa incrementa la sensibilidad del reactivo, se adicionaron diferentes concentraciones de dicho disacárido a la concentración del reactivo que mostro mayor sensibilidad.

Valoración de Cuerpos Cetónicos.

Con los reactivos preparados segun se indicó, se desarrollo la técnica de valoración de cuerpos cetónicos, la cual consiste en efectuar "una prueba en tubo" de la siguiente manera:

Adicionar a un tubo de ensaye 0.1 g de reactivo y 2.0 ml de orina previamente valorada para cuerpos cetónicos. Como control negativo, se usaron siempre muestras de orina en las que no se detectaron cuerpos cetónicos.

Las orinas empleadas, se eligieron entre las muestras que

fueron valoradas en el laboratorio de bioquímica del I.N.F.: posteriormente para realizar el presente estudio, se determinó en ellas la concentración de cuerpos cetónicos utilizando tabletas Acetest^R.

Para comprobar la utilidad de los reactivos de Rothera preparados, así como para observar el efecto de la lactosa sobre la sensibilidad del Reactivo C, se utilizaron orinas con concentraciones de cuerpos cetónicos fuertemente positivas.

La aparición de color se interpretó de manera similar a la observada en las tabletas Acetest^R.

Color	Valoración	Concentración aproximada mg/dl
LILA TENUE	TRAZAS (+)	5
LILA INTENSO	MODERADO (++)	30
PURPURA	INTENSO (+++)	80

Es importante aclarar que aunque no se indique en cada caso, cada uno de los resultados que se informan implica el haber realizado cada prueba entre 15 y 20 veces con el objeto de obtener resultados confiables; además, para comparar la sensibilidad obtenida con los reactivos comerciales y los elaborados, como control se emplearon siempre tabletas Acetest^R.

RESULTADOS

Los resultados (Tabla No. 1 y 2) mostraron que la proporción

adecuada para la elaboracion del Reactivo sólido A o B, fue la que contiene nitroprusiato de sodio en relacion 1 a 20 con el sulfato de amonio y la glicina respectivamente.

Por otro lado, la coloracion obtenida al reaccionar los reactivos de Rothera fue diferente, siendo esta de rosa a rojo en el caso del Reactivo A y de lila tenue a púrpura con el Reactivo B, sin embargo la sensibilidad de uno y otro reactivo es la misma. La sensibilidad que proporcionan los Reactivos A y B es similar a la que se obtiene con las tabletas Acetest[®].

Los reactivos se guardaron en frascos color ámbar para estudios de estabilidad (12 meses).

Por lo que respecta al Reactivo de Rothera C (Tabla No. 3), se encontro que la lactosa no influye en la sensibilidad proporcionada por el reactivo en ninguna de las concentraciones estudiadas (0.05 g a 1.0 g).

TABLA No. 1

COMPONENTES DEL REACTIVO DE ROTHERA/SULFATO DE AMONIO (A)

NITROPRUSIATO DE SODIO (g)	SULFATO DE AMONIO (g)	CARBONATO DE SODIO (g)	RESULTADO	
			CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
0.50	2.0	2.0	+	-
0.25	2.0	2.0	+	-
0.10	2.0	2.0	+++	-
0.05	2.0	2.0	++	-
0.50	1.0	1.0	+	-
0.10	1.0	1.0	++	-

TABLA No. 2

COMPONENTES DEL REACTIVO DE ROTHERA/GLICINA (B)

NITROPRUSIATO DE SODIO (g)	GLICINA (g)	CARBONATO DE SODIO (g)	RESULTADO	
			CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
0.50	2.0	2.0	+	-
0.25	2.0	2.0	+	-
0.10	2.0	2.0	+++	-
0.05	2.0	2.0	++	-
0.50	1.0	1.0	+	-
0.10	1.0	1.0	++	-

TABLA No. 3

COMPONENTES DEL REACTIVO DE ROTHERA COMPUESTO (C)

NITROPRUSIATO DE SODIO (g)	GLICINA (g)	CARBONATO DE SODIO (g)	LACTOSA (g)	RESULTADO	
				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
				0.05	1.0
0.05	1.0	1.0	0.50	+++	-
0.05	1.0	1.0	0.25	+++	-
0.05	1.0	1.0	0.10	+++	-
0.05	1.0	1.0	0.05	+++	-

2. EMPLEO DE REACTIVOS DE DIFERENTE GRADO DE PUREZA.

Con el objeto de disminuir el costo del Reactivo de Rothera, se prepararon nuevos lotes de reactivos A y B, mezclando componentes grado analítico y técnico en combinaciones variables, utilizando siempre nitroprusiato de sodio grado analítico, por ser este el reactivo crítico de la reacción.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos utilizando componentes grado analítico o técnico comparativamente fueron similares, lo cual

parece indicar que el grado de pureza no influye significativamente en los resultados.

3. COMPARACION DE LOS REACTIVOS ELABORADOS CON TABLETAS Y TIRAS REACTIVAS.

Como siguiente punto se consideró importante validar los resultados obtenidos al utilizar los Reactivos A (Reactivo de Rothera/Sulfato de amonio) y B (Reactivo de Rothera/Glicina), frente a los obtenidos con las tabletas Acetest^R y las tiras reactivas Bili-Labstix^R y Multistix^R, las cuales son usadas comúnmente en pruebas de rutina.

Para la comparación se utilizaron muestras de orina con diferentes concentraciones de cuerpos cetónicos, (trazas, moderado, fuertemente positivas y negativas).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 4.

TABLA NO. 4

COMPARACION DE LA REACCION OBTENIDA ENTRE LOS REACTIVOS A Y B. CON
TABLETAS Y TIRAS COMERCIALES

	CONCENTRACION APROXIMADA DE CUERPOS CETONICOS EN ORINA			
	TRAZAS (5 mg/dl)	MODERADAMENTE POSITIVA (30 mg/dl)	FUERTEMENTE POSITIVA (80 mg/dl)	CONTROL NEGATIVO (0 mg/dl)
REACTIVO DE ROTHERA (A)	+	++	+++	-
REACTIVO DE ROTHERA (B)	+	++	+++	-
ACETEST ^R	+	++	+++	-
BILI-LABSTIX ^R	+	++	+++	-
MULTISTIX ^R	-	++	+++	-

4. PRESENTACION DEL REACTIVO DE ROTHERA SOLIDO

Considerando que las formulaciones estudiadas del Reactivo de Rothera proporcionaron resultados similares (Tabla No. 1 y 2) y que el reactivo que contiene sulfato de amonio (Reactivo A) es más económico que el que contiene glicina (Reactivo B), se diseñaron tres presentaciones para el Reactivo A:

4.1 Capilares empacados con Reactivo de Rothera en polvo.

4.2 Corrector líquido para máquina (DIXOMEX) como soporte del

reactivo cubierto con una membrana semipermeable (SPECTROPOR).
4.3 Frascos con el reactivo de Rothera en polvo.

TECNICA

4.1 Se empacaron manualmente capilares de vidrio con un diámetro de 1.5 - 1.6 mm y 75 mm de longitud, con 8.0 mg aproximadamente del Reactivo de Rothera en Polvo y se sellaron con plastilina por el extremo libre.

La funcionalidad de los capilares empacados consistió en introducir un capilar en un recipiente con orina con cuerpos cetónicos y permitir que por capilaridad subiera la orina hasta 1.0 cm aproximadamente, a partir de este momento se dejaron transcurrir 15 segundos y se efectuó la lectura de la reacción.

4.2 El empleo de corrector líquido para máquina como soporte del reactivo, consistió en colocar una capa de aproximadamente 15 mm de longitud del corrector sobre una varilla de papel comprimido y antes de que se secase el corrector se fijaron sobre él entre 20 y 25 mg de Reactivo de Rothera, a continuación se cubrió la zona reactiva con membrana semipermeable.

La funcionalidad de la varilla se efectuó de manera similar a la descrita para los capilares empacados con Reactivo de Rothera.

4.3 Como última opción se colocaron 5.0 g de Reactivo de Rothera en frascos color ámbar de 15 ml.

RESULTADOS

De las posibilidades planteadas, se observó que la técnica para llenar capilares de forma manual es muy laboriosa y por lo tanto costosa, al mismo tiempo que son sumamente frágiles y por consiguiente susceptibles de fracturarse fácilmente.

El uso de varillas de papel comprimido con corrector líquido para máquina como soporte del Reactivo de Rothera tampoco fue satisfactorio, debido a que la zona reactiva sufre rápido deterioro.

La presentación más adecuada resultó ser el Reactivo de Rothera en polvo envasado en frascos de color ámbar esta última presentación permitió realizar pruebas de estabilidad a tiempos variados.

II. ELABORACION DE TIRAS REACTIVAS

Los reactivos comerciales que detectan cuerpos cetonicos (tiras reactivas o tabletas) ofrecen comodidad para su uso por su sencilla presentacion, asi en un intento de desarrollar tiras reactivas o algun otro soporte con el reactivo de Rothera que proporcionara la misma facilidad de manejo que los productos comerciales, se busco la composicion del reactivo en forma liquida.

Se estudio el comportamiento de los Reactivos A (Reactivo de Rothera/Sulfato de amonio) y B (Reactivo de Rothera/Glicina) en solucion, para lo cual se trabajo de la siguiente manera:

1. Se preparo el Reactivo de Rothera en forma liquida utilizando la composicion previamente estudiada de los reactivos A y B en polvo. Para disolver los reactivos se emplearon compuestos inorganicos (Agua, NaOH, NaHCO_3 y HCl) y diferentes amortiguadores (Fosfatos, TRIS, y Tetraborato).
2. Se impregnaron tiras de papel filtro con los reactivos liquidos.
3. Se probaron los reactivos liquidos y las tiras impregnadas con muestras de orina con diferentes concentraciones de cuerpos cetonicos.
4. Se estudio el tiempo de estabilidad del reactivo liquido y de las tiras impregnadas.

TECNICA

REACTIVO DE ROTHIERA LIQUIDO A Y B

1a. Disolventes inorganicos

Como el nitroprusiato de sodio es polar, se emplearon como disolventes agua destilada, NaOH 1.0 mol/L, NaHCO_3 1.0 mol/L y HCl 1.0 mol/L. La disolución se efectuó adicionando a tubos de ensaye 0.5 g de reactivo (A o B) y 5.0 ml de cada disolvente. La molaridad final de cada componente de los reactivos en su disolvente fue: 8.4×10^{-3} mmol/L para Nitroprusiato de sodio; 0.5 mol/L para Carbonato de sodio; 0.66 mol/L para Glicina y 0.39 mol/L para Sulfato de amonio.

2a. Impregnación de Tiras con los reactivos líquidos A y B.

Con las soluciones de los reactivos A y B se procedió a impregnar tiras de papel filtro Whatman No.42* (de 0.5 cm de ancho por 3.0 cm de largo). Para la impregnación, las tiras se colocaron dentro de una caja Petri y se les agregó 200 μl de cada solución reactiva sobre una superficie de 2.0 cm y se dejaron secar a temperatura ambiente.

* De los papeles Whatman utilizados en el laboratorio, se eligió el No. 42 porque tiene una retención del tamaño de partículas de 2.5 a 50 μm , posee una velocidad de flujo lenta que corresponde a 240 s/ml y su resistencia en estado humedo es adecuado para prevenir la ruptura del papel (52).

1a. Funcionalidad de los Reactivos líquidos A y B y de las Tiras impregnadas.

Para conocer la funcionalidad de los reactivos líquidos A y B, se llevó a cabo una prueba en tubo colocando 1.0 ml de cada solución reactiva y 2.0 ml de orina con una concentración fuertemente positiva de cuerpos cetónicos, inmediatamente después se mezclaron los tubos y se efectuó la lectura de la prueba.

Para probar la funcionalidad de las tiras impregnadas se adicionaron 200 µl de orina a cada tira. La orina que se empleó fue la misma con la que se probaron los reactivos líquidos.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba en tubo para los Reactivos A y B mostraron que cuando éstos se disuelven en hidróxido de sodio no reaccionan con cuerpos cetónicos; con los reactivos disueltos en agua se manifiesta una reacción débil 3 minutos después de que se hicieron reaccionar, sin embargo, aunque la reacción es equivalente en cuanto a concentración de cuerpos cetónicos el color que se origina es diferente, siendo éste rojo y lila para el Reactivo A y B respectivamente.

Con los reactivos disueltos tanto en bicarbonato de sodio como en ácido clorhídrico se obtuvo la reacción esperada de acuerdo a la concentración de cuerpos cetónicos de la muestra; nuevamente se observó que aunque la reacción es similar entre el Reactivo A y B, el color producido es diferente siendo respectivamente morado y púrpura .

Una diferencia importante observada entre el Reactivo A y el B es que en HCl la reacción con el Reactivo A se aprecia después

de un minuto mientras que con el B la reacción se manifiesta instantáneamente (Tabla No. 5).

TABLA NO. 5
PRUEBA EN TUBO DEL REACTIVO DE ROTHERA *

TIEMPO DE DESARROLLO DE COLOR		ORINA CON CUERPOS CETONICOS			
	MIN	H ₂ O	NaOH	NaHCO ₃	HCl
REACTIVO A	1/2	-	-	-	-
	1	-	-	-	ROJO
	2	-	-	ROJO	MORADO
	3	ROJO	-	MORADO	MORADO
REACTIVO B	1/2	-	-	-	PURPURA
	1	-	-	-	PURPURA
	2	-	-	LILA	PURPURA
	3	LILA	-	PURPURA	PURPURA

* Reactivo A = Reactivo de Rothera/Sulfato de amonio

Reactivo B = Reactivo de Rothera/Glicina

TABLA NO. 6
PRUEBA EN TIRA DEL REACTIVO DE ROTHERA⁴

TIEMPO DE DESARROLLO DE COLOR		ORINA CON CUERPOS CETONICOS			
	MIN	H ₂ O	NaOH	NaHCO ₃	HCl
REACTIVO A	1	-	-	-	ROJO
	3	-	-	-	MORADO
	6	-	-	ROJO	MORADO
REACTIVO B	1	-	-	-	PURPURA
	3	-	-	-	PURPURA
	6	-	-	LILA	PURPURA

* Reactivo A = Reactivo de Rothera/Sulfato de amonio

Reactivo B = Reactivo de Rothera/Glicina

Los resultados de la prueba en tira (Tabla No. 6), mostraron diferencias con respecto a la prueba en tubo. En tira no se observó reacción para los Reactivos A y B disueltos en hidróxido de sodio y agua; con bicarbonato de sodio la reacción se manifestó después de 6 minutos de reacción con los cuerpos cetónicos; con ácido clorhídrico la reacción esperada se manifestó a los 3 minutos con el Reactivo A y al minuto con el Reactivo B. En este caso también se observaron diferencias en el color producido por ambos reactivos, éstas se muestran en la Tabla No. 6.

4a. Pruebas de Estabilidad

Se midió el tiempo en que después de elaborados los Reactivos líquidos A y B y las tiras impregnadas reaccionan al ponerlas en contacto con los cuerpos cetónicos.

RESULTADOS

El Reactivo líquido A es estable solamente una hora después de elaborado en tanto que el B permanece estable por 3 horas. Por lo que respecta a las tiras, las que fueron impregnadas con el Reactivo A en bicarbonato de sodio son estables 3 horas mientras que las impregnadas con el Reactivo B son estables 5 horas; las tiras impregnadas con Reactivo A en ácido clorhídrico son estables 20 horas en tanto que las impregnadas con el reactivo B en el mismo ácido son estables 30 horas.

REACTIVO DE ROTHERA/OLICINA LIQUIDO (REACTIVO B)

Dado que los tiempos de estabilidad de los Reactivos A y B fueron muy cortos, se probó utilizar amortiguadores con valores de pH diferente con la finalidad de incrementar los tiempos de estabilidad. Puesto que con el Reactivo B el tiempo de aparición de color al reaccionar con los cuerpos cetónicos fue la mitad del requerido por el Reactivo A y es más estable, se eligió este reactivo para continuar el estudio.

TECNICA

1b. Amortiguadores (Reactivo B-Amortiguador)

La disolución del Reactivo B en amortiguador se efectuó de manera similar a la utilizada con los compuestos inorgánicos. Se emplearon los siguientes amortiguadores:

Amortiguados de fosfatos 0.1 mol/L	pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5
Amortiguador TRIS 0.1 mol/L	pH 8.0
Amortiguador de Tetraborato 0.1 mol/L	pH 8.1

La concentración de reactivo, fue igual a la indicada cuando se emplearon disolventes inorgánicos.

2b. Impregnación de Tiras con el Reactivo B-Amortiguador.

Con el Reactivo B preparado en los diferentes amortiguadores se impregnaron tiras de papel Whatman No. 42 de manera similar a cuando se trabajó con el reactivo disuelto en compuestos inorgánicos.

3b. Funcionalidad y estabilidad del Reactivo B-Amortiguador y de las Tiras Reactivas impregnadas.

Las pruebas en tubo del Reactivo B-Amortiguador y de las tiras impregnadas, se llevaron a cabo de igual manera a la descrita para los reactivos disueltos en compuestos inorgánicos.

Para la reacción se utilizó orina valorada previamente con tabletas Acetest^R, con una concentración moderada de cuerpos cetónicos (aproximadamente 30 mg/dl), midiendo en cada caso el tiempo en que se produjo la coloración respectiva.

RESULTADOS

En la Tabla No. 7 se aprecia que tanto la naturaleza química del amortiguador como el valor de pH influyen en el tiempo en que se produce la reacción entre el Reactivo B y los cuerpos cetónicos.

Así, se observa que las mejores condiciones para que se lleve a cabo la reacción las proporciona el reactivo recién preparado en amortiguador de fosfatos pH 5.0-6.0, a este pH, la prueba en tubo se produce instantáneamente o en un máximo de 30 segundos, en tanto que con la tira el color se observa entre 30 y 60 segundos.

El aumento del valor de pH en amortiguador de fosfatos de 6.5 a 7.5 incrementa el tiempo en que se produce la reacción con cuerpos cetónicos; el desarrollo de color de la prueba en tubo y con la tira impregnada se produce respectivamente en 60 y 90 segundos.

Con el amortiguador TRIS a pH 8.0 la reacción se observa en 60 segundos para la prueba en tubo y en 90 segundos para la prueba en tira, en tanto que con el amortiguador de tetraborato a pH 8.1 para ambas pruebas la reacción tarda 4 veces más en manifestarse.

Cuando se probó la funcionalidad del reactivo 30 horas después de haber sido elaborado, el desarrollo de color para ambas pruebas fue más lento en comparación con el obtenido con el reactivo recién preparado.

La prueba en tubo fue positiva no instantáneamente sino a los 7 minutos, además a pH superior a 6.0 no se observa desarrollo de color. En la prueba en tira, el desarrollo de color tardó 3 minutos en lugar de los 30 segundos observados inicialmente, además el pH no afectó su funcionalidad.

TABLA NO. 7

TIEMPO DE REACCION Y ESTABILIDAD DEL REACTIVO DE ROTHERA - AMORTIGUADOR

		PRUEBA [*]		PRUEBA ^{**}	
		TUBO	TIRA	TUBO	TIRA
Amortiguador	pH	DESARROLLO DE COLOR			
Fosfatos 0.1 mol/L	5.0	INST.	30 s	7 min.	3 min.
	6.0	30 s	60 s	7 min.	5 min.
	6.5	60 s	90 s	-	10 min.
	7.0	60 s	90 s	-	15 min.
	7.5	60 s	90 s	-	15 min.
TRIS 0.1 mol/L	8.0	60 s	90 s	-	10 min.
Tetraborato 0.1 mol/L	8.1	240 s	240 s	-	15 min.

* 1 h después de haber sido preparado

** 30 h después de haber sido preparado

PREPARACION DE REACTIVOS INDIVIDUALES Y MIXTOS CON LOS COMPONENTES
DEL REACTIVO B

Debido a que uno de los propósitos de este trabajo era obtener un reactivo líquido de estabilidad prolongada y dado a que trabajando con el reactivo único sólo se logró una estabilidad relativa de 30 horas, se consideró la posibilidad de prolongar la estabilidad del reactivo preparando reactivos individuales, o mixtos, con cada uno de los componentes del Reactivo B.

Como disolvente se decidió utilizar amortiguador de fosfatos pH 5.0 por los resultados obtenidos con él anteriormente señalados.

TECNICA

Se prepararon las soluciones reactivas siguientes en amortiguador de fosfatos 0.1 mol/L pH 5.0

- 1) Glicina (G) 0.66 mol/L
- 2) Nitroprusiato de sodio (N) 8.4×10^{-4} mol/L
- 3) Carbonato de sodio (C) 0.5 mol/L
- 4) Nitroprusiato de sodio 8.4×10^{-4} mol/L-Carbonato de sodio 0.5 mol/L
- 5) Nitroprusiato de sodio 8.4×10^{-4} mol/L-Glicina 0.66 mol/L (N-G)
- 6) Glicina 0.66 mol/L-Carbonato de sodio 0.5 mol/L (G-C)

Como control se utilizó el Reactivo de Rothera B completo (reactivo único) utilizado en los anteriores estudios.

Con cada uno de los anteriores reactivos, se impregnaron

tiras individuales de papel Whatman No. 42 de la manera descrita previamente.

Funcionalidad de los reactivos individuales, mixtos y de las tiras impregnadas.

La funcionalidad de los reactivos individuales o mixtos, se probó empleando una placa de porcelana excavada en lugar de usar tubos de ensaye, con el objeto de tener un buen contraste y observar más fácilmente el desarrollo de color.

Sobre cada excavación se colocó una gota de los reactivos individuales o mixtos en la combinación requerida para tener el reactivo completo; como muestra se adicionaron 2 gotas de orina o control valorado previamente, se mezclaron con un agitador y se efectuó la lectura de los resultados en un máximo de 60 segundos.

Para probar la funcionalidad de las tiras, éstas se sobrepusieron en capas en la composición necesaria para tener el reactivo completo.

Las muestras de orina y controles se aplicaron en cada caso en un volumen de 50 μ l (aproximadamente dos gotas), que se depositaron sobre la primer tira permitiendo que por difusión se impregnaran las capas inferiores.

El control positivo de orina se valoro con tabletas Acetest^R (aproximadamente 80 mg/dl) y los controles negativos fueron en todos los casos orinas negativas para cuerpos cetónicos.

La funcionalidad de los reactivos y de las tiras se probó en diferentes tiempos (Tabla No. 8).

RESULTADOS

Los resultados presentados en la Tabla No. 8 comprueban que efectivamente la estabilidad del Reactivo de Rothera se incrementa notablemente al utilizar los reactivos preparados en forma individual.

Así mismo, puede observarse que los componentes críticos de la reacción son la Glicina y el Carbonato de sodio que al estar juntos permiten que el reactivo sea estable durante una hora, como se observa entre el reactivo único y C-G + N.

TABLA NO. 8

PRUEBA EN TIRA Y EN PLACA DEL REACTIVO UNICO Y DE LOS REACTIVOS
INDIVIDUALES Y MIXTOS

Adición de :	ORINA CON CUERPOS CETÓNICOS					ORINA CONTROL
	TIEMPO*					
	1 h	30 h	72 h	7 días	30 días	
REACTIVO UNICO	+++	-	-	-	-	-
REACTIVOS INDIVIDUALES N + C + G	++	++	++	++	++	-
REACTIVOS MIXTOS N - G	++	++	++	++	++	-
REACTIVOS MIXTOS C - G	+++	-	-	-	-	-
N						

* T = Tiempo después de haber sido preparado el reactivo.

III. REACTIVO DE ROTHERA LIQUIDO

Con base a los resultados anteriores y tomando en cuenta que para obtener un reactivo estable es importante que esten separados la glicina y el carbonato de sodio asi como que con el uso de reactivos mixtos (C-N y G-N) se obtiene tambien un reactivo estable, se busco la concentracion optima de cada uno de los componentes que permitiera detectar minimo 5.0 mg/dl de cuerpos cetonicos.

RESULTADOS

Las concentraciones que se encontraron optimas para obtener el resultado deseado fueron las siguientes:

REACTIVO C-N: CARBONATO-NITROPRUSIATO

Nitroprusiato de sodio	6.7×10^{-3}	mol/L
Carbonato de sodio	1.26	mol/L
Benzoato de sodio	2.7×10^{-4}	mol/L
Amortiguador de fosfatos 0.1	mol/L	pH 5.0

REACTIVO G-N: GLICINA-NITROPRUSIATO

Nitroprusiato de sodio	6.7×10^{-3}	mol/L
Glicina	1.8	mol/L
Benzoato de sodio	2.7×10^{-4}	mol/L
Amortiguador de fosfatos 0.1	mol/L	pH 5.0

FUNCIONALIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS REACTIVOS

La funcionalidad y sensibilidad de los reactivos preparados con las concentraciones óptimas de los componentes del Reactivo de Rothera, se comprobó utilizando la técnica en placa descrita anteriormente.

RESULTADOS

El Reactivo de Rothera líquido (G-C y C-N) es estable mínimo por 10 meses a temperatura ambiente (las tiras impregnadas sólo son estables durante 5 meses).

En la Tabla No. 9 se presentan los resultados obtenidos con el reactivo de Rothera líquido (G-N y C-N), comparativamente con los obtenidos con tabletas Acetest^R y tiras reactivas Bili-Labstix^R y Multistix^R.

TABLA NO. 9

COMPARACION DE LA REACCION OBTENIDA ENTRE EL REACTIVO DE ROTHERA
(C - N Y G - N) Y TABLETAS Y TIRAS REACTIVAS COMERCIALES

CONCENTRACION APROXIMADA DE CUERPOS CETONICOS EN ORINA				
	TRAZAS (5 mg/dl)	MODERADAMENTE POSITIVA (30 mg/dl)	FUERTEMENTE POSITIVA (80 mg/dl)	CONTROL NEGATIVO (0 mg/dl)
REACTIVO DE ROTHERA	+	++	+++	-
ACETEST ^R	+	++	+++	-
MULTISTIX ^R	-	++	+++	-
BILI-LABSTIX ^R	+	++	+++	-

**DISCUSION
DE
RESULTADOS**

CUERPOS CETONICOS

DISCUSION DE RESULTADOS

I. REACTIVO DE ROTHERA SOLIDO

En las tablas No. 1 y 2, se observa que es necesario que los componentes del Reactivo de Rothera guarden una relación entre si para que el reactivo proporcione la sensibilidad deseada; en este caso el Nitroprusiato de sodio debe estar en relación 1 a 20 con el Sulfato de amonio o la Glicina.

Con respecto a la función de los componentes del Reactivo de Rothera, el Nitroprusiato de sodio es el componente crítico del reactivo y por lo tanto es indispensable para que se forme el complejo con los cuerpos cetónicos.

El Sulfato de amonio y la Glicina (Reactivo A o B), favorecen la formación del complejo al participar en la reacción de oxido-reducción que se lleva a cabo, además la naturaleza química de estos reactivos provoca que se obtengan coloraciones distintas al usar uno u otro; mientras que el Carbonato de sodio proporciona el medio básico que se necesita para que se efectue la reacción (pH 8.0 - 10.0).

Por el papel que desempeñan estos últimos componentes, en este caso en particular no es necesario que sean grado analítico, ya que en el estudio realizado al utilizar dichos componentes de grado técnico los resultados obtenidos fueron similares a los que se obtuvieron con reactivos grado analítico.

En la bibliografía (42), se informa que la Lactosa aumenta la sensibilidad del reactivo al incrementar la coloración del complejo formado, sin embargo, en las proporciones en que se

trabajaron los componentes del Reactivo de Rothera (Tabla No. 3) no se comprobó que el carbono anomérico de la glucosa que posee la Lactosa favorezca la reacción de oxido-reducción que se lleva a cabo entre dicho reactivo y los cuerpos cetónicos.

Por otro lado, la sensibilidad que proporcionan los reactivos elaborados (A y B) es semejante a la que proporcionan los productos comerciales con que se compararon (Tabla No. 4), a excepción de las tiras reactivas Multistix^R que al parecer tienen menor sensibilidad para detectar concentraciones bajas de cuerpos cetónicos (5.0 mg/dl).

Una diferencia importante entre preparar Reactivo A o B es el costo del reactivo, ya que la Glicina tiene un costo mayor que el Sulfato de amonio, por lo cual, y dado a que ambos reactivos sólidos proporcionan una sensibilidad equivalente, resulta conveniente utilizar el Reactivo de Rothera A.

Con respecto al Reactivo de Rothera en polvo podemos decir por último, que la presentación más adecuada del reactivo es en frascos de color ámbar, donde el reactivo es estable por lo menos un año, además de que este envase no eleva considerablemente el costo del reactivo, sin embargo comparada esta presentación con las existentes en el comercio resulta ser incómoda para su uso.

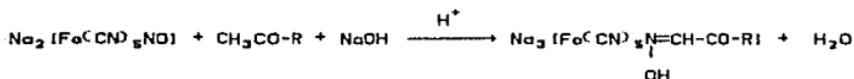
II. ELABORACION DE TIRAS REACTIVAS

Compuestos inorgánicos

De los disolventes inorgánicos utilizados para preparar el Reactivo de Rothera líquido, se deduce que el hidróxido de sodio

lo descompone rápidamente sin permitir que se lleve a cabo la reacción entre el reactivo y los cuerpos cetónicos: el agua produce la descomposición del reactivo un poco más lentamente, de manera que permite apreciar la reacción.

Tanto el bicarbonato de sodio como el ácido clorhídrico (Tabla No. 5), favorecen el medio que se necesita para que se lleve a cabo la reacción, esto se debe a que ambos reactivos tienen carácter ácido lo cual propicia la formación del complejo entre el Reactivo de Rothera y los cuerpos cetónicos de acuerdo al mecanismo de reacción propuesto por Feigl (42).



Tanto la diferencia de tiempo en que se produce la reacción con el Reactivo A y B, como del color producido por cada uno, se deben a la naturaleza química de los componentes que los constituyen. De acuerdo a nuestros propósitos el más adecuado es el Reactivo B porque además de proporcionar los tiempos de reacción más cortos es más estable.

Las tiras impregnadas con las diferentes soluciones de Reactivo A y B mostraron un incremento del doble de tiempo en que se aprecia la reacción con respecto al obtenido con la prueba en tubo, esto se debe a que la cantidad de reactivo que contiene la tira es aproximadamente 5 veces menor que la utilizada en la prueba en tubo.

El hecho de que en tira no se aprecie reacción con los reactivos disueltos en agua se puede deber a que el tiempo fijado para efectuar la última lectura fue insuficiente para apreciar la reacción, ya que en tubo para observar la reacción tuvieron que transcurrir 3 minutos obteniendo una reacción débil.

Por lo que respecta a estabilidad, el hecho de que las tiras impregnadas fueran más estables que los reactivos líquidos se puede deber a que la interacción de los componentes del reactivo en la tira ya seca es menor que en el reactivo líquido, permitiendo que la descomposición del reactivo sea más lenta.

Amortiguadores

El uso de amortiguadores tampoco produjo un incremento significativo de la estabilidad del Reactivo de Rothera, sin embargo, los resultados (Tabla No. 7) corroboraron que el pH del medio influye en la reacción del reactivo con los cuerpos cetónicos. El pH 5.0 proporciona las mejores condiciones para que se lleve a cabo la reacción probablemente al favorecer la ionización del complejo como se propuso previamente de acuerdo a la reacción de Feigl (42).

La naturaleza química del amortiguador también influye en el tiempo en que se manifiesta la reacción, así, el amortiguador de tetraborato que no tiene en su estructura hidrogenos que puedan favorecer la formación del complejo hace que la reacción tarde 4 veces más en manifestarse con respecto al tiempo en que se produce la reacción cuando el reactivo está

disuelto en TRIS a pesar de que ambos amortiguadores tienen valores de pH muy semejantes (8.1 y 8.0 respectivamente).

En cuanto a la diferencia en el tiempo en que se produce la reacción en tubo y tira (Tabla No. 7), como ya se discutió, se debe a la cantidad diferente de reactivo que se hace reaccionar en uno y otro caso. La interacción que tienen los componentes del reactivo en estado líquido o en tiras impregnadas, también puede explicar el porque en tira el reactivo permanece estable por más tiempo.

Reactivos individuales y mixtos.

Al preparar el Reactivo de Rothera no como reactivo único sino como sus componentes individuales se observó que el reactivo líquido se mantiene estable por periodos largos (mínimo 10 meses).

En la Tabla No. 8 se ve que la inestabilidad del reactivo se produce cuando se mantienen juntos el carbonato de sodio y la glicina, la causa de esto probablemente sea que ocurra una reacción lenta entre ellos que provoca que cambien las condiciones del medio lo cual conduce a que el reactivo deje de ser funcional.

Por lo que respecta a las tiras impregnadas con los reactivos individuales y mixtos, tienen una estabilidad máxima de 5 meses, lo cual representa una gran desventaja comparandolas con las tabletas Acetest^R que son estables un año.

III. REACTIVO DE ROTHERA LIQUIDO

El Reactivo de Rothera en soluciones mixtas (G-C y C-N), tuvo una sensibilidad comparable a la de algunos productos comerciales como las tabletas Acetest^R y las tiras reactivas Bili-Labstix[®] y Multistix[®] para detectar cuerpos cetónicos (Tabla No. 9). La comparación con los productos comerciales permitió observar lo mismo que con el reactivo sólido, esto es, al parecer las tiras reactivas Multistix^R tienen menor sensibilidad para concentraciones bajas de cuerpos cetónicos (5.0 mg/dl).

**MATERIAL
METODOS
Y
RESULTADOS**

GLUCOSA

GLUCOSA

La determinación continua de los niveles de glucosa en el suero y la orina es de gran importancia para individuos diabéticos que deben controlar la concentración sanguínea de dicho azúcar.

Un método usual de evaluar en forma rápida y semicuantitativa la glucosa en los líquidos corporales antes indicados, es el uso de tiras reactivas (que detectan este componente).

Uno de los propósitos de este trabajo fue elaborar tiras reactivas para la detección de glucosa con especificidad, sensibilidad y practicabilidad semejantes a las existentes en el comercio y que a la vez fueran de menor costo.

Pensando en desarrollar un producto lo más sencillo posible, se consideró impregnar tiras de papel filtro con glucosa oxidasa, peroxidasa y un cromógeno, en amortiguador, en composición similar a algunos productos comerciales (GLUCO-CINTA[®] y DIASTIX[®]), tomando como base la patente No. 4,303,753 (57) y otros artículos referentes al uso de Glucosa oxidasa para la determinación de glucosa (37, 50, 54, 55, 56).

MATERIAL Y EQUIPO

Espátula

Gradilla

Papel Whatman No. 42

Tubos de ensaye

Vasos de precipitado

Vidrio de reloj

Balanza analítica

Baño María

Termómetro

REACTIVOS

Amortiguador de citratos 0.1 mol/L PH 5.4

Amortiguador EDTA-Citratos 0.1 mol/L PH 6.4

Azul de bromofenol R.A.

Azul de toluidina R.A.

Glucosa anhidra R.A.

Ioduro de potasio R.A.

Polivinil pirrolidona (PVP) R.A.

Rojo de fenol R.A.

Tartracina R.A.

Reactivo de Benedict

Reactivo de o-toluidina

Cinta reactiva GLUCO-CINTA^R

MATERIAL BIOLÓGICO

Orina de pacientes diabéticos (glucosa positiva, valorada con Reactivo de Benedict y con Reactivo de o-toluidina)

Orina de pacientes no diabéticos (glucosa negativa)

ENZIMAS

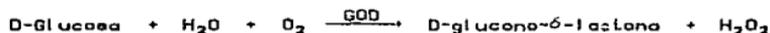
GLUCOSA OXIDASA (12 U/mg) R.A. MERCK

β -D-Glucosa: oxígeno 1-oxidorreductasa, E.C. 1.1.3.4

GOD de Aspergillus niger

Masa molecular relativa (PM): 160,000

La glucosa oxidasa es específica para β -D-Glucosa y cataliza la siguiente reacción:



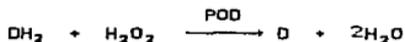
PEROXIDASA (100 U/mg) R.A. MERCK

Donador: Peróxido de hidrógeno oxidorreductasa, E.C. 1.11.1.7

POD de Rábano picante (Armoracia rusticana)

Masa molecular relativa (PM): 40,000

La peroxidasa tiene alta especificidad por peróxidos y cataliza la siguiente reacción:



Unidad enzimática: Una unidad es la cantidad de la enzima que bajo las condiciones de prueba cataliza la transformación de 1 μmol de sustrato por minuto.

TECNICA

1) Tomando como base los datos de la patente No. 4,303,753 (57), se preparó la solución de enzimas amortiguadas como a continuación se indica:

SOLUCION	GOD	36 KU/L
REACTIVA	POD	30 KU/L
I	Ioduro de potasio	12 mmol/L
	PVP (10%-H ₂ O)	2.0%
	Amortiguador EDTA- citratos 0.1 mol/L	pH 6.4

Se comparo el fundamento de las reacciones catalizadas por las enzimas Glucosa oxidasa, Peroxidasa y un cromógeno en los métodos fotométricos con el de las tiras reactivas, y puesto que es el mismo se preparó una segunda solución reactiva incrementando solamente la cantidad de Peroxidasa debido a que en los métodos fotométricos la concentración de esta enzima es mayor que la de Glucosa oxidasa.

II	GOD	36 KU/L
	POD	60 KU/L
	Ioduro de potasio	12 mmol/L
	PVP (10%-H ₂ O)	2.0%

Amortiguador EDTA-

citratos 0.1 mol/L pH 6.4

Considerando que las tiras reactivas Diastix^R utilizan amortiguador de citratos a pH 5.4 (42), utilizando ese amortiguador y pH se prepararon las soluciones reactivas III a V, las cuales son similares a la solución reactiva I a excepción de las concentraciones de Peroxidasa y la solución reactiva VI en donde se varió tanto la concentración de cromogeno como de Peroxidasa.

SOLUCION REACTIVA (Amortiguador de citra tos 0.1 mol/L PH 5.4)	GOD	POD	KI	PVP (10%-H ₂ O)
III	36 KU/L	30 KU/L	12 mmol/L	2.0 %
IV	36 KU/L	16 KU/L	12 mmol/L	2.0 %
V	36 KU/L	60 KU/L	12 mmol/L	2.0 %
VI	36 KU/L	60 KU/L	6 mmol/L	2.0 %

Considerando que el valor óptimo de pH del sistema enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa se encuentra entre 5.0 y 6.5 (42), se trabajó con los valores de pH indicados (6.4 y 5.4) con el fin de ver el valor de pH al cual la reacción se apreciaba más claramente. La variación de concentración de Peroxidasa y cromógeno se hicieron con base a encontrar los límites de detección.

Con las soluciones reactivas así preparadas se impregnaron tiras de papel filtro Whatman No. 42 (de 0.5 cm de ancho por

3.0 cm de largo), para lo cual se colocaron las tiras sobre una caja Petri aplicando en cada caso 200 μ l de la respectiva solución reactiva sobre una superficie de 2.0 cm y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La funcionalidad de las tiras impregnadas se probó 24 horas después de elaboradas. Para ello se emplearon orinas valoradas cualitativamente con la reacción de Benedict y cuantitativamente con la reacción de la o-toluidina.

Con el fin de determinar la linealidad de la reacción se utilizaron soluciones estándar de igual concentración a la de las orinas valoradas (0.1 g/dl, 0.25 g/dl, 0.5 g/dl y 2.0 g/dl), que al mismo tiempo de servir de control permitieron validar los resultados.

Paralelamente se realizaron valoraciones con la cinta reactiva GLUCO-CINTA^R, la interpretación del color desarrollado en ambos casos se hizo asignando valores de 0 a +4 proporcionalmente a las concentraciones de glucosa, como se especifica a continuación:

CONCENTRACION DE GLUCOSA (Valorada con o-toluidina)	POSITIVIDAD DE LA REACCION Evaluación visual
0 g/dl	0
0.1 g/dl	+1
0.25 g/dl	+2
0.5 g/dl	+3
2.0 g/dl	+4

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 1

TABLA NO. 1

COMPARACION DE LA REACCION OBTENIDA CON LA CINTA REACTIVA GLUCO-CINTA^R Y LAS TIRAS ELABORADAS

TIRA REACTIVA	CONCENTRACION DE GLUCOSA (o-toluidina)					
	0.0 g/dl	0.1 g/dl	0.25 g/dl	0.5 g/dl	2.0 g/dl	
pH 6.4 I	orina	-	-	-	-	
	estándar	-	+1	+2	+2	+2
II	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4
pH 5.4 III	orina	-	-	-	-	-
	estándar	-	-	-	+1	+2
IV	orina	-	-	-	-	-
	estándar	-	-	-	-	-
V	orina	-	+1	+1	+3	+4
	estándar	-	+1	+1	+3	+4
VI	orina	-	+1	+1	+1	+1
	estándar	-	+1	+1	+1	+1
Glucocinta ^R	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4

2) Debido a que algunos autores (42) mencionan que el uso de indicadores favorecen la apreciación visual del color producido en la reacción, se probó adicionar diferentes indicadores a la solución reactiva II por ser esta con la que se obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos con GLUCO-CINTA^R (Tabla No.1); se utilizaron los siguientes indicadores en una concentración de 20 mg/L:

Azul de toluidina

Azul de bromofenol

Tartracina

Rojo de fenol

Con las soluciones resultantes se impregnaron tiras de papel Whatman No. 42 y se efectuaron las pruebas de funcionalidad de igual manera a la descrita anteriormente.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 2, observando en cada caso las siguientes tonalidades:

INDICADOR	COLOR DESARROLLADO
Azul de toluidina (A.T)	Azul cielo-verde claro
Rojo de fenol (R.F.)	Rojo-anaranjado
Tartracina (T)	Amarillo pastel-café
Sin indicador (S/I)	Amarillo pastel-amarillo paja
GLUCO-CINTA ^R	Amarillo pastel-verde

TABLA NO. 2

COMPARACION DE LA REACCION OBTENIDA CON GLUCO-CINTA^R Y CON LAS TIRAS REACTIVAS-INDICADOR

TIRA REACTIVA II	CONCENTRACION DE GLUCOSA (α-toluidina)					
	0.0 g/dl	0.1 g/dl	0.25 g/dl	0.5 g/dl	2.0 g/dl	
pH 6.4 A.T.	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4
A.B.	orina	-	-	-	-	-
	estándar	-	-	-	-	-
T	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4
R.F.	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4
S/I	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4
Gluco- cinta ^R	orina	-	+1	+2	+3	+4
	estándar	-	+1	+2	+3	+4

**DISCUSION
DE
RESULTADOS**

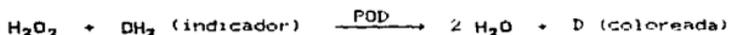
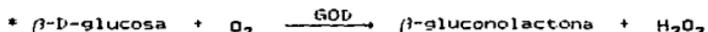
GLUCOSA

DISCUSION DE RESULTADOS

GLUCOSA

De las tiras reactivas impregnadas con las soluciones reactivas de enzimas (Tabla No. 1) podemos discutir lo siguiente:

Las tiras impregnadas con solución reactiva I únicamente reaccionaron con soluciones estándar de glucosa, sin embargo la tonalidad desarrollada sólo sirvió para detectar concentraciones de glucosa de 0.1 a 0.25 g/dl ya que a concentraciones mayores de este azúcar el color desarrollado era igual al obtenido con 0.25 g/dl; esto se debió posiblemente a que la cantidad de Peroxidasa fue insuficiente para oxidar la cantidad de cromógeno presente de acuerdo a la concentración de peróxido de hidrógeno formado en la primera reacción (donde interviene la glucosa oxidasa*). Por lo tanto al llegar al límite superior de detección (0.25 g/dl) el color desarrollado se mantuvo constante.



El hecho de que con orina no se obtuviera reacción, probablemente se debió a un descenso en la sensibilidad de la solución reactiva I, debido a componentes urinarios fisiológicos intensamente reductores como el ácido úrico, las mucoproteínas, sales y a otros componentes patológicos que pudieron influir en la

reacción enzimática de glucosa tales como el ácido acetoacético, el cual se puede oxidar por el sistema H_2O_2 /POD. Con la solución estándar de glucosa no ocurre esto por tratarse de una solución acuosa de sustancia pura.

El utilizar la misma formulación que proporciona la patente pero incrementando la concentración de peroxidasa en la solución reactiva II, permitió obtener tiras reactivas de semejante sensibilidad que la de las tiras comerciales GLUCO-CINTA[®]; además se obtuvo una equivalencia entre la concentración de glucosa en la orina valorada cuantitativamente con la reacción de la o-toluidina y las tiras impregnadas con esa solución.

Al comparar los resultados obtenidos con la solución reactiva II con respecto a los obtenidos con la solución reactiva I, se observó que en efecto al emplear orina se produce un descenso en la sensibilidad de la solución reactiva I la cual se incrementa al aumentar la concentración de peroxidasa.

En las soluciones reactivas III a V se observó que es decisiva la concentración de peroxidasa, así como el tipo de amortiguador y pH para preparar un reactivo que proporcione una sensibilidad que permita detectar mínimo 0.1 g/dl de glucosa. Así con la solución reactiva III de composición igual a la I pero con amortiguador de citratos y pH 5.4 la sensibilidad de las tiras disminuye considerablemente esto se debe a que las enzimas para reaccionar en condiciones óptimas requieren condiciones específicas que en este caso las proporciona el amortiguador

EDTA-citratos a pH 6.4.

El no haber obtenido reacción con las tiras impregnadas con la solución reactiva IV se debió además de la influencia del amortiguador y pH a que la cantidad de peroxidasa en la solución fue insuficiente para detectar siquiera el límite inferior de concentración que permite apreciar la reacción, aun utilizando glucosa pura (solución estándar).

Con la solución reactiva V (igual a la II a excepción del amortiguador y del pH) nuevamente se observó que las condiciones del medio influyen en la sensibilidad que proporcionan las tiras. Así, mientras que con la solución reactiva II se obtuvieron tiras reactivas con una sensibilidad equivalente a la de las tiras comerciales GLUCO-CINTA[®], con la solución reactiva V la sensibilidad fue menor de tal modo que no fue posible detectar concentraciones de glucosa de 0.25 g/dl.

Los resultados obtenidos con la solución reactiva VI mostraron que la concentración del cromógeno es importante para la apreciación visual de la reacción. Al comparar esta solución con la V (que son iguales a excepción de la concentración del cromógeno) se observó una importante disminución en la sensibilidad; no se pudieron detectar concentraciones de glucosa mayores a 0.1 g/dl. Aunque la reacción enzimática acoplada se lleva a cabo, la concentración de cromógeno debe ser tan baja que no permite apreciar la proporcionalidad entre la cantidad de glucosa presente y el cromógeno oxidado.

Por último, de los indicadores probados el hecho de que con azul de bromofenol no se obtuviera reacción alguna (Tabla No. 2) se debió a que este indicador vira en un intervalo de pH de 3.0 a 4.6 y el sistema enzimático se trabajó a un valor de pH superior. Con respecto a los otros indicadores estudiados (Azul de toluidina, Rojo de fenol y tartracina), el usarlos no favorece de manera significativa la visualización del color producido en la reacción ya que en las tiras sin indicador fue igualmente diferenciable la tonalidad producida de acuerdo a la concentración de glucosa con que reaccionaban.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se proporcionan los criterios actuales que el National Diabetes Data Group ha recomendado para unificar la clasificación y el diagnóstico de la Diabetes Mellitus así como las diferentes formas de intolerancia a la glucosa.

2. Para la detección de cuerpos cetónicos fue posible obtener una forma sólida y otra líquida del reactivo de Rothera, con las cuales se obtuvieron sensibilidad y reproducibilidad de resultados semejantes a la de algunos productos comerciales tales como Acetest^R y Bili-Labstix^R.

2.1 La concentración mínima detectable de cuerpos cetónicos que se obtuvo con los reactivos elaborados fue de 5.0 mg/dl y la máxima fue de 80 mg/dl.

2.2 La estabilidad del reactivo sólido fue similar a la que proporcionan las tabletas Acetest^R (mínimo 12 meses). Se encontró que para obtener la estabilidad del Reactivo de Rothera líquido es necesario mantener por separado a 2 de sus componentes (Na_2CO_3 y Glicina), con lo cual se logra una estabilidad de 10 meses.

2.3 Tanto la forma sólida como la líquida del Reactivo de Rothera no ofrecieron la facilidad de manejo que proporcionan los reactivos comerciales existentes en el mercado (por ejemplo, Acetest^R), sin embargo, el costo de los reactivos preparados en el laboratorio es menor que el de muchos productos comerciales que detectan cuerpos cetónicos.

3. Por lo que respecta al desarrollo de un sustituto de tiras reactivas para la detección rápida de glucosa, se desarrolló una

solución reactiva cuya formulación permitió obtener tiras reactivas de sensibilidad semejante a la que proporcionan las tiras comerciales, GLUCO-CINTA^R.

3.1 La concentración mínima detectable de glucosa que se obtuvo con las tiras elaboradas fue de 0.1 g/dl y la concentración máxima fue de 2.0 g/dl.

3.2 Con las tiras reactivas elaboradas se obtuvo una linealidad en la reacción hasta una concentración de 2.0 g/dl de glucosa, la cual es equivalente a la que proporcionan las tiras reactivas comerciales GLUCO-CINTA^R.

3.3 La estabilidad de las tiras reactivas elaboradas comparada con la que proporcionan las tiras reactivas GLUCOCINTA^R (12 meses) fue 4 veces menor.

3.4 Los reactivos críticos que se requieren para determinar glucosa (GOD y POD) no se producen en nuestro país lo cual conduce a importarlos, de aquí que el costo de las soluciones reactivas que se emplearon para la impregnación de las tiras fuera elevado; Esto condujo a que el valor de las tiras elaboradas fuera por mucho superior al que poseen las tiras reactivas comerciales.

4. Este trabajo representa un paso en el desarrollo de este tipo de productos de manufactura nacional que sustituyan la tecnología extranjera que nuestro país adquiere a un alto costo. Sería deseable posteriormente que personas relacionadas con el área de la salud, continuaran con este tema hasta obtener un producto a nivel comercial con tecnología mexicana que esté al alcance de todas las clases sociales.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Griffin, J. E.: Manual of Endocrinology & Metabolism, Ed. Mc Graw-Hill, U.S.A. 1982.
2. Herrera Pombo, J.L.: La Diabetes Mellitus en la Practica Médica, Ed. Novo, Esp. 1973.
3. Historia Natural de la Diabetes Mellitus. Mesa redonda. Rev. Fac. Med, XVII, 17:6, 1974.
4. Stocker, W.: Aportación de la Historia de la Diabetes Mellitus Therapiewoche 16, 1966.
5. Bhagavan, N.V.: Biochemistry, Ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, U.S.A. 1974.
6. Harper, Harold. A.: Review of Physiological Chemistry, Ed. Lange Medical Publications, California. 1975.
7. Lehninger, Albert L.: Bioquímica, Ed. Omega, Barcelona, Esp. 1981.
8. Kaplan, A., Szabo, L.: Clinical Chemistry, Second Edition. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, U.S.A. 1983.
9. Lynch, M.J.: Medical Laboratory Technology, Third Edition. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A. 1976.
10. Cahill, George F. Jr., Boston, M.D.: Physiology of Insulin in Man. J. Amer. Diab. Assoc., 20, 785-799, (1971)
11. Banting, F.G., Best. C.H.: The Internal Secretion of the Pancreas. J. Lab. Clin. Med., 7:251, 1922.
12. Gerich, J.E, Charles, M.A., Grod Sky, G.M.: Regulation of Pancreatic Insulin and Glucagon Secretion. Ann. Rev. Physiol. 38:353, 1976.

13. De Fronzo, R.A., Serwin, R.S., Billingham, M., Felig, P.: Influence of basal insulin and glucagon secretion on potassium and sodium metabolism: Studies with somatostatin in normal dogs and in normal and diabetic beings. *J. Clin. Invest.*, 61:427, 1978.
14. Kahn, C.R.: Membrane Receptors for Hormones and Neurotransmitters. *J. Cell. Biol.*, 70:261, 1976.
15. Roth, J.: Receptors for insulin: Applications to disease states in man. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 31:95, 1975.
16. Felig, Philip., Baxter, John D., Broadus, Arthur E., Frohman, Lawrence A.: *Endocrinología y Metabolismo*, Ed. Mc. Graw Hill, D.F., Mexico, 1983.
17. Orci, L.: The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism.*, 25:1303, 1976.
18. Unger, R.H.: Alpha and beta cell interrelationships in health and disease. *Metabolism.*, 23:581, 1974.
19. Unger, R.H.: Diabetes and the alpha cell. *Diabetes.* 25:136, 1976.
20. Flier, J.S., Kahn, C.R., Roth, J.: Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance. *N. Engl. Med.*, 300:413, 1979.
21. World Health Organisation. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Secons Report. Technical Report Series 646; WHO; Geneva: 1980.
22. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 28: 1039-1057, 1979.

23. IFCC News. Diabetes mellitus.. 2:5, 1981.
24. Fajans, S.S., Cloutier, M.C., Crowther, R.L.: Clinical and etiologic heterogeneity of idiopathic diabetes mellitus. *Diabetes*, 27:1112, 1978.
25. Potte, D. Jr., Smith, P.H., J.W.: Neurohumoral regulation of the pancreatic islet A and B cells. *Metabolism*, 25 (suppl 1): 1453, 1976.
26. Todd, Campbell, J., Sandford, Hawley, A., Wells, B.B.: *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A. 1981.
27. Tietz, W.N.: *Química Clínica Moderana*, Ed. Interamericana, Edo. de México, Mex. 1972.
28. Klimt, C.R., Prout, J.E., Bradley, R.F., Dolger, H., Fisher, G., Gastineau, D.F., Marks, H., Meinert, C.L., Schumacher, D.P.: Standardization of the oral glucose tolerance test. *Diabetes*, 18:299, 1969.
29. Wilkerson H.L.C., Hyman, H., Kaufman, M., McCuiston, A.C., Francis, J.O.S.: Diagnostic evaluation of oral glucose tolerance test in nondiabetic subjects after various levels of carbohydrate intake. *N. Engl. J. Med.*, 262:1047, 1960.
30. Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.L., Saudek, C., Lehrman, M., Cerami, A.: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 295:417, 1976.
31. Sherwin, R.S., Hendler, R.G., Felig, P.: Effect of diabetes mellitus and insulin on the turnover and metabolic response to

- ketones in man. *Diabetes.*, 25:776, 1976.
32. Guisado, R., Arleff, A.I.: Neurologic manifestations of diabetic comas: Correlation with biochemical alterations in the brain. *Metabolism.* 24:665, 1976.
 33. Nash, John., Liste, John., Vobes, D.H.: Clinical test for Ketonuria. *Lancet* 17:801-803, 1954.
 34. Iovine, Enrique. *El Laboratorio en la Clínica.*, 3a. Edición. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, 1985.
 35. Richterich, R., Colombo, J.P.: *Química Clínica*, Salvat editores. Barcelona, Esp. 1983.
 36. Greenberg, L.A., and Lewter, D.: A micromethod for the determination of ketone bodies. *J. Biol. Chem.*, 154:177, 1944.
 37. K.G.M.M. Alberti., Z.S. Krabalo.: *Standardization of Biochemical Methods in the Diagnosis and Management of Diabetes.* WHO/IDF Executive Committee on Diabetes. Geneva, 1981.
 38. Henry, Richard J., Cannon, Donald C., Winkelman, James, W.: *Clinical Chemistry*, 2a. Edition. Ed. Harper & Row. New York, 1974.
 39. Tietz, Norbert W.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A. 1976.
 40. Erdo, José.: *Metodos Clínico-Químicos de Laboratorio*, Ed. Atlante, D.F., Mexico. 1944.
 41. Harano, Y., Suzuki, M., Kojima, H., Kashiwagi, A., Hidaka, H., and Shigeta, Y.: Development of Paper-strip Test for 3-Hidroxybutyrate and its Clinical Application. *Diabetes Care.*, 7.S, 481-485, 1984.

42. Kutter, Dolphe.: Test rápidos en el diagnóstico clínico, Ediciones Toray, Barcelona, Esp. 1977.
43. Harano, Y., Kosugi, K., Hyosu, T., Uno, S., Ichikawa, Y., Shigeta, Y.: Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies. Clin. Chim. Acta., 134:327-336, 1983.
44. Weichselbaum, T.E., and Somogyi, M.: A new method for the determination of small amounts of ketone bodies. J. Biol. Chem., 140:5, 1941.
45. Gerbig, K.: Un nuevo método altamente específico y sencillo para la determinación de glucosa con glucosa deshidrogenasa. Das Medizinische Laboratorium., 23, fascículo 1, Enero 1976. Publicada por Diagnostica Merck.
46. Loeb, H., and Dorothy, H.: International Study Group on Diabetes in Children and adolescents. Acta Paediatr. Bel., 30:189-192, 1977.
47. Belmonte, M.M., C.M., F.R.C.P., Sarkozy, E., and Harpur, R.E.: Urine Sugar Determination by the two-drop Clinitest Method., Diabetes., 16:557-59, August, 1967.
48. Clements, R.S., Keane, N.A., Kirk, K.A., and Boshell, R.R.: Comparison of various methods for rapid glucosa estimation. Symposium on Home-Glucose Self-Monitoring. Diabetes Care., 4, 3:392-420, May - June, 1981.
49. Nobel, E., Burgt, I., Lear, A.: Preservation of Blood-Glucose Strips. Lancet., 22-29, Dec. 1979.

50. Hugget, G., Nixon, D.A.: Use of Glucose oxidase, Peroxidase, and o-Dianisidine in Determination of Blood and Urinary Glucose. *Lancet.*, 24:368-370, 1957.
51. Preparations for Biochemistry. E. Merck. 61 Darmstadt, Federal Republic of Germany, 1982.
52. Catálogo de productos de papel de laboratorio 1979, Whatman. Publicación 800 PPC S.
53. Bermejer, Hans, U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 Ed. New York:Academic, 1974. Vol II.
54. Keilin, D., Hartree, E.F.: Specificity of Glucose Oxidase. *Biochem. J.* 39, 293, 1957.
55. Keilin, D., Hartree, E.F.: Properties of Glucose oxidase. *Biochem. J.* 39, 118, 1945.
56. Dry Reagent Chemistries. *Analytical Chemistry*. Vol. 55 No. 4 Abr. 1983.